



ROZPRAWA DOKTORSKA

Dynamiczne hydrożele jako nośniki hormonów i leków przeciwnowotworowych w terapii ginekologicznej

Mgr inż. Daria Jaworska-Krych

Promotorzy:

Dr hab. Monika Gosecka, prof. CBMiM PAN

Prof. dr hab. inż. Marcin Kozanecki

Łódź, 2024

Chciałabym serdecznie podziękować

*moim promotorom Pani Profesor Monice Goseckiej oraz Panu Profesorowi
Marcinowi Kozaneckiemu, za bezustanną wiarę we mnie i motywowanie mnie do ciągłego
przekraczania moich granic,*

*współpracownikom oraz zewnętrznym grupom badawczym, dzięki którym możliwe było
przeprowadzenie badań, za wsparcie oraz miłą atmosferę w pracy,*

*mojej rodzinie i przyjaciołom, w szczególności mamie, siostrze oraz mężowi, za wiarę we mnie
i ogrom wsparcia każdego dnia.*

Badania, które są przedmiotem niniejszej rozprawy zostały sfinansowane
ze środków Narodowego Centrum Nauki:
SONATA-BIS (UMO-2018/30/E/ST5/00576),
kierownik projektu: dr hab. Monika Gosecka, prof. CBMM

Spis treści

1. Streszczenie	7
2. Abstract	9
3. Wykaz stosowanych skrótów	11
4. Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy.....	12
5. Przegląd literatury	13
5.1. Budowa żeńskich narządów płciowych	13
5.2. Najczęściej występujące choroby ginekologiczne	14
5.3. Leczenie chorób ginekologicznych.....	15
5.4. Amfifilowy hiperrozgałęziony poliglicydol jako materiał do tworzenia hydrofobizowanych hydrożeli polimerowych.....	17
6. Cel i zakres pracy	21
7. Metodyka.....	23
7.1. Wykorzystane odczynniki i sprzęt.....	23
7.2. Wykorzystane metody badawcze	23
7.2.1. Charakterystyka otrzymanych w wyniku syntez polimerów	23
7.2.2. Charakterystyka właściwości reologicznych otrzymanych hydrożeli.....	24
7.2.3. Określenie oddziaływań polimer – lek.....	25
7.2.4. Badania biologiczne	26
7.2.5. Badania właściwości termowrażliwych otrzymanych polimerów	27
8. Wyniki własne	30
8.1. Hydrofobizowane hydrożele jako potencjalne nośniki leków trudno rozpuszczalnych w wodzie na przykładzie leku modelowego – klotrimazolu.	30
8.1.1. Synteza polimerów. Właściwości hydrofobizowanego hiperrozgałęzionego poliglicydolu.....	30
8.1.2. Właściwości otrzymanych amfifilowych polimerów na bazie hiperrozgałęzionego poliglicydolu.....	33
8.1.3. Enkapsulacja klotrimazolu w strukturze HbPGL. Profil uwalniania leku. ..	34

8.1.4. Cytotoksyczność hydrofobizowanego hiperrozgałęzionego poliglicydolu o różnym stopniu podstawienia grup monohydroksylowych.....	36
8.1.5. Synteza i charakterystyka reologiczna hydrofobizowanych hydrożeli utworzonych na zasadzie odwracalnych węzłów sieci.	37
8.1.6. Podsumowanie i wnioski.....	42
8.2. Wodne formułacje na bazie hydrofobizowanego hiperrozgałęzionego poliglicydolu i klotrimazolu o działaniu przeciwgrzybicznym.....	44
8.2.1. Przygotowanie wodnych formułacji polimeru z lekiem	44
8.2.2. Właściwości reologiczne formułacji wodnych otrzymanych na bazie hydrofobizowanego hiperrozgałęzionego poliglicydolu z klotrimazolem.....	46
8.2.3. Analiza oddziaływań przy użyciu spektrometrii podczerwieni – FT-IR.....	50
8.2.4. Analiza właściwości krystalicznych otrzymanych formułacji na bazie hydrofobizowanego hiperrozgałęzionego poliglicydolu przy użyciu skaningowej kalorymetrii różnicowej	56
8.2.5. Test przenikalności substancji aktywnej	58
8.2.6. Stabilność uwodnionych formułacji na bazie amfifilowego hiperrozgałęzionego poliglicydolu z lekiem w warunkach symulowanego płynu waginalnego.	59
8.2.7. Badania <i>in vitro</i> aktywności przeciwgrzybiczej leku zamkniętego w wodnych formułacjach polimeru z lekiem	59
8.2.8. Wnioski	60
8.3. Właściwości termowrażliwe hydrofobizowanego hiperrozgałęzionego poliglicydolu.....	61
8.3.1. Badania turbidymetryczne otrzymanych amfifilowych polimerów	61
8.3.2. Badania wodnych roztworów hydrofobizowanych pochodnych HbPGL z wykorzystaniem spektroskopii Ramana.....	65
8.3.3. Analiza zachowania termowrażliwego amfifilowych polimerów z wykorzystaniem obliczeń komputerowych	69
8.3.4. Wnioski	81
8.4. Badania nieopublikowane	82

8.4.1.	Amfifilowy hiperrozgałęziony poliglicydol w terapii przeciwnowotworowej	82
8.4.2.	Zwiększenie rozpuszczalności hormonów	87
9.	Podsumowanie i wnioski.....	94
10.	Wykaz cytowanej literatury.....	97
11.	Życiorys naukowy	104
12.	Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej.....	109

1. Streszczenie

Efektywność obecnie stosowanych dopochwowych terapii ginekologicznych pozostaje na niezadawalającym poziomie. Wynika to z faktu, że współczesne formułacje lekowe, na przykład kremy, globulki, tabletki, czy kapsułki, ze względu na swoją formę często ulegają niekontrolowanemu wyciekowi z pochwy. W efekcie biodostępność leku jest znacznie ograniczona, a rzeczywista dawka leku, który przeniknął do organizmu trudna do ustalenia. W rezultacie konieczne jest wielokrotne dawkowanie leku, co może skutkować nawracającymi infekcjami, lekoopornością drobnoustrojów wywołujących zakażenia, a to może prowadzić nawet do bezpłodności. W trosce o poprawę zdrowia i komfortu życia kobiet konieczne wydaje się stworzenie nośników różnych substancji bioaktywnych wykorzystywanych w terapiach ginekologicznych, który zapewni ich zwiększoną biodostępność oraz wydłuży czas ich oddziaływania z miejscem zmienionym chorobowo. Celem niniejszej pracy było opracowanie materiału polimerowego, który będzie uniwersalną bazą do przygotowania efektywnych formułacji do zastosowań w dopochwowych terapiach ginekologicznych o charakterze hormonalnym, przeciwgrzybiczym czy przeciwnowotworowym.

Niewątpliwie jednym z największych wyzwań w opracowaniu tego typu polimeru jest konieczność połączenia kilku niezbędnych cech biologicznych i fizyko-chemicznych, takich jak: biogodność, brak cytotoksyczności, odpowiednie właściwości reologiczne, dobra adhezja do błony komórkowej wyściełającej pochwę, amfifilowość, w przypadku nośników przeznaczonych dla substancji o charakterze hydrofobowym. Do realizacji celu wybrano hiperrozgałęziony poliglicydol (HbPGL), którego synteza jest stosunkowo prosta i tania, i który charakteryzuje się dużą hydrofilowością i biokompatybilnością. W strukturze tego polimeru wyróżnia się cztery typy powtarzających się jednostek konstytucyjnych: dendrytyczne, terminalne i dwa typy liniowych jednostek monohydroksylowych. Jednostki monohydroksylowe zmodyfikowano w sposób selektywny ugrupowaniami hydrofobowymi: fenyłowymi bądź bifenyłowymi poprzez wiązania estrowe bądź uretanowe, nadając makrocząsteczce HbPGL amfifilowy charakter. Obecność 1,2-diolowych grup funkcyjnych w jednostkach terminalnych zapewniła odpowiednią rozpuszczalność w wodzie zhydrofobizowanych makrocząsteczek HbPGL oraz możliwość wytworzenia układów hydrożelowych z dynamicznymi (odwracalnymi) węzłami sieci. Kopolimer akrylamidowy zawierający jednostki kwasu borowego zaprojektowano i zsyntezowano jako środek sieciujący. Przygotowane na bazie wyżej wymienionych materiałów formułacje zawierające klotrimazol (użyty jako modelowy lek przeciwgrzybiczy powszechnie stosowany w terapiach ginekologicznych, ale znany również z właściwości przeciwnowotworowych wobec raka szyjki

macicy) miały właściwości reologiczne pozwalające na ich podawanie za pomocą strzykawki oraz zdolność do samonaprawy struktury.

Przeprowadzone badania pokazały, że stopień modyfikacji grup monohydroksylowych grupami fenyłowymi wpływa na efektywność enkapsulacji hydrofobowych substancji bioaktywnych w strukturze makrocząsteczek HbPGL oraz właściwości reologiczne otrzymanych hydrożeli. Zbyt niskie stopnie hydrofobizacji skutkowały bardzo niską wydajnością enkapsulacji, natomiast zbyt wysokie udziały molowe ugrupowań hydrofobowych w makrocząsteczce ograniczały zdolność hydrożelu do samonaprawy. Stwierdzono, że oprócz dynamicznych węzłów sieci w tworzeniu hydrożelu biorą również udział oddziaływania hydrofobowe, w które zaangażowane są pierścienie aromatyczne obecne w strukturze hydrofobizowanego HbPGL.

Formulacje na bazie hiperrozgałęzionego poliglicydotu modyfikowanego ugrupowaniami bifenyłowymi wykazały właściwości lepkich cieczy nienewtonowskich, i co ważniejsze, umożliwiły molekularne zdyspergowanie klotrimazolu w polimerowej matrycy (czego nie zaobserwowano dla fenyłowych pochodnych HbPGL) zwiększając znacząco jego biodostępność i uzyskując zaskakująco wydłużony czas działania przeciwgrzybiczego (nawet do 7 dni).

Zaobserwowano również, że wodne roztwory hydrofobizowanego grupami fenyłowymi HbPGL wykazują termowrażliwość, przy czym rodzaj wiązania użytego do immobilizacji kowalencyjnej pierścienia aromatycznego w strukturze HbPGL znacząco wpływa na mechanizm i temperaturę separacji faz. Pokazano, że w mechanizmie przejścia fazowego polimeru ważną rolę odgrywają zmiany konformacyjne mające miejsce w obrębie łańcuchów eterowych HbPGL oraz tendencja aromatycznych pierścieni do wyeksponowania na zewnątrz makrocząsteczki. W przypadku pochodnej uretanowej, która jak pokazano ma bardziej hydrofobowy charakter niż pochodna estrowa obserwuje się agregację domen hydrofobowych.

Udowodniono, że zastosowanie matrycy hydrożelowej na bazie hydrofobizowanego HbPGL wzmocniło działanie leku przeciwnowotworowego (5-fluorouracylu) oraz wpłynęło na jego selektywne działanie wobec komórek raka szyjki macicy. Biorąc pod uwagę formulacje obecnie stosowane w leczeniu nowotworów, system działający selektywnie w miejscu chorobowo zmienionym byłby przełomowym materiałem w dopochwowym leczeniu onkologicznym.

Natomiast próba wytworzenia nośnika hormonów (progesteronu i estradiolu), pokazuje jak szerokie zastosowanie może mieć hydrofobizowany hiperrozgałęziony poliglicydol, choć w tym przypadku formulacje wymagają dalszej optymalizacji.

2. Abstract

The effectiveness of current intravaginal gynecological therapies remains unsatisfactory. This issue largely stems from the fact that contemporary drug formulations – such as creams, suppositories, tablets, and capsules – often experience uncontrolled leakage from the vaginal cavity due to their physical form. As a result, drug bioavailability is significantly reduced, making it difficult to determine the actual dose absorbed into the body. This limitation results in the necessity for frequent dosing, which can lead to recurring infections, microbial drug resistance, and, in severe cases, infertility. In light of the need to improve women's health and quality of life, it is essential to develop carriers for various bioactive substances used in gynecological therapies that will enhance bioavailability and prolong their interaction time with affected tissues.

The aim of this study was to develop a polymeric material that could serve as a versatile base for preparing effective formulations intended for intravaginal gynecological therapies, including hormonal, antifungal, and anticancer treatments. One of the primary challenges in designing this type of polymer is the requirement to integrate several crucial biological and physicochemical properties, such as biocompatibility, lack of cytotoxicity, suitable rheological properties, good adhesion to the mucosal lining of the vaginal wall, and amphiphilicity – particularly important for carriers designed for hydrophobic substances. Hyperbranched polyglycidol (HbPGL) was chosen for this purpose due to its relatively simple and cost-effective synthesis, high hydrophilicity, and biocompatibility. The structure of this polymer consists of four types of constitutional units: dendritic, terminal, and two types of linear monohydroxyl units. The monohydroxyl units were selectively modified with hydrophobic groups (phenyl or biphenyl) through ester or urethane bonds, imparting an amphiphilic character to the HbPGL macromolecule. The presence of 1,2-diol functional groups in the terminal units ensured adequate solubility of the hydrophobized HbPGL macromolecules in water, enabling the formation of hydrogel systems with dynamic (reversible) network junctions. An acrylamide copolymer containing boric acid units was designed and synthesized to act as a cross-linking agent. Formulations prepared from the materials mentioned above and containing clotrimazole (used as a model antifungal drug commonly employed in gynecological therapies, also known for its anticancer properties against cervical cancer) exhibited rheological properties suitable for syringe administration and showed the ability to self-healing.

The research demonstrated that the degree of modification of the monohydroxy groups with phenyl moieties influenced both the efficiency of encapsulating hydrophobic bioactive

substances within the HbPGL macromolecular structure and the rheological properties of the resulting hydrogels. Insufficient degrees of hydrophobization resulted in very low encapsulation efficiency, while excessively high molar fractions of hydrophobic groups in the macromolecule limited the hydrogel's self-healing ability. It was found that, in addition to dynamic network junctions, hydrophobic interactions involving the aromatic rings present in the structure of hydrophobized HbPGL also play a role in forming the hydrogel.

Formulations based on hyperbranched polyglycidol modified with biphenyl groups exhibited characteristics of viscous non-Newtonian liquids and, more importantly, enabled molecular dispersion of clotrimazole within the polymer matrix (not observed for phenyl-modified HbPGL derivatives), significantly enhancing its bioavailability and producing an unexpectedly prolonged antifungal effect (up to 7 days). Additionally, it was observed that aqueous solutions of HbPGL hydrophobized with phenyl groups exhibit thermoresponsive properties, with the type of bond used to covalently immobilize the aromatic ring in the HbPGL structure significantly affecting both the phase separation mechanism and the transition temperature. The phase transition of the polymer was shown to involve conformational changes within the HbPGL ether chains and the tendency of the aromatic rings to become exposed on the macromolecule's exterior. In the case of the urethane derivative, which was demonstrated to be more hydrophobic than the ester derivative, aggregation of hydrophobic domains was observed.

It was shown that the use of a hydrogel matrix based on hydrophobized HbPGL enhanced the anticancer effect of the drug 5-fluorouracil and contributed to its selective action against cervical cancer cells. Given the formulations currently employed in cancer treatment, a system that operates selectively at the disease site would represent a breakthrough material for intravaginal oncological therapy.

An attempt to create a hormone carrier (for progesterone and estradiol) highlights the broad potential applications of hydrophobized hyperbranched polyglycidol, although further optimization of these formulations is required.

3. Wykaz stosowanych skrótów

5-FU – 5-fluorouracyl

ATR – Attenuated Total Reflection – spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni

BE – hydrofobizowane hiperrozgałęzione poliglicydole modyfikowane ugrupowaniem benzoilowym

BPh – hydrofobizowane hiperrozgałęzione poliglicydole modyfikowane ugrupowaniem bifenylouretanowym

CMC – Critical Micelle Concentration – krytyczne stężenie miceli

CLT – klotrimazol

DFT – Density Functional Theory – teoria funkcjonału gęstości

DSC – Differential Scanning Calorimetry – skaningowa kalorymetria różnicowa

EST – estradiol

FT-IR – Fourier-transform Infrared Spectroscopy – spektroskopia fourierowska w podczerwieni

HbPGL – Hyperbranched Polyglycidol – hiperrozgałęziony poliglicydol

HeLa – Cervical Cancer Cell-line – nowotworowe komórki raka szyjki macicy

HMEC-1 – Human Microvascular Endothelial Cells – prawidłowe komórki śródbłona mikronaczyniowego skóry

HPV – Human Papillomavirus – wirus brodawczaka ludzkiego

HIV – Human Immunodeficiency Virus – ludzki wirus niedoboru odporności

hHbPGL – Hydrophobized Hyperbranched Polyglycidol – hydrofobizowany hiperrozgałęziony poliglicydol

LCST – Lower Critical Solution Temperature – niższa krytyczna temperatura roztworu

MD – Molecular Dynamics – dynamika molekularna

NMR – Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego

PC – hydrofobizowane hiperrozgałęzione poliglicydole modyfikowane ugrupowaniem fenylouretanowym

PGT – progesteron

Poli(AM-ran-2-AAPBA) – poli(akrylamid-ran-kwas 2-akrylamidoborowy)

WHO – World Health Organization – Światowa Organizacja Zdrowia

4. Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy

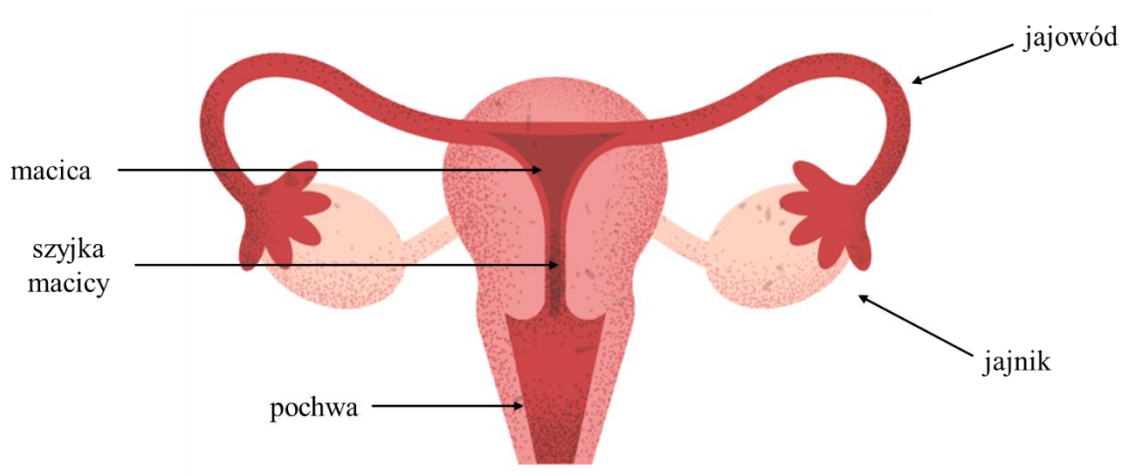
- [A1] Gosecka M., **Jaworska-Krych D.**, Gosecki M., Wielgus E., Marcinkowska M., Janaszewska A., Klajnert-Maculewicz B., Self-Healable, Injectable Hydrogel with Enhanced Clotrimazole Solubilization as a Potential Therapeutic Platform for Gynecology, *Biomacromolecules*, 2022, 23, 10, 4203-4219.
- [A2] **Jaworska-Krych D.**, Gosecka M., Gosecki M., Urbaniak M., Dzitko K., Ciesielska A., Wielgus E., Kadłubowski S., Kozanecki M., Enhanced solubility and bioavailability of clotrimazole in aqueous solutions with hydrophobized hyperbranched polyglycidol for improved antifungal activity, *Applied Materials and Interfaces*, 2024, 16, 15, 18434–18448.
- [A3] **Jaworska-Krych D.**, Gosecka M., Maczugowska P., Hałagan K., Szutkowski K., Gosecki M., Urbaniak M., Kozanecki M., Thermosensitive Behavior of Internally Phenyl-Enriched Hyperbranched Polyglycidols in Water – The influence of a Covalent Bond Used for the Hydrophobization, *Macromolecules*, 2024, 57, 19, 9135-9156.
- [A4] Gosecka M., **Jaworska-Krych D.**, Gosecki M., Urbaniak M., Wielgus E., Gostynski B., Marcinkowska M., Janaszewska A., Klajnert-Maculewicz B., Construction of dynamic hydrogel inducing effective and selective 5-fluorouracil monotherapy against cervical cancer cells, w przygotowaniu

5. Przegląd literatury

5.1. Budowa żeńskich narządów płciowych

Kobiety stanowią połowę społeczeństwa i mimo ich zaradności i wielozadaniowości od wieków za jedną z ważniejszych ich ról w życiu uważa się bycie matką. Mimo to, nadal w wielu miejscach na świecie problemy związane z dysfunkcjami układu rozrodczego kobiet są tematem tabu.

Rozważając żeńskie narządy płciowe wymienić należy: macicę, jajowody, jajniki oraz pochwę – rysunek 1. Macica należy do grupy narządów nieparzystych, jej wymiary to 6 – 8 cm długości, 4 cm szerokości i 2,5 cm wysokości (1). Składa się ona z trzonu, cięśni i szyjki – która ma średnio 2,5 – 3 cm długości. Pomiędzy trzonem macicy a szyjką istnieją znaczące różnice w budowie tkankowej. Ścianę trzonu macicy tworzą błony: surowicza, mięśniowa oraz śluzowa. Błona surowicza, inaczej zwana błoną otrzewnowa okrywa macicę oraz najbliższe organy – pęcherz, pochwę oraz odbytnicę. Błonę mięśniową tworzą pęcherzyki mięśni gładkich oraz włókna kolagenowe i sprężyste. Natomiast błona śluzowa wyściela wnętrze macicy i jest silnie reaktywna na działanie hormonów, zwłaszcza estrogenów i progesteronu. W jej budowie można wyodrębnić dwie warstwy: podstawową i czynnościową. Warstwa czynnościowa ulega złuszczeniu po każdym cyklu menstruacyjnym i na początku kolejnego cyklu jest odbudowywana z warstwy podstawowej. Natomiast szyjka macicy zbudowana jest z tkanki łącznej zbitej tworzącej jej ściany, które wyściela pofałdowana błona śluzowa. Wewnątrz szyjki macicy znajdują się gruczoły wytwarzające wydzielinę zwaną śluzem szyjkowym, który zmienia się w trakcie cyklu miesięczkowego.



Rysunek 1. Schemat przedstawiający budowę żeńskiego układu rozrodczego.

Jajowody są parzystymi przewodami wychodzącymi z rogów macicy do jajników, zbudowane są podobnie jak sama macica, z trzech warstw: błony surowiczej, błony mięśniowej oraz błony śluzowej (1). To właśnie przez jajowód komórka jajowa przedostaje się do wnętrza macicy, w jego wnętrzu panują odpowiednie warunki do zapłodnienia.

Jajnik to kolejny element układu rozrodczego kobiet. Ma kształt owalny, występuje parzyście po dwóch stronach macicy, połączony jest z nią poprzez jajowód. W jajnikach od urodzenia znajduje się określona liczba komórek płciowych, z których większość ginie w procesie dojrzewania (1). W momencie uzyskania przez kobietę dojrzałości płciowej zaczyna się cykliczny proces dojrzewania pęcherzyków, wewnątrz których zamknięta jest komórka jajowa.

Ostatnim z wymienionych narządów płciowych kobiety jest pochwa. Narząd ten budowę przypomina kanał o długości 8 – 10 cm, który jednym z końców obejmuje szyjkę macicy (1). Wewnątrz pochwa wyściełana jest pofałdowaną błoną śluzową, którą pokrywa nabłonek bogaty w glikogen. Obecne w pochwie pałeczki *Lactobacillus* oraz *Corynebacterium* rozkładają glikogen do kwasu mlekowego i octowego, w efekcie w środowisku pochwy panuje kwaśny odczyn ($\text{pH}=3,5 - 4$), co chroni ten narząd przed zakażeniem innymi drobnoustrojami. W pochwie znajduje się również śluz złożony w około 90% z wody, a także między innymi z mocznika, węglowodanów, kwasów tłuszczowych, czy soli (2). Zapewnia on odpowiednie nawilżenie pochwy, ale również dodatkowo zabezpiecza ją ze względu na fakt, że jest nieustannie odnawiany (2). Błona śluzowa pochwy cyklicznie dojrzewa, łuszczy się i następnie odbudowuje, cykl taki trwa średnio 96 godzin (3).

5.2. Najczęściej występujące choroby ginekologiczne

Oprócz wspomnianych wcześniej pałeczek *Lactobacillus* oraz *Corynebacterium* w pochwie obecne jest również znaczna liczba mikroorganizmów takich jak grzyby czy pasożyty stanowiąca mikrobiom pochwy (4,5), a balans pomiędzy nimi stanowi podstawę zdrowia kobiet (6). Zaburzenie równowagi w mikrobiomie pochwy prowadzi do zapalenia dróg rodnych, które może mieć podłoże: bakteryjne, grzybiczne lub wirusowe.

Jednym z najczęstszych zakażeń pochwy jest grzybica, która objawia się poprzez swędzenie, pieczenie oraz biały śluz, co wiąże się z ogólnym pogorszeniem jakości życia kobiet (7). Szacuje się, że około 75% kobiet doświadczy w swoim życiu grzybicy pochwy, przy czym około 50% jeszcze przed 25 rokiem życia (7,8). Zakażenie to w około 90% przypadków wywoływane jest przez szczep *Candida albicans* (9), natomiast drugim najczęstszym szczepem wywołującym grzybicę pochwy jest *Candida glabrata* (10). Na zakażenie grzybiczne narażone

są przede wszystkim osoby z obniżoną odpornością wynikającą na przykład z chemioterapii, zakażenia wirusem HIV, czy na skutek przejścia transplantacji (10,11). Dodatkowymi czynnikami zwiększającymi prawdopodobieństwo zachorowania na grzybicę pochwy są również sytuacje mające wpływ na podwyższony poziom estrogenów we krwi, czyli na przykład otyłość, czy ciąża (12), ale również osoby chore na cukrzycę, czy poddające się antybiotykoterapii są bardziej podatne na tego typu zakażenie (10–12).

Należy również wspomnieć, że pomimo wysoko rozwiniętej i nadal rozwijającej się medycyny, w tym diagnostyki, wciąż ogromnym zagrożeniem dla zdrowia i życia ludzi są choroby nowotworowe. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) czwartym najczęściej występującym rodzajem nowotworu u kobiet jest rak szyjki macicy (13). W samym tylko 2022 roku u 660 000 kobiet na świecie został zdiagnozowany ten rodzaj nowotworu, natomiast około 350 000 kobiet zmarło z jego powodu. W głównej mierze przyczyną rozwoju nowotworu szyjki macicy jest wirus brodawczaka ludzkiego (*Human Papillomavirus* – HPV) (14,15), który jest przenoszony drogą płciową. Szacuje się, że około 70% kobiet i mężczyzn aktywnych seksualnie będzie narażonych na zakażenie nim w swoim życiu (16). Zachorowanie, wykrycie i leczenie nowotworu szyjki macicy mają również związek z uwarunkowaniami społeczno-ekonomicznymi, jako że dostęp do świadczeń medycznych przez społeczeństwo jest silnie związany z sytuacją ekonomiczną państwa i społeczeństwa oraz świadomością konieczności wykonywania badań, w tym badań profilaktycznych (14).

Oprócz typowych chorób ginekologicznych, mających związek z zakażeniem wirusami, pierwotniakami czy grzybami, do chorób ginekologicznych zalicza się również zaburzenia hormonalne w organizmie kobiety, również związane z okresem menopauzy. Efektem nierównowagi hormonalnej w okresie rozrodczym mogą być zaburzenia miesiączkowania, problemy z płodnością, ale również poronienia (17). Zaburzenia hormonalne mają również ogromny wpływ na regulację nastrojów, ze względu na działanie na system neuroprzekaźników. Jednym z podstawowych hormonów, kluczowych z punktu widzenia ginekologii jest estrogen, który moduluje układ serotoninergiczny poprzez zwiększanie syntezy serotoniny i wrażliwości receptorów, natomiast drugi z kluczowych hormonów, progesteron, wpływa na uspokojenie (17). Zaburzenie balansu pomiędzy nimi może zakłócać systemy neuroprzekaźników, prowadząc do wahań nastroju, co negatywnie wpływa na komfort życia kobiet.

5.3. Leczenie chorób ginekologicznych

Obecnie standardowym podejściem do leczenia infekcji dróg rodnych u kobiet jest stosowanie terapii dopochwowych w postaci globulek, tabletek, kapsułek, kremów

czy roztworów (2,5). Leki stosowane w terapiach ginekologicznych w większości są trudno rozpuszczalne w wodzie, co prowadzi do ich niskiej biodostępności, a co się z tym wiąże do obniżonej efektywności (18–22). Stosowanie terapii dopochwowych pozwala na ominięcie problemu nazywanego wątrobowym efektem pierwszego przejścia, który dotyczy terapii doustnych i wiąże się z metabolizmem substancji aktywnych w przewodzie pokarmowym, zanim dotrze ona do miejsca zmienionego chorobowo, zmniejszając jej biodostępność (23). Dodatkowo, wagina jako miejsce dostarczania leków cechuje się również dużą powierzchnią kontaktu, dobrą przepuszczalnością leków, a co się z tym wiąże, zapewnia dostarczenie wysokich dawek leku bezpośrednio do miejsca chorobowo zmienionego, pozwalając na zmniejszenie efektów ubocznych (2,5,23).

Niestety, w kontekście dostarczania leków wagina jest trudnym środowiskiem, ze względu na panujące tu kwaśne pH, temperaturę około 37 °C, wytwarzaną wydzielinę i system samooczyszczania pochwy. Warunki takie powodują, że aktualnie stosowane formy leków nie mają szansy na dłuższe utrzymanie się w miejscu chorobowo zmienionym. Często dochodzi do niekontrolowanego wycieku formacji leczniczej z pochwy (2,19,23,24). W rezultacie leczenie jest nieefektywne, prowadząc do konieczności częstych aplikacji formacji zawierających dużą dawkę leku, co może powodować skutki uboczne, takie jak podrażnienia, nawrót infekcji, wytwarzanie lekooporności przez drobnoustroje wywołujące infekcje, a nawet prowadzić do bezpłodności (19,25–27).

Aktualnie największymi wyzwaniem wydają się być: wydłużenie czasu oddziaływania leku z miejscem chorobowo zmienionym, zapewnienie jego kontrolowanego uwalniania oraz zwiększenie biodostępności. Do tego celu idealne wydają się być hydrożelowe nośniki leków (26,28).

Hydrożele to trójwymiarowe sieci, o porowatej strukturze, utworzone z połączonych cząsteczek, mające zdolność do sorpcji dużych ilości wody, które zdobyły uznanie ze względu na duże podobieństwo ich właściwości do właściwości ludzkich tkanek (28–31). Podczas projektowania hydrożelowych nośników leków należy pamiętać o ich biokompatybilności i właściwościach reologicznych, a także w przypadku preparatów podawanych wewnętrznie o takiej budowie chemicznej, aby po spełnieniu swojej funkcji, mogły zostać bezpiecznie usunięte z dróg rodnych kobiety. Dodatkowo mając na uwadze wcześniej wspomniany hydrofobowy charakter większości dostępnych leków do terapii ginekologicznych, przy projektowaniu hydrożelowych nośników tych substancji ważne jest dopasowanie warunków do transportu związków trudno rozpuszczalnych w wodzie. W tym celu konieczne jest przeprowadzenie modyfikacji sieci polimerowej prowadzącej do utworzenia

hydrofobizowanych hydrożeli polimerowych (31). Konstrukty takie, nadal posiadają zdolność sorpcji wody, jednak charakteryzują się obecnością hydrofobowych grup w strukturze, które w środowisku wodnym dążą do tworzenia hydrofobowych domen. Obecność hydrofobowych domen w hydrofilowym środowisku hydrożelu zwiększa możliwość enkapsulacji leków trudno rozpuszczalnych w wodzie w matrycy polimerowej, co jest efektem pożądanym.

Jednym ze sposobów na otrzymanie hydrofobizowanych hydrożeli jest żelowanie miceli (32). Ich hydrofobowy rdzeń pozwoliłby na transport trudno rozpuszczalnych w wodzie substancji aktywnych, natomiast hydrofilowa powłoka zapewniłaby rozpuszczalność całej struktury w środowisku wodnym, jakie panuje w pochwie (29,33). Co więcej, wykorzystanie miceli do transportu leków dodatkowo mogłoby zmniejszyć efekty uboczne stosowanych substancji aktywnych, pełniąc formę zabezpieczenia przed warunkami zewnętrznymi. Zmniejszyłyby też możliwość degradacji cząsteczki leku przed dotarciem do miejsca zmienionego chorobowo (34).

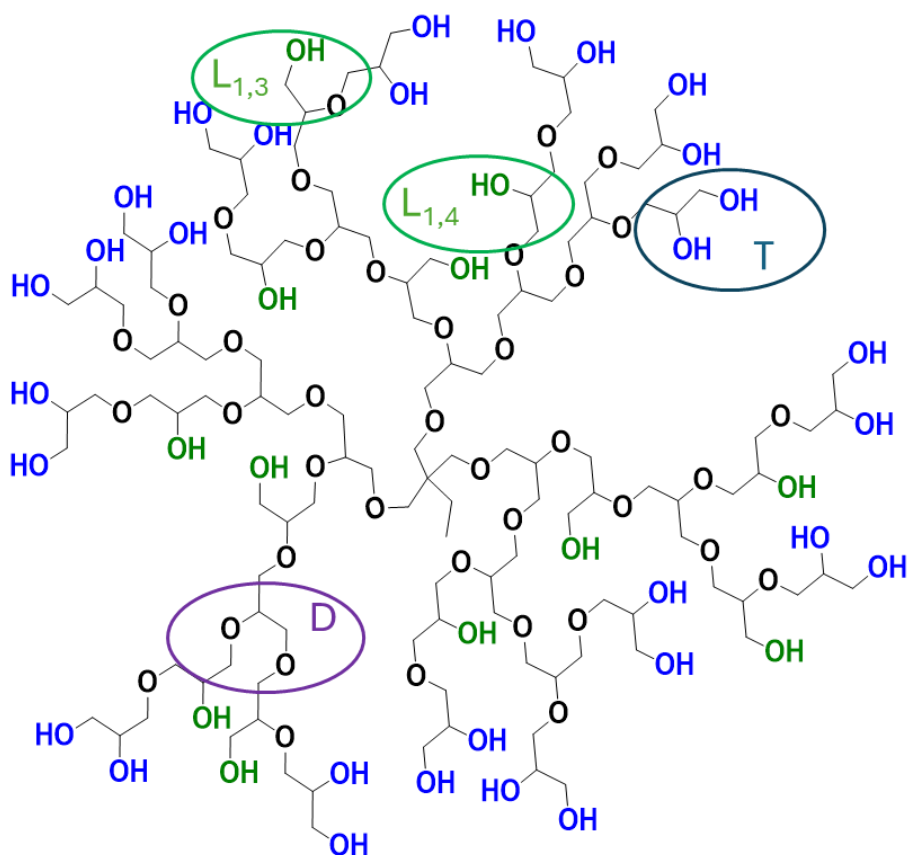
Jednakże, głównym problemem dotyczącym wykorzystania standardowych miceli jest ich niestabilność w stężeniu poniżej krytycznego stężenia miceli, CMC (*z ang. Critical Micelle Concentration*), które oznacza minimalne stężenie surfaktantu, konieczne do wytworzenia miceli w roztworze (35). Jednakże zastosowanie nieliniowych polimerów amfifilowych o topologii dendrytycznej, hiperrozgałęzionej lub gwieździstej, które przypominają strukturą klasyczne micelle, to jest posiadają zhydrofobizowany rdzeń związany kowalencyjnie z hydrofilową powłoką pozwala na ominięcie tych ograniczeń (36–38). Wśród polimerów hiperrozgałęzionych szczególnym zainteresowaniem cieszy się hiperrozgałęziony poliglicydol (39) ze względu na jego biokompatybilność (40–42) oraz obecność różnorodnych powtarzalnych jednostek konstytucyjnych otwierających liczne możliwości modyfikacji (40).

5.4. Amfifilowy hiperrozgałęziony poliglicydol jako materiał do tworzenia hydrofobizowanych hydrożeli polimerowych.

Hiperrozgałęziony poliglicydol, HbPGL (*z ang. hyperbranched polyglycidol*), ze względu na swoje zalety zasługuje na zainteresowanie przy rozpatrywaniu tworzenia jednocząsteczkowych miceli. Jest to polimer o budowie dendrytycznej, mający w swojej strukturze cztery powtarzające się jednostki konstytucyjne: terminalne grupy 1,2-diolowe (T), grupy dendrytyczne (D) oraz dwa rodzaje liniowych jednostek zawierających ugrupowania monohydroksylowe ($L_{1,3}$ i $L_{1,4}$) (41) – rysunek 2. W przeciwieństwie do dendrymerów, hiperrozgałęziony poliglicydol charakteryzuje się stosunkowo prostą, jednoetapową syntezą (39). HbPGL jest polimerem bardzo dobrze rozpuszczalnym w wodzie (36), o niskiej lepkości

(42), co ma odzwierciedlenie w wielu aplikacjach biomedycznych i farmaceutycznych, na przykład w inżynierii tkankowej (43), zajmującej się hodowlą i regeneracją tkanek, czy jako nośnik białek (44) i leków (36,39).

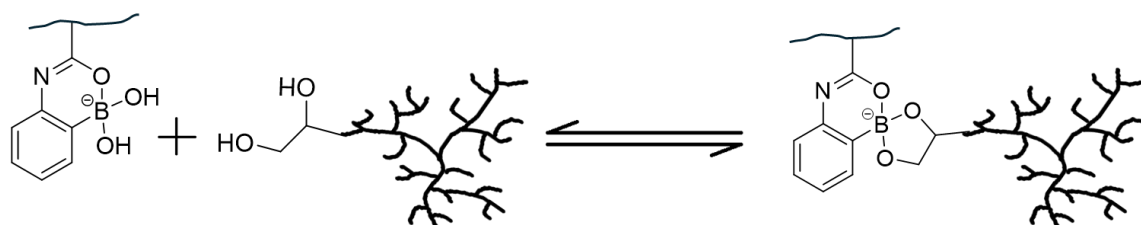
Dzięki budowie dendrytycznej pomiędzy ramionami makrocząsteczki powstają przestrzenie, w których można zaenkapsulować cząsteczki substancji aktywnych (45). Jednak, aby przygotować środowisko preferencyjne dla trudno rozpuszczalnych w wodzie cząsteczek substancji aktywnych konieczne jest przeprowadzenie modyfikacji polimeru, w wyniku której do wnętrza hydrofilowego HbPGL zostaną wprowadzone ugrupowania hydrofobowe, zmieniające charakter rdzenia makrocząsteczki polimeru (20,46). Jest to możliwe dzięki obecności dużej liczby grup monohydroksylowych wewnątrz struktury polimeru (42,47,48). Selektywna modyfikacja wewnętrznych grup monohydroksylowych prowadzi do wytworzenia amfifilowych konstruktów przypominających jednocząsteczkowe micle, w których rdzeń ma charakter hydrofobowy, natomiast grupy 1,2-diolowe obecne w jednostkach terminalnych zapewniają rozpuszczalność makrocząsteczki w wodzie.



Rysunek 2. Schemat przedstawiający budowę hiperrozgałęzionego poliglicydolu z zaznaczonymi powtarzającymi się jednostkami konstytucyjnymi: T – 1,2-diolowe grupy terminalne, D – jednostki dendrytyczne, L_{1,3} oraz L_{1,4} – jednostki liniowe zawierające pierwszo- i drugorzędowe grupy monohydroksylowe.

Zdecydowana większość leków dostępnych obecnie na rynku ma charakter hydrofobowy i zawiera w strukturze grupy aryłowe. Brak dobrej rozpuszczalności powoduje ograniczenia w ich biodostępności. W tym aspekcie skutecznym podejściem wydaje się zaprojektowanie i wytworzenie jednocząsteczkowych układów amfifilowych zawierających ugrupowania aromatyczne. Przykładem syntezy takiego układu może być modyfikacja HbPGL zaproponowana przez Turka i innych (20), którzy wprowadzili grupy bifenyłowe do struktury HbPGL poprzez wiązanie eterowe.

Warto również zwrócić uwagę, że obecność grup 1,2-diolowych w jednostkach terminalnych HbPGL umożliwia tworzenie dynamicznych węzłów sieci poprzez reakcję z kwasem borowym prowadząc do powstania wiązania estrowego – rysunek 3 (51).



Rysunek 3. Schemat tworzenia się dynamicznych węzłów sieci między grupami kwasu borowego i 1,2-diolami w jednostkach terminalnych HbPGL

W efekcie wytworzyć można sieć polimerową na bazie hiperrozgałęzionego poliglicydolu o rdzeniu modyfikowanym grupami hydrofobowymi otrzymując hydrofobizowane hydrożele polimerowe (51).

Należy jednak mieć na uwadze fakt, że wprowadzenie grup hydrofobowych do struktury hydrofilowego polimeru może mieć wpływ na właściwości termiczne otrzymanego kopolimeru. Zhang i inni (49) w swojej pracy wykazali, że poprzez wprowadzenie grup alifatycznych do korony hiperrozgałęzionego poliglicydolu nadano właściwości termowrażliwe HbPGL. Co więcej, przeprowadzone badania pokazały, że na zachowanie termowrażliwego ogromny wpływ ma długość łańcuchów alifatycznych wprowadzonych w trakcie modyfikacji. I tak przy długości C2-C4 otrzymany kopolimer wykazywał właściwości charakterystyczne dla polimerów wykazujących niższą krytyczną temperaturę roztworu, LCST (*z ang. Lower Critical Solution Temperature*). Oznacza to, że wraz ze wzrostem stężenia badanego polimeru obserwowano obniżenie temperatury zmętnienia roztworu. Natomiast wprowadzenie łańcuchów alifatycznych o liczbie atomów węgla C5-C8 prowadziło do interesującego zjawiska, to znaczy wraz ze wzrostem stężenia badanego polimeru dochodziło do wzrostu temperatury zmętnienia roztworu. Wprowadzenie dłuższych

łańcuchów (C8-C12) doprowadziło do otrzymania form nierozpuszczalnych w wodzie. Podobnie wprowadzenie zbyt dużej liczby ugrupowań bifenylowych w pracy Turka, prowadziło do otrzymania polimerów nierozpuszczalnych w wodzie (20). Prowadzi to do wniosku, że wielkość ugrupowania hydrofobowego, ale również stopień modyfikacji HbPGL ma znaczący wpływ na właściwości termiczne wodnych roztworów otrzymanych polimerów.

6. Cel i zakres pracy

Mając na uwadze problemy z jakimi borykają się kobiety, dotknięte chorobami układu rozrodczego takie jak niewygodne formy dozowania leków (globulki, tabletki), utrudniony bezpośredni kontakt nośnika z miejscem zainfekowanym oraz niska stabilność nośnika w miejscu dozowania, konieczność częstych aplikacji formułacji zawierających duże dawki leków wynikające z ich niskiej biodostępności i wysokiej hydrofobowości substancji aktywnych stosowanych w terapiach ginekologicznych, konieczne jest poszukiwanie nowych, bardziej wydajnych i zapewniających znacznie wyższy komfort użytkowania nośników leków ginekologicznych. Należy przy tym zwrócić szczególną uwagę na komfort życia kobiet z problemami ginekologicznymi poszukując rozwiązań ograniczających częstość dozowania leków poprzez zapewnienie równomiernego i powolnego uwalniania substancji aktywnej z nośnika, a także długotrwały i bezpieczny bezpośredni kontakt miejsc chorobowo zmienionych z nośnikiem leku. Jak wskazuje przegląd literatury obecnie znalezienie odpowiednich rozwiązań nadal jest wyzwaniem ze względu na wiele zmiennych wpływających zarówno na uwalnianie leku, jak i trwałość samego nośnika.

Jedną z ciekawych alternatyw w obszarze dozowania leków ginekologicznych są materiały hydrożelowe otrzymywane z polimerów łączących w sobie cechy hydrofilowe i hydrofobowe, wytworzone z wykorzystaniem tzw. dynamicznych węzłów sieci, które umożliwią wstrzykiwalność, samonaprawę, wysoką adhezję do tkanek oraz powolną degradację żelu w czasie. Postawiona hipoteza badawcza zakładała, że można otrzymać hydrożel do dozowania dopochwowego zbudowany z monomolekularnych micel z hydrofobizowanego hiperrozgałęzionego poliglicydolu, będący nośnikiem leków trudno rozpuszczalnych w wodzie, zapewniający wysoką biodostępność, dobrą adhezję do ścianek pochwy i przedłużone uwalnianie substancji bioaktywnych. Biorąc pod uwagę powyższe głównym celem niniejszej pracy było wyeliminowanie problemów rozpuszczalności leków trudno rozpuszczalnych w wodzie stosowanych w leczeniu ginekologicznym, poprzez ich enkapsulację w monomolekularnych, amfifilowych, micelach zbudowanych z hydrofobizowanego HbPGL, a następnie przygotowanie hydrożelowego nośnika do transportu i równomiernego dozowania leku wytworzonego w oparciu o wyżej wspomniane michele związane dynamicznymi węzłami sieci.

Do osiągnięcia postawionego celu konieczne było wykonanie prac, które podzielone zostały na następujące etapy:

- synteza hiperrozgałęzionego poliglicydolu, modyfikacja grup monohydroksylowych znajdujących się w jego wnętrzu grupami hydrofobowymi oraz charakterystyka otrzymanych polimerów,
- synteza kopolimeru niosącego ugrupowania kwasu borowego, który umożliwi wytworzenie sieci polimerowej w oparciu o dynamiczne węzły sieci,
- enkapsulacja leków trudno rozpuszczalnych w wodzie w cząsteczkach amfifilowego HbPGL,
- wytworzenie hydrożeli zbudowanych z hydrofobizowanego HbPGL z zaenkapsulowanym lekiem na bazie dynamicznych węzłów sieci,
- charakterystyka otrzymanych hydrożeli poprzez badania reologiczne, badania na komórkach oraz testy przenikalności substancji aktywnych przez membranę.

7. Metodyka

7.1. Wykorzystane odczynniki i sprzęt

Glicydol, wodorek wapnia, 1,1,1-tri(hydroksymetylo)propan, tetrahydrofuran, kwas para-toluenosulfonowy, izocyjanian 4-bifenylu zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich. 2,2-dimetoksypropan został zakupiony w firmie TCI. Chlorek benzoilu oraz izocyjanian fenylu zostały zakupione z firmy Alfa Aesar. α,α -azobis(izobutyronitryl) otrzymano z firmy Fluka. Wodorek sodu w oleju mineralnym zakupiono w firmie Merck, natomiast Clotidal Max pochodził z firmy USP Health. Leki stosowane do badań pochodziły odpowiednio: klotrimazol z Sigma-Aldrich, (17- β)-estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol (estradiol) z Angene, progesteron z firmy Acros Organics, natomiast 5-fluorouracyl z Apollo Scientific. Sucha pirydyna pochodziła z Acros Organics. Dejonizowaną wodę otrzymano przy użyciu dejonizatora, SolPure XIO P (Elkar, Polska), gdzie przewodność była równa 0,55 μ S.

Glicydol przed reakcją był suszony nad wodorkiem wapnia i destylowany znad sit molekularnych. 1,1,1-tri(hydroksymetylo)propan został oczyszczony metodą strącenia z roztworu acetonu eterem dietylowym, tetrahydrofuran był suszony nad stopem sodowo-potasowym. Kwas para-toluenosulfonowy został wysuszony suchym benzenem. Wodorek sodu został odmyty z oleju mineralnego przy użyciu dioksanu. Pozostałe odczynniki użyto bez dodatkowego oczyszczania.

Dodatkowo w pracy korzystano z worków dializacyjnych o wielkości porów 3,5 tysiąca Daltonów (SnakeSkin TM 3,5K MWCO) oraz celulozowych filtrów strzykawkowych o wielkości porów 0,8 μ m z firmy Sartorius.

7.2. Wykorzystane metody badawcze

7.2.1. Charakterystyka otrzymanych w wyniku syntez polimerów

Mając na celu scharakteryzowanie otrzymanych związków – określenie udziałów poszczególnych jednostek konstytucyjnych w HbPGL, potwierdzenie efektywnego przeprowadzenia poszczególnych etapów syntezy, określenie stopnia modyfikacji – przeprowadzono analizy z wykorzystaniem spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego, NMR. Wszystkie wykonane widma ^1H oraz ^{13}C NMR zarejestrowane były z wykorzystaniem spektrometru Bruker Avance NEO 400 MHz. Widma rejestrowane były w rozpuszczalnikach deuterowanych, takich jak: dimetylosulfotlenek (DMSO-d_6), metanol (MeOD-d_1), czy pirydyna (Py-d_5), w temperaturze 22 °C. W przypadku widm protonowych najczęściej uśredniano 128 skanów, natomiast w przypadku widm węglowych 512 skanów.

W celu analizy czystości makrocząsteczek i potwierdzenia przeprowadzenia modyfikacji grupami hydrofobowymi rejestrowano pseudo-dwuwymiarowe widma ^1H DOSY NMR (z ang. *Diffusion Ordered Spectroscopy*). Metoda ta pozwala na rejestrację współczynników dyfuzji poszczególnych fragmentów makrocząsteczki (50), dzięki czemu potwierdza się chemiczne związanie poszczególnych grup znajdujących się w badanym układzie. Rejestracja widm wiązała się z rozpuszczeniem próbki, następnie ustabilizowaniem roztworu w temperaturze 22 °C przez co najmniej 5 minut. Pomiary wykonywano przy użyciu spektrometru Bruker Avance III 500 oraz standardowego programu dstebpgp3s firmy Bruker.

Chcąc określić średnie ciężary cząsteczkowe zsyntetyzowanego hiperrozgałęzionego poliglicydotu wykorzystano chromatografię żelową. Do tego zadania wykorzystano głównie system do chromatografii żelowej firmy Testa Analytical Solutions, zbudowany z pompy izokratycznej, automatycznego podajnika próbek, zestawu dwóch kolumn separacyjnych – Suprema Lux, liniowej kolumny analitycznej XL oraz Suprema Lux analytical SDV, PSS Polymer Standards Service GmbH w termostatowanym piecu kolumnowym – oraz trzech detektorów: detektora wielokątowego rozpraszania światła laserowego, MALLS (Brookhaven Instruments Corporation), detektora różnicowego współczynnika załamania światła oraz detektora wiskozymetrycznego, które są połączone w jeden zestaw ze wspólną drogą próbki (Testa Analytical Solutions). Jako eluent stosowano 0,1 M roztwór azotanu (V) sodu, przy szybkości przepływu 1 ml na minutę. Pomiar wykonywano w temperaturze 30 °C.

Wyznaczenie temperatury zeszklenia otrzymanego polimeru dokonano przy użyciu skaningowej kalorymetrii różnicowej. Analizy wykonywano głównie przy użyciu kalorymetru DSC 2500 Discovery Series, TA Instruments. Pomiary wykonywano po odważeniu stosownej ilości próbki, zamknięciu w hermetycznym pojemniku, w zakresie temperatur dostosowanym do badanego materiału. Zastosowana szybkość grzania wynosiła 10 °C na minutę.

7.2.2. Charakterystyka właściwości reologicznych otrzymanych hydrożeli

W celu poznania właściwości reologicznych otrzymanych hydrożeli przeprowadzono analizy przy użyciu reometru MARS 40, Thermoscientific HAAKE, zaopatrzonego w równoległe płytki o średnicy 8 mm. Właściwości reologiczne hydrożeli zbadano w trybie oscylacyjnym w liniowym reżimie lepkośćprężystym. Pomiary przeprowadzone dla hydrożeli w trybie przemieszczania odkształceniem w zakresie 0,02 do 2000% zostały wykonane przy częstotliwości równej 1 Hz. Testy w trybie przemieszczania temperaturą wykonane zostały w zakresie 10 – 50 °C przy częstotliwości równej 1 Hz i odkształceniu równym 1%, natomiast szybkość grzania wynosiła 5 °C na minutę.

Krzywe płynięcia uzyskanych formułacji leczniczych zostały wyznaczone w temperaturach 25 oraz 37 °C, przy szybkości ścinania w zakresie 0,1 do 20 Hz. Testy przemiatania temperaturą zostały wykonane w zakresie 4 – 50 °C w trybie kontrolowanej deformacji przy odkształceniu równym 0,2%, częstości 0,16 Hz i szybkości grzania 6,5 °C na minutę.

7.2.3. Określenie oddziaływań polimer – lek

W celu poznania wpływu struktury polimeru na uwalnianie leku przeprowadzono eksperyment uwalniania leku ze struktury polimeru do buforu fosforanowego. Stężenie leku uwolnionego ze struktury badane było przy użyciu zestawu do chromatografii ACQUITY UPLC I-Class połączonego ze spektrometrem masowym SYNAPT G2-Si wyposażonym w pompę rozpuszczalnika binarnego i detektor z matrycą fotodiodową, Waters Corporation. Rozdzielenie analitu odbywało się z wykorzystaniem kolumny ACQUITY UPLC BEH C18, w temperaturze 45 °C. Faza ruchoma została przygotowana poprzez zmieszanie 0,1% kwasu mrówkowego (A) i 0,1% kwasu mrówkowego w acetonitrylu (B). Szybkość przepływu równa była 0,45 ml/min. Krzywa kalibracyjna została przygotowana dla siedmiu różnych stężeń roztworu klotrimazolu i była liniowa w zakresie stężeń 0,78 – 50 µg/ml, a współczynnik korelacji wynosił powyżej 0,999.

Kolejnym etapem badań było przeprowadzenie eksperymentu przenikania leku uwolnionego ze struktury hydrożelu przez membranę imitującą ludzką skórę. Eksperyment ten przeprowadzono wykorzystując komorę dyfuzyjną Franz. Określenie stężenia leku, który przeniknął przez membranę wymagało zastosowania czulszej metody. Do tego celu wykorzystano zestaw do chromatografii ACQUITY UPLC I-Class wyposażony w spektrometr mas SYNAPT G2-Si zaopatrzony w źródło elektrorozpylania i analizator mas z kwadrupolowym czasem przelotu, Waters Corporation. Rozdzielenie analitu wykonano w temperaturze 45 °C, wykorzystując do tego celu kolumnę Acquity BEH C18. Faza ruchoma została przygotowana tak jak opisano powyżej. Szybkość przepływu została ustawiona na 0,45 ml/min. Parametry źródła zostały zoptymalizowane i ustalone: napięcie kapilary 3,0 kV, napięcie stożka 20 V, przepływ gazu desolwatacyjnego 400 l/h w temperaturze 350 °C, ciśnienie gazu nebulizacyjnego 6,5 bar, temperatura źródła 100 °C. Widma masowe zostały zarejestrowane w zakresie m/z 100 – 1200. Do wykonania analizy przygotowano roztwory kalibracyjne odpowiednich leków w metanolu, a następnie rozcieńczano je płynem waginalnym i metanolem. W ten sposób uzyskano roztwory robocze o kilku różnych stężeniach. Otrzymane krzywe kalibracyjne zostały przygotowane dla dziesięciu różnych stężeń roztworów leków

i były liniowe w zakresie stężeń od 0,1 do 20 $\mu\text{g/ml}$, współczynnik korelacji wynosił powyżej 0,995.

W celu zbadania oddziaływań pomiędzy polimerem a lekiem wykonano badania z wykorzystaniem spektroskopii podczerwieni. Widma absorpcyjne w zakresie podczerwieni wykonano na spektrometrze Thermo Scientific Nicolet iS50, korzystając z przystawki ATR (z ang. *Attenuated Reflecion Accesory*) wyposażonej w kryształ diamentu. Widma rejestrowano z rozdzielczością 2 cm^{-1} , uśredniając 64 skany. Otrzymane widma poddano analizie: najpierw odjęto od każdego z otrzymanych widm linię bazową w postaci funkcji wielomianowej, a następnie widma poddano normalizacji. Proces normalizacji został dobrany w zależności od rozpatrywanego problemu.

7.2.4. Badania biologiczne

Cytotoksyczność zsyntezowanych polimerów została określona przy wykorzystaniu dwóch rodzajów komórek: prawidłowych komórek śródbłónka mikronaczyniowego skóry (HMEC-1) oraz nowotworowych komórek śródbłónka raka szyjki macicy (HeLa). Komórki HMEC-1 hodowano w pożywce MCDB131 z dodatkiem hydrokortyzonu, L-glutaminy i naskórkowego czynnika wzrostu (VEGF), natomiast komórki HeLa hodowano w pożywce Dulbecco'a modyfikowanym Eagle'a (DMEM). Do wszystkich hodowli komórek dodana została płodowa surowica bydlęca (FBS) i streptomycyna. Komórki hodowano w naczyniach hodowlanych T-75 w temperaturze 37 °C w atmosferze zawierającej 5% dwutlenku węgla, zmieniając medium hodowlane co 2 – 3 dni. Liczbę żywych komórek określano przy użyciu testu wykluczenia z błękitem tryptanu z wykorzystaniem zautomatyzowanego licznika komórek Countess, Invitrogen. Komórki wysiewano na płytki 96-dołkowe, w ilości $1,5 \times 10^4$ komórek/dołek 100 μl odpowiedniej pożywki. Następnie płytki inkubowano przez 24 godziny w nawilżonej atmosferze zawierającej 5% dwutlenku węgla, w 37 °C, w celu umożliwienia komórkom przyczepienie się do płytek. Wpływ cytotoksyczny otrzymanych polimerów na komórki wyznaczono poprzez określenie żywotności komórek ocenionej za pomocą testu bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazoliowego (MTT). Dokonano tego następująco: do przygotowanych wcześniej 96-dołkowców płytek z komórkami w pożywce dodano badane związki w różnych stężeniach (0,1; 1; 10; 50; 100 μM). Komórki z dodanymi roztworami polimerów inkubowano przez 24 i 48 godzin w nawilżonej atmosferze zawierającej 5% dwutlenku węgla i w temperaturze 37 °C. Po tym czasie komórki przemyto 50 μl buforu fosforanowego (PBS). Następnie do każdego dołka dodano 50 μl roztworu MTT o stężeniu 0,5 mg/ml w PBS i dalej inkubowano w normalnych warunkach hodowlanych przez trzy

godziny. Po inkubacji usunięto pozostały roztwór MTT, a uzyskany osad rozpuszczono w dimetylosulfotlenku (DMSO), wykorzystując do tego celu 100 µl DMSO na dołek. Następująca konwersja soli tetrazolowej (MTT) do barwnego formazanu poprzez dehydrogenazy mitochondrialne i cytozolowe jest markerem żywotności komórek. Przed dokonaniem pomiaru absorbancji płytki poddano wytrząsaniu przez około 1 minutę. Absorbancję mierzono przy 570 nm korzystając do tego celu ze spektrofotometru mikropłytkowego PowerWaveHT, BioTek.

Wartości cytotoksyczności porównane były do próby kontrolnej, a także dokonano porównania względem komórek potraktowanych niehydrofobizowanym hiperrozgałęzionym poliglicydolem.

Działanie przeciugrzybiczne otrzymanych formułacji sprawdzano wobec dwóch szczepów grzybów: *Candida albicans* ATCC 90028 oraz *Candida glabrata* ATCC 2001. Przed przystąpieniem do pomiarów szczepy grzybów hodowano w temperaturze 35 °C na pożywce agarowej, Sabouraud, przez 24 godziny. Następnie pojedynczą kolonię grzybów wysiano do 5 ml pożywki, gdzie korzystając z odpowiednio skalibrowanego turbidymetru dostosowano gęstość komórek do standardu. W kolejnym kroku rozcieńczono zawiesinę w stosunku 1 do 10 przy użyciu sterylnej wody destylowanej, w taki sposób aby uzyskać $(1-5) \times 10^5$ CFU/ml. Korzystając ze sterylnego wacika, grzyby rozprowadzono równomiernie na ogrzanych do 37 °C płytkach z pożywką agarową. Aktywność przeciugrzybiczną badanych struktur oceniono metodą dyfuzyjno-krażkową, zgodnie z wytycznymi Europejskiego Komitetu do spraw testowania wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe (EUCAST). Do płytek, w których umieszczone były szczepy grzybów wprowadzono krążki celulozowe, na których umieszczone były formułacje polimeru z lekiem. Każdą formułację przebadano trzykrotnie. Naczynia, zawierające kultury grzybów oraz krążki, inkubowano w temperaturze 37 °C. Jako kontrolę pozytywną zastosowano krążki zawierające odpowiedni ekwiwalent tabletki komercyjnie dostępnej – Clotidal MAX 500 mg klotrimazolu (USP Health). Po 16, 24 i 42 godzinach inkubacji, a także po 7 dniach, mierzono średnicę strefy zahamowania wzrostu grzybów, występującej na skutek działania leku. Zmierzone wartości wyrażono w milimetrach i przedstawiono jako strefy zahamowania wzrostu.

4.1.1.7.2.5. Badania właściwości termowrażliwych otrzymanych polimerów

Zależność transmitancji od temperatury wodnego roztworu polimeru rejestrowano za pomocą spektroskopii UV-Vis, korzystając ze spektrometru Analytik Jena Specord 600, zaopatrzonego w podajnik próbek z kontrolą temperatury. Pomiarów wykonywano przy trzech

długościach fali światła $\lambda = 400, 600, 800$ nm, w zakresie temperatur od 3 do 90 °C, co 5 °C, Temperaturę kontrolowano z dokładnością 0,2 °C, próbki były stabilizowane przez 120 s przed pomiarem.

Przeprowadzono również analizę wodnych roztworów polimerów z wykorzystaniem spektroskopii Ramana. Widma ramanowskie zostały zarejestrowane przy użyciu spektrometru MultiRAM FT Raman, Bruker, wyposażonego w laser diodowy Nd:YAG (1064 nm, moc nominalna 500mW), który pełnił rolę źródła światła wzbudzającego. Widma zostały zarejestrowane z rozdzielczością 4 cm⁻¹ uśredniając 1064 skany. Badane roztwory umieszczone były w kuwecie kwarcowej, o drodze optycznej równej 10 mm, która umieszczana była w celce grzejnej z kontrolą temperatury z dokładnością 0,1 °C.

Obserwację zachowania wodnego roztworu polimeru podczas grzania przeprowadzono również przy użyciu mikroskopii optycznej. Polaryzacyjne zdjęcia mikroskopowe wykonane były przy użyciu mikroskopu cyfrowego marki Keyence VHX-S7000, wyposażonego w stół grzejny.

Chcąc poznać mechanizmy stojące za zachowaniem termowrażliwym otrzymanych polimerów przeprowadzono obliczenia i symulacje komputerowe. Za pomocą narzędzi mechaniki kwantowej wykonano optymalizację struktur będących fragmentami uzyskanych rozgałęzionych makrocząsteczek, wykorzystując metodę teorii gęstości funkcjonału, DFT. Obliczenia prowadzono metodą B3LYP w bazie 6-311G(d,p) w programie Gaussian 16. Wartości cząstkowych ładunków elektrycznych zostały obliczone korzystając ze schematu Merz-Singh-Kollman_(51,52), przy ładunku całkowitym wynoszącym zero. Ze względu na ograniczenia metody DFT, do obliczeń wykorzystano jedynie pojedyncze gałęzie badanych polimerów – struktury stanowiące mniej więcej 1/8 całej makrocząsteczki (badane struktury zawierały około 100 atomów). Badania prowadzono dla samego polimeru jak i dla układów zawierających cząsteczki wody. Do obliczeń przyjęto długość graniczną wiązania wodorowego wynoszącą 3,5 Å, a kąt graniczny wynoszący 140°.

W celu obserwacji oddziaływań obecnych w całej makrocząsteczce polimeru, konieczne było zastosowanie symulacji dynamiki molekularnej. Symulacje przeprowadzane dla pojedynczych makrocząsteczek hHbPGL zostały przeprowadzone wykorzystując program LAMMPS. Zostały zrealizowane dwa warianty symulacji, przy czym w przypadku obu krok czasowy został ustalony na 1fs. Na makrocząsteczkę polimeru przypadało 5741 cząsteczek wody w przypadku pochodnej estrowej oraz 5778 cząsteczek wody w przypadku pochodnej uretanowej. Pułta symulacyjne miały okresowe warunki brzegowe. Wartości graniczne (*tzw. cut off*) dla oddziaływań typu Lennard-Jones zostały ustalone na 9 Å, natomiast

dla oddziaływań Coulomba na 8,5 Å. Przy odległościach powyżej 8,5 Å zastosowany został algorytm PPM (z ang. *Particle-Particle Particle-Mesh*) (53), w celu odtworzenia oddziaływań elektrostatycznych. W przypadku pierwszego wariantu symulacji dla polimeru wykorzystano model pola siłowego OPLS-AA, natomiast dla wody TIP4P/2005, w drugim wariancie symulacji zastosowano model Amber 18 dla polimeru, natomiast dla wody TIP3P (54). Przed rozpoczęciem symulacji, w pierwszej kolejności dokonano optymalizacji układu. Następnie pierwsze 50 000 kroków czasowych (50 ps) zostało przeprowadzonych w trybie NVT – termalizacja, kolejne 5 000 000 kroków czasowych (5 ns) przeprowadzono w trybie NPT.

Mając na celu zbadanie oddziaływań międzycząsteczkowych odpowiadających za właściwości termiczne polimeru przeprowadzono symulacje dynamiki molekularnej w dużej skali przy użyciu oprogramowania YASARA. W tym celu 10 makrocząsteczek hydrofobizowanego hiperrozgałęzionego poliglicydołu umieszczono losowo w pudle symulacyjnym o wymiarach 100x100x100 Å³. W kolejnym kroku do układu zostały wprowadzone cząsteczki wody o gęstości od 0,994 g/ml dla temperatury 35 °C, do 0,97 g/ml w temperaturze 80 °C. Do opisu cząsteczek wody zastosowano model pola siłowego TIP3P. Dla polimeru zastosowano model pola siłowego Amber 14 z okresowymi warunkami granicznymi, natomiast oddziaływania Coulomba uśredniono metodą Lagrange’a-Coulomba, przyjmując odległość graniczną jako 14 Å. Zanim przystąpiono do przeprowadzenia symulacji układ poddano minimalizacji energii.

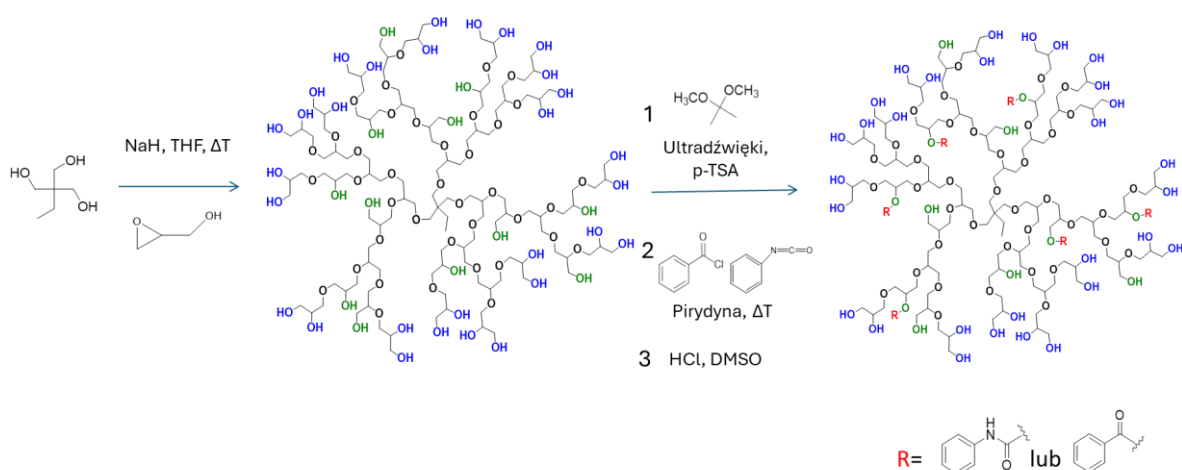
8. Wyniki własne

8.1. Hydrofobizowane hydrożele jako potencjalne nośniki leków trudno rozpuszczalnych w wodzie na przykładzie leku modelowego – klotrimazolu.

Celem pierwszego etapu prowadzonych prac syntetycznych było wytworzenie hydrofobizowanych hydrożeli przy użyciu hiperrozgałęzionego poliglicydolu o różnym stopniu hydrofobizacji rdzenia usieciowanego kwasem borowym wbudowanym w strukturę kopolimeru poli(akrylamid-*ran*-kwas 2-akrylamidoborowy), poli(AM-*ran*-2-AAPBA). Układ taki został zaprojektowany jako potencjalny hydrożelowy nośnik leków trudno rozpuszczalnych w wodzie, a jego unikatową cechą jest wykorzystanie kwasu borowego, który w reakcji z jednostkami terminalnymi poliglicydolu może tworzyć dynamiczne węzły sieci, czyli odwracalne wiązania kowalencyjne. Przeprowadzone badania zostały opisane w artykule A1.

8.1.1. Synteza polimerów. Właściwości hydrofobizowanego hiperrozgałęzionego poliglicydolu.

Prace rozpoczęto od syntezy hiperrozgałęzionego poliglicydolu na drodze polimeryzacji anionowej glicydolu z otwarciem pierścienia, opisaną przez Sundera i współpracowników (41). W tym celu, inicjator wytworzono *in situ* w tetrahydrofuranie, stosując 1,1,1-tri(hydroksymetylo)propan, który w obecności wodoru sodu przekształcono w alkohol sodu. Po odparowaniu rozpuszczalnika rozpoczęto stopniowe wkraplanie monomeru – glicydolu. Jako że szybkość wkraplania monomeru do reaktora warunkuje rozrzut ciężaru cząsteczkowego otrzymanego polimeru, dodawanie glicydolu wykonuje się powoli. Dodatkowo dzięki powolnemu wkraplaniu monomeru do mieszaniny reakcyjnej, utrzymuje się kontrolę nad liczbą centrów aktywnych w mieszaninie, a co za tym idzie ogranicza się powstawanie form cyklicznych poliglicydolu jako produktów ubocznych (41). Polimeryzację prowadzono przez 24 godziny. Następnie zsyntezowany polimer został oczyszczony poprzez dwukrotne wytrącenie do acetonu oraz dializę wobec wody. Analizę otrzymanego polimeru wykonano przy użyciu spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego ^1H oraz ^{13}C oraz chromatografii żelowej.



Rysunek 4. Schemat przedstawiający poszczególne etapy reakcji prowadzących do otrzymania amfifilowego hiperrozgałęzionego poliglicydolu.

Mając na uwadze konieczność otrzymania amfifilowych cząsteczek hiperrozgałęzionego poliglicydolu rozpuszczalnych w wodzie z hydrofobowym rdzeniem, niezbędne było zabezpieczenie grup 1,2-diolowych w jednostkach terminalnych. Dzięki takiemu działaniu reakcja modyfikacji grup hydroksylowych ugrupowaniami hydrofobowymi przebiegała wyłącznie na grupach monohydroksylowych w jednostkach liniowych ($L_{1,3}$ oraz $L_{1,4}$) zlokalizowanych we wnętrzu makrocząsteczki.

Zabezpieczenia grup diolowych dokonano poprzez reakcję hiperrozgałęzionego poliglicydolu z 2,2-dimetoksypropanem w obecności kwasu para-toluenosulfonowego, który pełnił funkcję katalizatora reakcji – rysunek 4. Zablokowanie grup diolowych w powłoce HbPGL potwierdzono za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego ^{13}C z odsprężaniem protonów (INVGATE) na podstawie integracji sygnału przy 63,5 ppm, który odpowiada przesunięciu chemicznemu węgla obecnego w diolowych grupach terminalnych.

Stosując różne ilości chlorku benzoylowego lub izocyjanianu fenylu otrzymano bibliotekę HbPGL o różnym stopniu modyfikacji. Udział jednostek hydrofobowych określono na podstawie widm ^1H NMR dokonując porównania integracji sygnałów odpowiadających wprowadzonym grupom hydrofobowym (przy 7,30-8,10 dla pochodnej estrowej – tabela 1. i przy 6,75-7,60 ppm dla pochodnej uretanowej – tabela 2.) do sygnałów odpowiadającym przesunięciom chemicznym protonów w grupie acetalowej w jednostkach terminalnych (przy 1,15-1,35 ppm). Następnie dokonano odblokowania jednostek terminalnych w obecności kwasu solnego – rysunek 4.

Tabela 1. Charakterystyka hiperrozgałęzionego poliglicydolu modyfikowanego grupami fenyłowymi wprowadzonymi za pomocą wiązań estrowych.

Polimer	Udział molowy zhydrofobizowanych jednostek L _{1,3} i L _{1,4} [mol.%]	Udział molowy zhydrofobizowanych jednostek w polimerze [%]	Liczba grup hydrofobowych przypadająca na jedną makrocząsteczkę	Rozpuszczalność w wodzie w temperaturze pokojowej	T _g , °C (DSC)
HbPGL_BE4	4,1	1,6	2	rozpuszczalny	-24,7
HbPGL_BE15	14,8	5,9	6	rozpuszczalny	-26,4
HbPGL_BE20	20,4	8,2	8	rozpuszczalny	-22,3
HbPGL_BE27	27,5	11	12	rozpuszczalny	-16,8
HbPGL_BE37	37,2	14,9	16	rozpuszczalny	-18,7
HbPGL_BE49	49,4	19,8	21	rozpuszczalny	-10,2
HbPGL_BE58	57,6	23	24	rozpuszczalny	-3,6
HbPGL_BE74	74,1	29,6	31	ograniczona rozpuszczalność	1,7
HbPGL_BE81	81,1	32,4	34	ograniczona rozpuszczalność	0,4

Tabela 2. Charakterystyka hiperrozgałęzionego poliglicydolu modyfikowanego grupami fenyłowymi wprowadzonymi za pomocą wiązań uretanowych.

Polimer	Udział molowy zhydrofobizowanych jednostek L _{1,3} i L _{1,4} [mol.%]	Udział molowy zhydrofobizowanych jednostek w polimerze [%]	Liczba grup hydrofobowych przypadająca na jedną makrocząsteczkę	Rozpuszczalność w wodzie w temperaturze pokojowej	T _g , °C (DSC)
HbPGL_PC4	3,9	1,6	2	rozpuszczalny	-20,2
HbPGL_PC16	16,3	6,5	7	rozpuszczalny	-16,6
HbPGL_PC31	31,3	12,5	13	rozpuszczalny	-8,2
HbPGL_PC55	55	22	24	ograniczona rozpuszczalność	8,6
HbPGL_PC82	82,2	32,9	34	nierozpuszczalny	25

Dodatkowe potwierdzenie modyfikacji liniowych jednostek polimeru zostało dokonane za pomocą ^{13}C NMR z odsprzęgnięciem protonów (INVGATE) poprzez porównanie integracji sygnałów pochodzących od atomów węgla jednostek dendrytycznych w zakresie 78,61 – 78,31 ppm dla pochodnej estrowej lub 79,41-79,13 ppm dla pochodnej uretanowej do sygnałów pochodzących od atomów węgla jednostek terminalnych przy 63,53 ppm dla pochodnej estrowej lub 64,34 ppm dla pochodnej uretanowej. W ten sposób potwierdzono również, że modyfikacja została przeprowadzona jedynie na liniowych jednostkach $L_{1,3}$ oraz $L_{1,4}$ pozostawiając jednostki terminalne w nienaruszonym stanie. Co więcej, analiza widm ^1H DOSY NMR ujawniła porównywalne wartości współczynników dyfuzji protonów grup fenylowych i protonów pochodzących od łańcucha polieterowego HbPGL, co świadczy o powodzeniu przeprowadzonej modyfikacji.

Kopolimer akrylamidowy kwasu 2-akrylamidofenyloborowego poly(AM-*ran*-2-AAPBA) otrzymano w wyniku kopolimeryzacji rodnikowej akrylamidu (AM) z estrem pinakolowym kwasu akrylamidofenyloborowego (2-AAPBA) inicjowanej α,α -azobis(izobutyronitrylem) (AIBN). Efektem przeprowadzonej reakcji było otrzymanie liniowych makrocząsteczek o udziale molowym merów akrylamidowych do jednostek merowych posiadających grupy kwasu borowego 90:10.

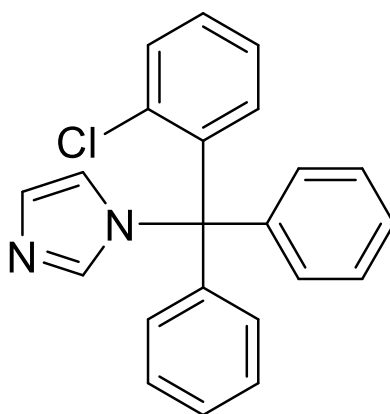
8.1.2. Właściwości otrzymanych amfifilowych polimerów na bazie hiperrozgałęzionego poliglicydolu

Wstępna analiza właściwości otrzymanych polimerów (tabela 1 i tabela 2) ujawniła, że pochodne uretanowe amfifilowego HbPGL są słabiej rozpuszczalne w wodzie niż pochodne estrowe. Wyniki skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC) pokazały, że wraz ze wzrostem stopnia hydrofobizacji makrocząsteczek HbPGL rośnie temperatura zeszklenia otrzymanego polimeru, przy czym znacznie wyraźniejsze różnice obserwowano dla pochodnej uretanowej. Wy tłumaczyć można to faktem, że znajdujące się w strukturze polimeru ugrupowanie uretanowe może tworzyć wiązania wodorowe wewnątrz- i międzycząsteczkowe z innymi ugrupowaniami uretanowymi, ale również z grupami hydroksylowymi i eterowymi, w które hiperrozgałęziony poliglicydol jest bogaty, a tworzenie się tych wiązań jest preferowane w zakresie niskich temperatur (55). Prowadzić to może do ograniczenia ruchów segmentów łańcucha polimeru, co skutkuje usztywnieniem makrocząsteczek, a to przekłada się na wyższą temperaturę zeszklenia polimeru. Obserwowana właściwość może wskazywać na znaczący

wpływ grup uretanowych obecnych w makrocząsteczkach na właściwości otrzymanych z nich hydrożeli.

8.1.3. Enkapsulacja klotrimazolu w strukturze HbPGL. Profil uwalniania leku.

Biorąc pod uwagę główny cel badań wykonano enkapsulację modelowego leku trudno rozpuszczalnego w wodzie. Do tego celu wybrano klotrimazol, który należy do grupy związków azolowych i jest lekiem o szerokim zastosowaniu przeciwgrzybicznym (56). W jego strukturze znajdują się trzy pierścienie aromatyczne oraz pierścień imidazolowy – rysunek 5. Klotrimazol jest bardzo trudno rozpuszczalny w wodzie, jego rozpuszczalność wynosi 0,49 µg/ml (57). Pomimo to jest powszechnie stosowany w leczeniu grzybicy pochwy w formach kremów, tabletek, globulek i maści (24,27). Udowodniono również jego działanie przeciwnowotworowe (58), jednak ze względu na bardzo słabą rozpuszczalność w wodzie lek ten nie jest stosowany w chemioterapii (59). Niestety ograniczona rozpuszczalność klotrimazolu, definiuje jego ograniczoną biodostępność, w związku z tym lek ten w terapiach przeciwgrzybiczych musi być podawany wielokrotnie i przez dłuższy czas, co w efekcie może prowadzić do wytworzenia oporności szczepów *Candida* wobec tego leku. W celu zwiększenia efektywności leczenia zapalenia pochwy o podłożu grzybicznym, ale również w terapiach przeciwnowotworowych, konieczne jest wytworzenie nośnika klotrimazolu, który wyeliminuje problem jego ograniczonej rozpuszczalności w wodzie, zapewniając większą biodostępność tego leku w hydrofilowym środowisku pochwy. Do tej pory udało się dokonać tego poprzez wykorzystanie amfifilowego kopolimeru o budowie gwieździstej (59). Enkapsulacja klotrimazolu w amfifilowy polimer typu gwiazda wpłynęła pozytywnie na właściwości klotrimazolu, to znaczy udało się zwiększyć jego rozpuszczalność w wodzie, co skutkowało jego wyższą biodostępnością i selektywnym działaniem przeciwnowotworowym. Z tego też względu postanowiono przeprowadzić próbę enkapsulacji klotrimazolu w strukturę amfifilowego hiperrozgałęzionego poliglicydolu.



Rysunek 5. Budowa chemiczna klotrimazolu.

Sprawdzono wpływ procesu hydrofobizacji rdzenia HbPGL na enkapsulację leku trudno rozpuszczalnego w wodzie. W tym celu porównano wydajności enkapsulacji klotrimazolu w amfifilowych pochodnych HbPGL oraz w HbPGL niepoddanym modyfikacji. Enkapsulację wykonano metodą odparowania rozpuszczalnika (metanol) z mieszaniny polimeru z lekiem, która została poddana działaniu ultradźwięków. Wyniki przeprowadzonego eksperymentu przedstawiono w tabeli 3.

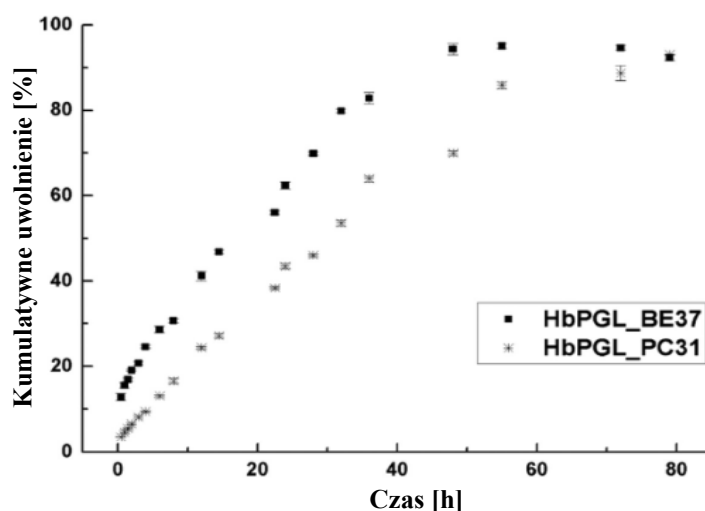
Tabela 3. Stopień enkapsulacji oraz wydajność enkapsulacji klotrimazolu wewnątrz otrzymanych polimerów na bazie hiperrozgałęzionego poliglicydolu o hydrofobizowanym rdzeniu grupami fenyłowymi wprowadzonymi przy użyciu wiązań estrowych lub uretanowych.

Polimer	Stopień enkapsulacji [mg/g]	Wydajność enkapsulacji [%]
HbPGL_BE4	2,1	0,3
HbPGL_BE15	2,95	0,5
HbPGL_BE27	10,4	2,6
HbPGL_BE37	210	55
HbPGL_BE49	259	71,4
HbPGL_BE58	473	88,8
HbPGL_BE74	Próbka niefiltrowalna	-
HbPGL_BE81	Próbka niefiltrowalna	-
HbPGL_PC4	0,48	0,1
HbPGL_PC16	3,5	0,8
HbPGL_PC31	386	67,2
HbPGL_PC55	Próbka niefiltrowalna	-

Próba enkapsulacji klotrimazolu w makrocząsteczkach niemodyfikowanego HbPGL zakończyła się niepowodzeniem, to znaczy nie udało się zaenkapsulować cząsteczek leku w ich strukturze. W przypadku eksperymentów przeprowadzonych przy użyciu hydrofobizowanych

hiperrozgałęzionych poliglicydoli wykazano, że obecność grup hydrofobowych w rdzeniu polimeru umożliwia zakotwiczenie cząsteczek leku w jego strukturze. Dodatkowo, przeprowadzona enkapsulacja pokazała, że makrocząsteczki poliglicydolu hydrofobizowane grupami fenyłowymi wprowadzonymi poprzez wiązania uretanowe mają większe powinowactwo do cząsteczek klotrimazolu niż pochodne estrowe. Zaobserwowano również, że w przypadku polimerów o stopniu modyfikacji grup monohydroksylowych powyżej 30%, enkapsulacja leku była dużo efektywniejsza niż w przypadku pochodnych HbPGL o niższym stopniu podstawienia.

Przeprowadzono również test uwalniania klotrimazolu ze struktury polimeru na przykładzie wybranych pochodnych (HbPGL_BE37 oraz HbPGL_PC31). Wykonany eksperyment udowodnił, że oba systemy wykazują stopniowe uwalnianie leku, przy czym dla pochodnej estrowej (HbPGL_BE37) zaobserwowano szybki wyrzut pierwszej dawki klotrimazolu, to znaczy po pół godzinie prowadzenia eksperymentu uwolnione zostało około 15% zaenkapsulowanego leku (rysunek 6). Wynik ten dodatkowo potwierdza silniejsze powinowactwo hydrofobowego klotrimazolu do pochodnej uretanowej HbPGL niż pochodnej estrowej.



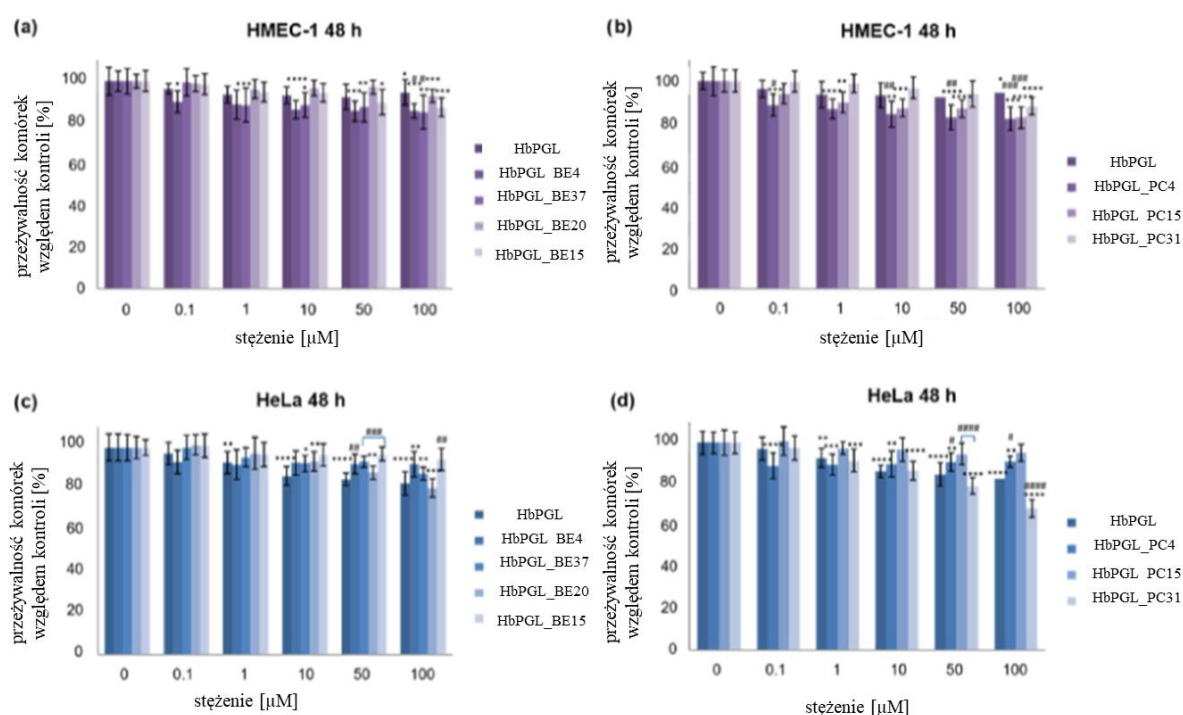
Rysunek 6. Przykładowe profile uwalniania klotrimazolu ze struktury amfifilowego polimeru. [zaczepnięte z A1]

8.1.4. Cytotoksyczność hydrofobizowanego hiperrozgałęzionego poliglicydolu o różnym stopniu podstawienia grup monohydroksylowych

Mając na uwadze wykorzystanie otrzymanych polimerów do wytwarzania hydrofobizowanych hydrożelowych nośników leków do terapii ginekologicznej wykonano testy cytotoksyczności zsyntetyzowanych struktur wobec komórek prawidłowych oraz

nowotworowych, stosując odpowiednio linię ludzkich komórek śródbłonka mikronaczyniowego skóry, HMEC (z ang. *Human Microvascular Endothelial Cells*) oraz linię ludzkich komórek śródbłonka raka szyjki macicy, HeLa (z ang. *Human Cervical Cancer Endothelial Cells*).

Eksperymenty przeprowadzono dla polimeru niemodyfikowanego oraz polimerów modyfikowanych grupami fenylowymi wprowadzonymi poprzez wiązania estrowe oraz uretanowe, o różnym stopniu podstawienia. Przeprowadzone testy wykazały, że nawet zastosowanie wysokiego stężenia polimeru, to jest 100 μM , nie wpłynęło znacząco na przeżywalność komórek, nawet po 48 h inkubacji – rysunek 7. Wynik ten udowadnia, że otrzymane amfifilowe polimery mogą potencjalnie być wykorzystywane jako nośniki leków.

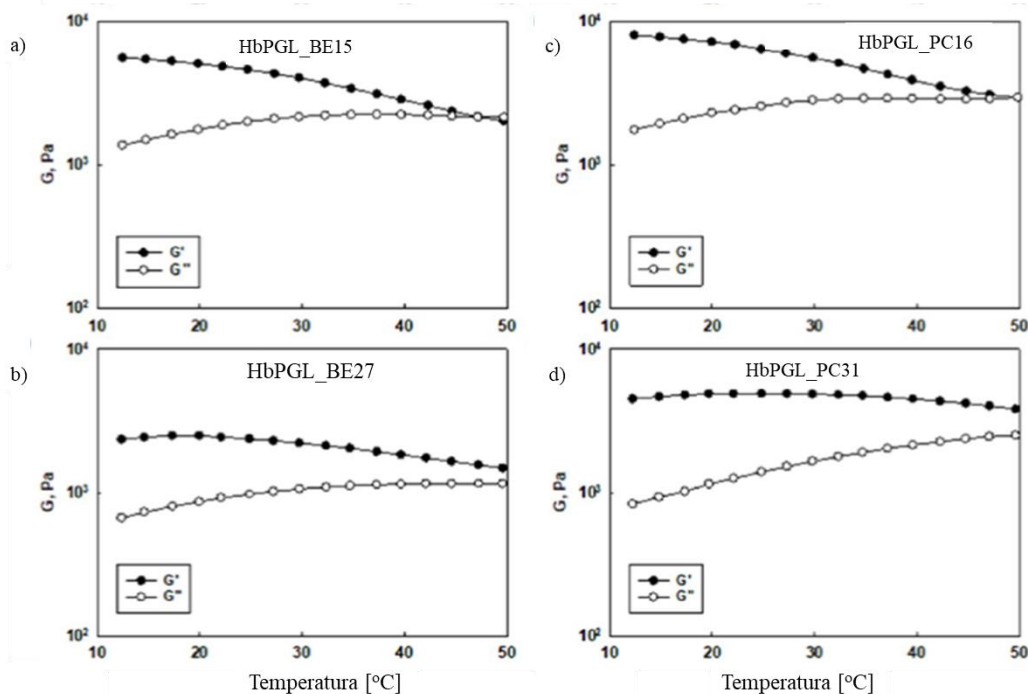


Rysunek 7. Cytotoksyczność wodnych roztworów hHbPGL z grupami hydrofobowymi wprowadzonymi poprzez wiązania estrowe (a) oraz uretanowe (b) wobec komórek prawidłowych oraz hydrofobizowanych za pomocą wiązań estrowych (c) oraz uretanowych (d) wobec komórek nowotworowych. [zaczepnięte z A1]

8.1.5. Synteza i charakterystyka reologiczna hydrofobizowanych hydrożeli utworzonych na zasadzie odwracalnych węzłów sieci.

Hydrofobizowane hydrożele o dynamicznych węzłach sieci wytworzono mieszając mechanicznie wodne roztwory hiperrozgałęzionego poliglicydolu (55 mg w 150 μl) o różnych stopniach hydrofobizacji i kopolimeru akrylamidowego (49,5 mg w 200 μl). Reakcja tworzenia się odwracalnych wiązań kwasu borowego z 1,2-diolami w jednostkach terminalnych HbPGL przebiega zgodnie ze schematem na rysunku 3. Reakcja, w wyniku której otrzymywany jest ester kwasu borowego jest procesem egzotermicznym (60,61). W związku z tym wzrost

temperatury otoczenia takiego żelu prowadzi do przesunięcia się równowagi reakcji w stronę substratów, czyli dochodzi do niszczenia wiązań estrowych i rozpadu sieci. Oznacza to, że otrzymany hydrożel jest wrażliwy na zmiany temperatury otoczenia.

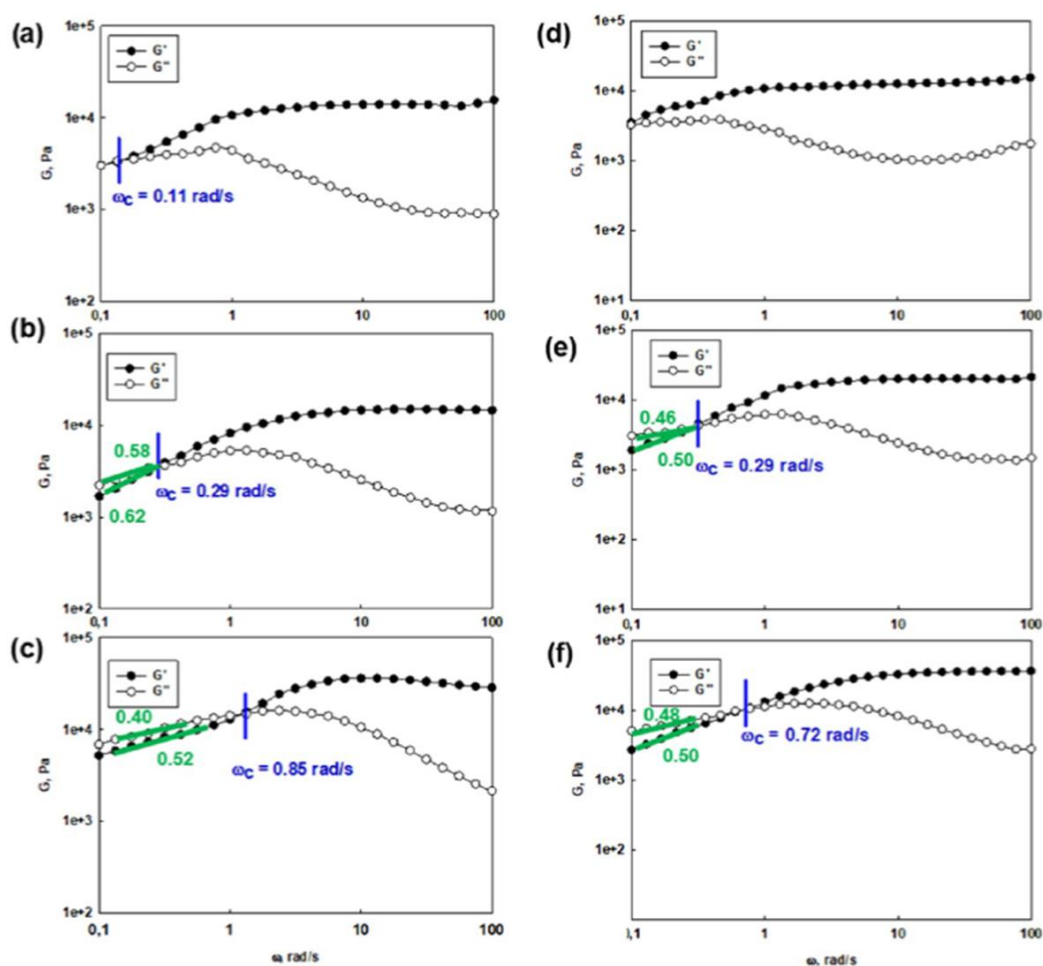


Rysunek 8. Zależność modułów stratności i zachowawczego od temperatury na przykładzie hydrożeli zbudowanych z HbPGL_BE15 (a), HbPGL_BE27 (b), HbPGL_PC16 (c) oraz HbPGL_PC31 (d). [zaczepnięte z A1]

Sieci polimerowe otrzymywano jedynie z hydrofobizowanych HbPGL, które były rozpuszczalne w wodzie, do tego celu wybrano HbPGL o stopniu podstawienia grup monohydroksylowych: od 4 do 37 i od 4 do 55 odpowiednio dla pochodnych estrowych i uretanowych. Wytworzone żele poddano badaniom reologicznym. W pierwszej kolejności wykonano eksperyment w trybie przemiatania temperaturą. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że wzrost stopnia hydrofobizacji konstytucyjnych jednostek liniowych HbPGL prowadzi do zwiększenia stabilności sieci polimerowej. W przypadku żeli zbudowanych z hiperrozgałęzionego poliglicydolu o stopniu modyfikacji grup monohydroksylowych wyższym niż 30% zaobserwowano stabilność sieci polimerowej w szerokim zakresie temperatur, to jest 10 – 50 °C – rysunek 8. Oznacza to, że wraz ze wzrostem hydrofobowości polimeru dochodzi do stabilizacji sieci hydrożelowej w wyniku dodatkowych mechanizmów sieciowania, najprawdopodobniej związanych z asocjacją hydrofobowych fragmentów *h*HbPGL. Dodatkowo, wykonane pomiary pokazują, że wraz ze wzrostem stopnia hydrofobizacji konstytucyjnych jednostek liniowych HbPGL rosną wartości modułów zachowawczego i stratności w niskich temperaturach, co świadczy o dominującym udziale

właściwości ciała stałego w przypadku hydrożeli zbudowanych z amfifilowego HbPGL niż było to obserwowane dla żeli zbudowanych z niemodyfikowanego hiperrozgałęzionego poliglicydolu.

Pomiary przemiatania częstością wykazały, że wszystkie analizowane próbki w badanym zakresie wykazują właściwości lepkosprężyste. Zaobserwowano, że w przypadku pomiarów dla wysokich częstości, a co za tym idzie krótszych czasów, moduł zachowawczy przewyższa wartościami moduł stratności, co bezpośrednio wynika z czasów życia estrów borowych, które są dłuższe niż zastosowana szybkość odkształcenia. W momencie, gdy częstość przykładanego odkształcenia zmniejsza się, moduł stratności zaczyna przewyższać moduł zachowawczy, a próbka zaczyna płynąć. Punkt przecięcia się modułów opisywany symbolem ω_c , określany jest w literaturze jako punkt żelowania (62).



Rysunek 9. Zależność modułów zachowawczego i stratności od częstości przykładanego odkształcenia dla hydrofobizowanych hydrożeli na bazie amfifilowego hiperrozgałęzionego poliglicydolu w temperaturach 10, 25 oraz 40°C przedstawiona na przykładzie HbPGL_BE37 – a), b), c) – oraz HbPGL_PC55 – d), e), f).
[zaczepnięte z A1]

Zauważono, że w przypadku hydrożeli zbudowanych z HbPGL wyższy stopień hydrofobizacji konstytucyjnych jednostek liniowych prowadził do otrzymania wyższych

wartości punktu żelowania – rysunek 9. Warto zaznaczyć, że spadek wartości punktu żelowania jest bezpośrednio związany z czasem relaksacji makrocząsteczek zaangażowanych w tworzenie sieci hydrożelowej zgodnie z równaniem:

$$\omega_c = \frac{1}{2 \cdot \pi \cdot \tau_R},$$

gdzie: τ_R odpowiada czasowi relaksacji makrocząsteczek w sieci polimerowej (63). Dłuższe czasy relaksacji makrocząsteczek w sieci hydrożelowej na bazie hydrofobizowanego HbPGL w porównaniu do wartości obserwowanych w przypadku żeli zbudowanych z niemodyfikowanego HbPGL świadczą o obecności dodatkowych – oprócz wiązań estrowych kwasu borowego – mechanizmów odpowiadających za tworzenie sieci polimerowej.

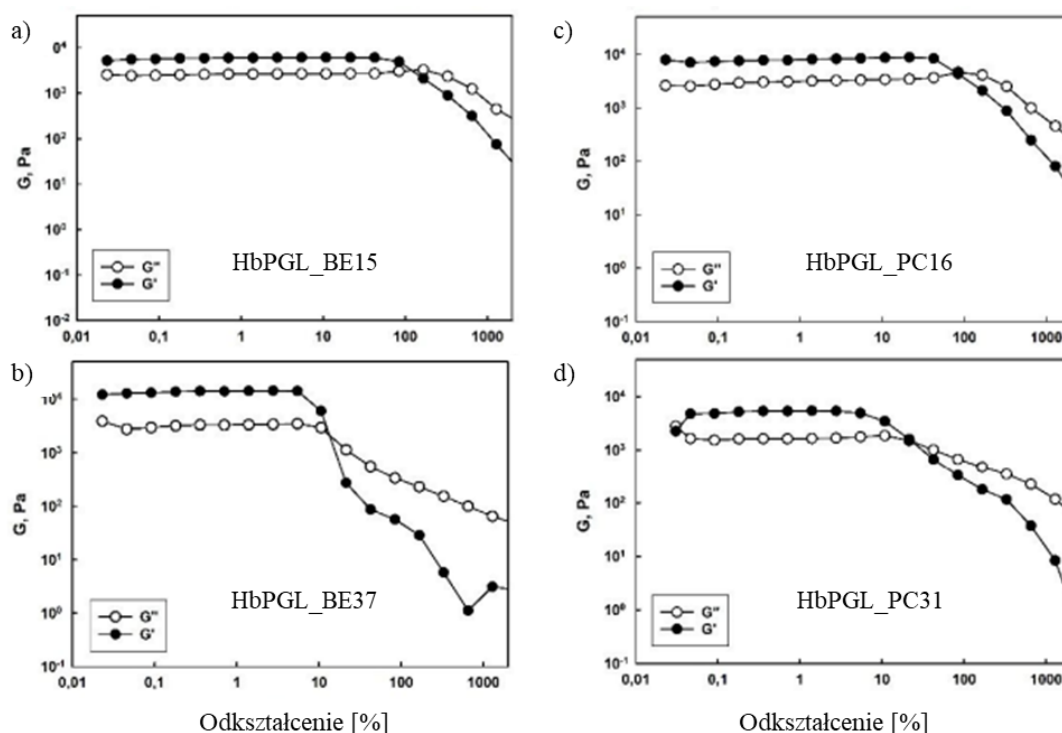
Porównując wartości punktu żelowania dla przebadanych hydrożeli zbudowanych z hiperrozgałęzionego poliglicydolu hydrofobizowanego w podobnym stopniu grupami fenyłowymi poprzez wiązania estrowe oraz uretanowe zauważono, że wartości punktów żelowania są do siebie zbliżone. Oznacza to, że na wartość punktu żelowania nie miał wpływu rodzaj zastosowanego wiązania do wprowadzenia grupy aromatycznej do rdzenia HbPGL, a raczej liczba wprowadzonych grup fenyłowych. Można zatem wnioskować, że wiązania wodorowe pomiędzy grupą uretanową/estrową i grupami eterowymi i hydroksylowymi HbPGL najprawdopodobniej nie mają decydującego wpływu na tworzenie się dodatkowych węzłów sieci. Wpływ na właściwości reologiczne otrzymanych żeli mają natomiast oddziaływania hydrofobowe, w które zaangażowane są pierścienie fenyłowe.

Dodatkowym potwierdzeniem występowania więcej niż jednego mechanizmu sieciowania jest fakt, że w badaniach przemiatania częstością moduł zachowawczy nie przecina modułu stratności w jego najwyższych wartościach (36). Efekt ten obserwowano we wszystkich otrzymanych żelach, jednak w przypadku hydrożeli utworzonych z HbPGL o hydrofobizowanym wnętrzu, był on bardziej widoczny. Oznacza to, że w przypadku żeli przygotowanych z niemodyfikowanego hiperrozgałęzionego poliglicydolu również istnieje więcej niż jeden mechanizm sieciowania. Oprócz mechanizmu sieciowania chemicznego występuje również mechanizm fizyczny, to jest występowanie splątania fizycznych łańcucha polimerowego. Ze względu na niską masę molową HbPGL należy odrzucić występowanie splątania między cząsteczkami HbPGL (64). Za prawdopodobne uznano występowanie splątania fizycznych pomiędzy wysocząsteczkowymi liniowymi łańcuchami kopolimeru akrylamidowego niosącego ugrupowania kwasu borowego.

Przeprowadzone testy przemiatania odkształceniem wykazały, jak znaczący wpływ na właściwości reologiczne ma stopień hydrofobizacji makrocząsteczek, z których zbudowane

są żele. Wartość odkształcenia przy której dochodziło do degradacji sieci polimerowej była tym mniejsza, im wyższy był stopień hydrofobizacji użytego HbPGL do przygotowania żeli. Różnice te ujawniają się w wynikach testów reologicznych w trybie przemiatania odkształceniem dla otrzymanych hydrożeli – rysunek 10. W przypadku hydrożeli zbudowanych na bazie hiperrozgałęzionego poliglicydolu o stopniu hydrofobizacji około 15% odkształcenie, przy którym dochodziło do rozpadu sieci wynosiło 100%. Natomiast w przypadku hydrożeli zbudowanych z *h*HbPGL o wyższym stopniu podstawienia grup monohydroksylowych niż 30%, wartość odkształcenia konieczna do rozpadu sieci wynosiła tylko 10%.

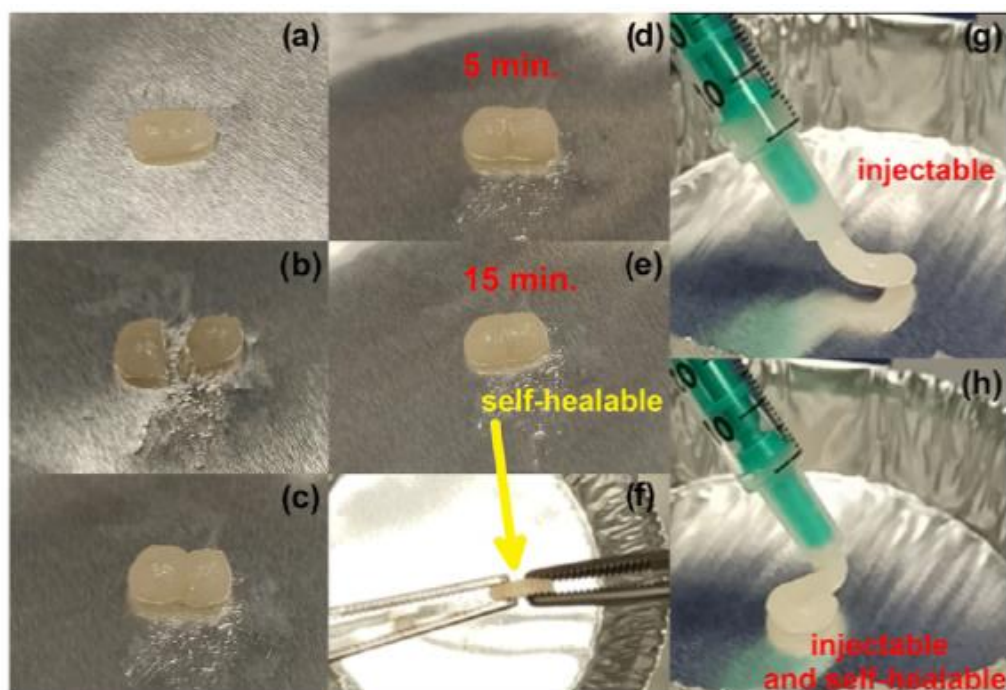
Taki wynik świadczy o znaczącym wpływie oddziaływań hydrofobowych pomiędzy pierścieniami fenyłowymi na właściwości reologiczne otrzymanych hydrożeli. Oznacza to, że dodatkowe węzły sieci w postaci oddziaływań między pierścieniami fenyłowymi ograniczają swobodne ruchy makrocząsteczek w strukturze sieci, a co za tym idzie zmniejszają możliwość szybkiej odbudowy struktury sieci w wyniku dynamicznych wiązań estrowych kwasu borowego.



Rysunek 10. Zależność modułów zachowawczego i stratności od odkształcenia dla hydrofobizowanych hydrożeli na bazie amfifilowego hiperrozgałęzionego poliglicydolu na przykładzie żeli otrzymanych z HbPGL_BE15 (a), HbPGL_BE37 (b), HbPGL_PC16 (c) oraz HbPGL_PC31 (d). [zaczepnięte z A1]

Wykonano również próby samonaprawy (z ang. *self-healing properties*) otrzymanych hydrożeli oraz sprawdzono, czy otrzymane sieci polimerowe nadają się do zaaplikowania przy użyciu strzykawki. W tym celu przygotowano hydrofobizowany hydrożel, przecięto go na dwie części, a następnie ułożono je obok siebie i pozostawiono do obserwacji, przygotowany

hydrożel wprowadzono również do strzykawki i wykonano próbę wystrzyknięcia. Przeprowadzone analizy wykazały, że każdy z wytworzonych hydrożeli nadaje się do aplikacji poprzez strzykawkę, natomiast właściwości samonaprawy ściśle zależą od stopnia hydrofobizacji hiperrozgałęzionego poliglicydolu użytego do wytworzenia hydrożelu. Żele utworzone z wysoko hydrofobizowanego HbPGL, na przykład żel na bazie HbPGL_PC55, nie wykazywały możliwości samoistnego naprawiania się w przeciwieństwie do żeli zbudowanych z hiperrozgałęzionego poliglicydolu o niższym stopniu podstawienia grup monohydroksylowych, np. na bazie HbPGL_PC31 – rysunek 11. Wskazuje to na fakt, że wraz ze wzrostem stopnia hydrofobizacji HbPGL wzrasta udział oddziaływań hydrofobowych w tworzenie się sieci, co skutkuje zmniejszeniem roli wiązań estrowych kwasu borowego, które miały zapewnić samonaprawę struktury żelu.



Rysunek 11. Wizualne potwierdzenie możliwości samonaprawy struktury hydrożelu oraz możliwość aplikacji przy użyciu strzykawki otrzymanego hydrofobizowanego hydrożelu na bazie HbPGL_PC31. Żel przygotowany do eksperymentu (a), żel podzielony na dwie części (b), połączenie dwóch części żelu (c), wygląd żelu po 5 minutach (d), wygląd żelu po 15 minutach (e), odtworzenie się sieci polimerowej (f), próba wystrzyknięcia hydrożelu ze strzykawki (g,h). [zaczepnięte z A1]

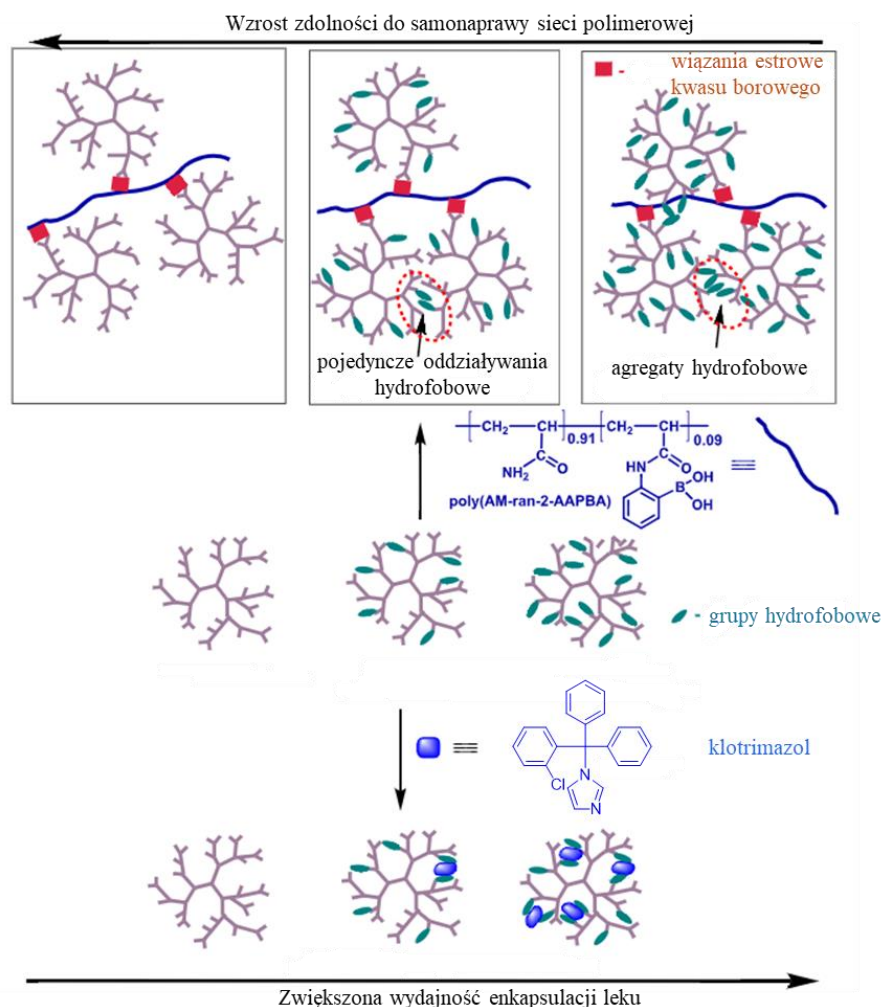
8.1.6. Podsumowanie i wnioski

Podsumowując, do najważniejszych osiągnięć tej części pracy zaliczyć należy opracowanie metody syntezy amfifilowego hiperrozgałęzionego poliglicydolu, rozwiązanie problemu ograniczonej rozpuszczalności silnie hydrofobowego leku w wodzie, poprzez jego enkapsulację w strukturze otrzymanych makrocząsteczek, utworzenie hydrożelu zbudowanego z wykorzystaniem dynamicznych węzłów sieci oraz poznanie jego właściwości reologicznych.

Przeprowadzone badania rzuciły światło na możliwości tworzenia hydrożeli zbudowanych z hydrofobizowanego HbPGL, które potencjalnie mogą być wykorzystywane jako nośnik leków hydrofobowych. Zaobserwowano znaczący wpływ wyboru podstawnika, a także wiązania, przez które podstawnik zostaje wprowadzony do rdzenia HbPGL, na zdolność enkapsulacji leku trudno rozpuszczalnego w wodzie, ale również na właściwości reologiczne otrzymanych z *h*HbPGL hydrożeli – rysunek 12.

Przeprowadzone analizy pozwoliły określić, że w przypadku enkapsulacji klotrimazolu, który jest lekiem silnie hydrofobowym, spośród przygotowanych polimerów najlepiej sprawdzą się pochodne uretanowe, ze względu na silniejsze powinowactwo do tego leku. Badania reologiczne pokazały przewagę pochodnej HbPGL_PC31 nad pochodną HbPGL_PC55. Dzięki zastosowaniu niższego stopnia podstawienia grup monohydroksylowych w cząsteczce oddziaływania hydrofobowe między pierścieniami aromatycznymi nie zdominowały oddziaływań estrów kwasu borowego, dzięki czemu hydrożele utrzymały zdolność do samonaprawy, przy jednoczesnym osiągnięciu stabilnej sieci polimerowej w szerokim zakresie temperatur.

Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki badań wyłoniono optymalną strukturę hydrożelu zbudowaną z hydrofobizowanego HbPGL do dopochwowej terapii ginekologicznej. Hydrożel nadawał się do dozowania w miejsce chorobowo zmienione na drodze wstrzyknięcia oraz wykazywał zdolność do samonaprawy.



Rysunek 12. Schemat przedstawiający wpływ hydrofobizacji na właściwości otrzymanych makrocząsteczek i hydrożeli z nich wytworzonych.

8.2. Wodne formulacje na bazie hydrofobizowanego hiperrozgałęzionego poliglicydotu i klotrimazolu o działaniu przeciwgrzybicznym

Przeprowadzone próby enkapsulacji modelowego leku hydrofobowego – klotrimazolu – w strukturze HbPGL o znacznym stopniu hydrofobizacji grupami fenyłowymi ujawniły tendencję tego polimeru do agregacji, tworząc konstrukty nie dające się przefiltrować przez filtr strzykawkowy (wielkość porów 0,8 μm). Możliwość wytworzenia stabilnych formulacji o prostym składzie wydaje się być intrygująca w kontekście wytwarzania wodnych nośników leków trudno rozpuszczalnych w wodzie do podawania dopochwowego. Przeprowadzone badania zostały opisane w artykule A2.

8.2.1. Przygotowanie wodnych formulacji polimeru z lekiem

W celu wykonania badań przeprowadzono syntezę hiperrozgałęzionego poliglicydotu, który następnie poddano modyfikacjom mającym na celu uzyskanie konstruktów o wysokim

stopniu hydrofobizacji. W efekcie otrzymano trzy pochodne amfifilowych polimerów o wysokim stopniu podstawienia grup monohydroksylowych: pochodną estrową, dla której 57% liniowych grup monohydroksylowych przereagowało – BE57, oraz dwie pochodne uretanowe: fenyłową, dla której stopień podstawienia był równy 66% - PC66 i bifenyłową o stopniu hydrofobizacji wewnętrznych grup monohydroksylowych równym 40% - BPh40 – tabela 4.

Tabela 4. Charakterystyka otrzymanych pochodnych hiperrozgałęzionego poliglicydołu.

Hydrofobizowany HbPGL	Udział molowy jednostek monohydroksylowych modyfikowanych jednostkami hydrofobowymi [%]	Liczba grup hydrofobowych przypadająca na jedną makrocząsteczkę
BE57	57	35
PC66	66	41
BPh40	40	24

Wcześniejsze badania pokazały, że możliwe jest wytworzenie „dynamicznych” hydrożeli na bazie hydrofobizowanego przy użyciu grup fenyłowych HbPGL o niższym stopniu podstawienia grup monohydroksylowych do potencjalnego transportu klotrimazolu, jednak konieczne do tego celu jest wykorzystanie środka sieciującego (29). Jednak, enkapsulacja klotrimazolu w struktury o wyższej hydrofobowości powoduje znaczny wzrost lepkości otrzymanych formułacji.

Zdecydowano się również na przetestowanie większego aromatycznego hydrofobowego podstawnika do wytworzenia pochodnej bifenyłowej wprowadzonego poprzez ugrupowanie uretanowe. Przedstawione wcześniej wyniki badań wykazały, że obecność grup fenyłowych we wnętrzu hiperrozgałęzionego poliglicydołu wpływa korzystnie na wydajność enkapsulacji leku. Ponadto, okazało się, że wprowadzenie grup hydrofobowych poprzez wiązanie uretanowe wpływa korzystnie na efektywność procesu enkapsulacji. Wykorzystanie podstawnika zawierającego w swojej strukturze dwa pierścienie fenyłowe dawało nadzieję, na zwiększenie rozpuszczalności hydrofobowego leku w strukturze polimeru.

Zoptymalizowano proces enkapsulacji klotrimazolu w BPh40 i zaobserwowano, że w przypadku formułacji o relacji molowej polimeru do leku równej 1:32 otrzymano jednolite struktury podobne do żeli o granicy płynięcia w warunkach fizjologicznych, tj. w 37 °C. W przypadku pochodnej bifenyłowej otrzymana sucha formułacja była przezroczysta w odróżnieniu do formułacji utworzonych z udziałem pochodnych fenyłowych. Po dodaniu wody zaobserwowano, że w przypadku pochodnej bifenyłowej formułacja zachowała

przezroczystość. Pozwoliło to na wyciągnięcie wniosku, że pochodna bifenyłowa pozwala na zwiększenie rozpuszczalności klotrimazolu w wodzie. Aby ocenić możliwość tworzenia wodnych formułcji leku przygotowano układy na bazie pochodnej bifenyłowej o niższych stosunkach molowych leku do polimeru oraz z większym rozcieńczeniem – tabela 5 oraz rysunek 13.

Tabela 5. Skład chemiczny wodnych formułcji na bazie hydrofobizowanego hiperrozgałęzionego poliglicydolu.

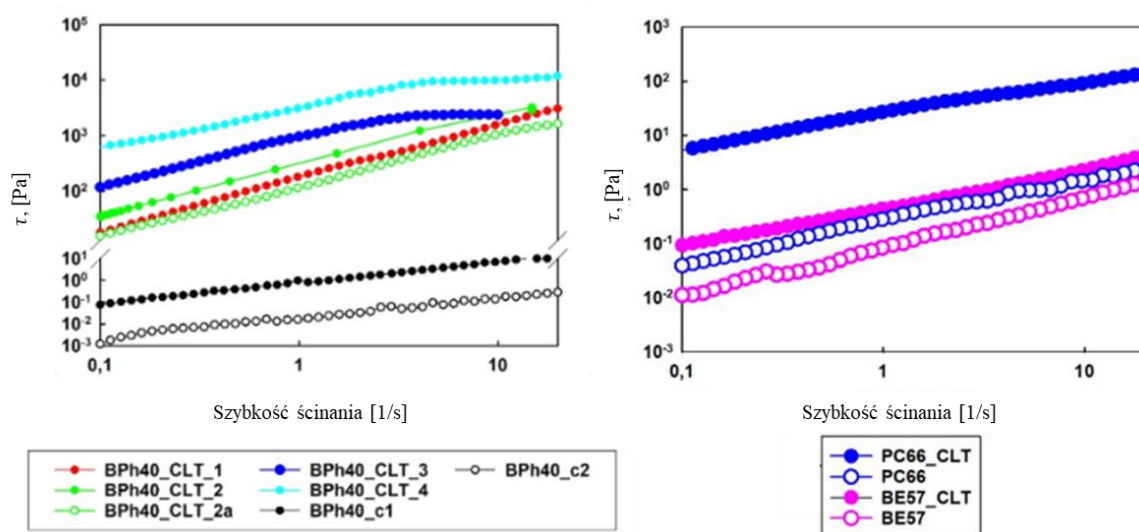
Formułcja	Stosunek molowy klotrimazolu do polimeru	m_{hHbPGL}/V_{H_2O} [g/ml]	m_{CLT}/V_{H_2O} [g/ml]
BE57_CLT	32	0,496	0,317
PC66_CLT	32	0,496	0,317
BPh40_CLT_1	8	0,496	0,093
BPh40_CLT_2	16	0,496	0,176
BPh40_CLT_2a	16	0,248	0,088
BPh40_CLT_3	24	0,496	0,248
BPh40_CLT_4	32	0,496	0,317



Rysunek 13. Zdjęcia przedstawiające wygląd suchych oraz uwodnionych formułcji polimeru z lekiem. [zaczepnięte z A2]

8.2.2. Właściwości reologiczne formułcji wodnych otrzymanych na bazie hydrofobizowanego hiperrozgałęzionego poliglicydolu z klotrimazolem

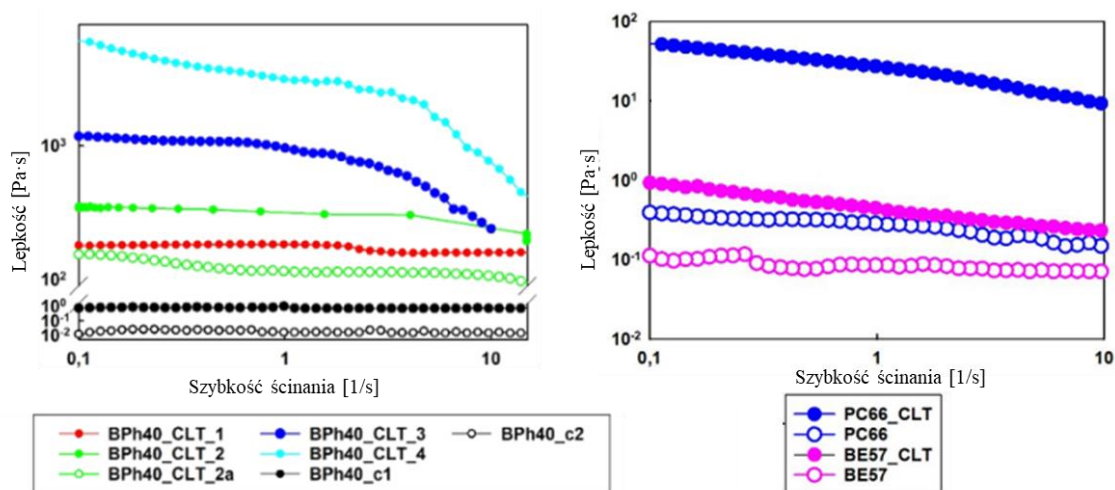
Pomiary reologiczne wykazały newtonowski charakter wodnych roztworów HbPGL hydrofobizowanego przy użyciu grup aryłowych. W wyniku enkapsulacji klotrimazolu w strukturze hydrofobizowanych HbPGL obserwuje się znaczny wzrost lepkości badanych roztworów.



Rysunek 14. Zależność naprężenia od szybkości ścinania dla wodnych formułacji amfifilowego hiperrozgałęzionego poliglicydolu z lekiem. [zaczepnięte z A2]

Przeprowadzone badania reologiczne uwodnionych formułacji klotrimazolu na bazie BE57, PC66 oraz BPh40 wykazały, że mają one właściwości cieczy nienewtonowskich, a dokładniej cieczy pseudoplastycznych lub binghamowskich (65,66)– rysunek 14. Warto zauważyć, że wszystkie przygotowane formułacje były rozrzedzane ścinaniem, co oznacza, że wraz ze wzrostem szybkości ścinania zmniejsza się ich lepkość. Właściwości te wskazują na możliwość wstrzykiwania formułacji poprzez strzykawkę lub możliwość łatwego jej rozprowadzenia na powierzchni zmienionej chorobowo. Wskazuje to na potencjał tej klasy materiałów do zastosowań w dopochwowych terapiach ginekologicznych (66).

Porównując wyniki uzyskane z testów reologicznych dla dwóch fenyłowych pochodnych: estrowej i uretanowej, znacznie wyższy wzrost lepkości wskutek enkapsulacji leku zaobserwowano dla formułacji utworzonej z pochodnej uretanowej – rysunek 15. I tak dla próbki zbudowanej z PC66 lepkość zerowa, wyznaczona poprzez ekstrapolację zależności lepkości od przyłożonej szybkości ścinania wzrosła od 0,33 Pa·s dla wodnego roztworu polimeru do aż 49,5 Pa·s dla wodnej formułacji polimer – lek. Ten sam test wykonany dla pochodnej estrowej wykazał wzrost lepkości zerowej z 0,08 Pa·s dla wodnego roztworu polimeru do jedynie 0,77 Pa·s dla wodnej formułacji na bazie BE57. W przypadku bifenyłowej pochodnej HbPGL wzrost lepkości zerowej polimeru wskutek enkapsulacji leku okazał się jeszcze wyższy. Zachowanie takie wskazuje na większą możliwość oddziaływania między grupami bifenyłowymi a cząsteczkami klotrimazolu niż ma to miejsce w przypadku pochodnych fenyłowych.



Rysunek 15. Zależność lepkości od szybkości ścinania dla wodnych roztworów polimerów oraz dla uwodnionych formułacji polimeru z lekiem. [zaczepnięte z A2]

Powyższe wyniki wskazują, że wielkość ugrupowania hydrofobowego wprowadzonego do wnętrza hiperrozgałęzionego poliglicydolu ma znaczący wpływ na oddziaływanie amfifilowego polimeru z zaenskapsulowanym klotrimazolem, a co za tym idzie w tworzenie opisywanych wodnych formułacji. Warto również zauważyć, że w przypadku pochodnej bifenyłowej (BPh40) stopień modyfikacji grup monohydroksylowych wynosi 40%, co oznacza że ilość wolnych, niezmodyfikowanych grup monohydroksylowych dostępnych w polimerze jest znacznie wyższa, niż w przypadku polimerów BE57 czy PC66. Wpływa to na możliwość zaabsorbowania większej ilości wody, przy jednoczesnym utrzymaniu stabilnej formułacji – potwierdzono to tworząc formułację o obniżonej zawartości klotrimazolu i o zwiększonej ilości wody – BPh4_CLT_2a – tabela 5.

W przypadku próbek przygotowanych z obu fenyłowych pochodnych HbPGL (BE57_CLT oraz PC66_CLT) nie obserwowano utrzymywania stabilnej konsystencji przygotowanych formułacji, takich właściwości nie zaobserwowano dla żadnej z próbek przygotowanych na bazie pochodnej bifenyłowej (BPh40). Z tego względu formułacje na bazie tego polimeru wydają się szczególnie obiecujące jako nośniki leków hydrofobowych i postanowiono poświęcić im więcej uwagi. W efekcie zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stosunku molowego leku do polimeru w badanym materiale wzrasta wartość lepkości zerowej od 183 dla BPh40_CLT_1 aż do 1080 Pa·s dla BPh40_CLT_3 w temperaturze 37 °C – tabela 6.

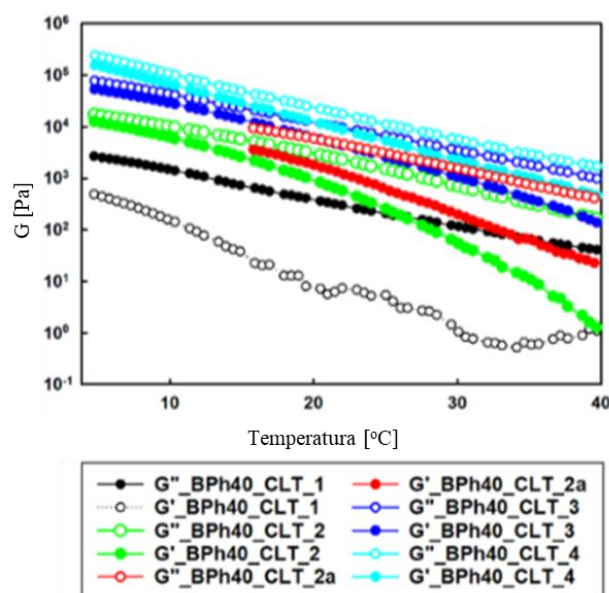
Tabela 6. Wyznaczone wartości lepkości zerowej wodnych roztworów polimerów (BE57_c1, PC66_c1, BPh40_c1 oraz BPh40_c2, gdzie c1=500mg/ml, c2=250mg/ml) oraz wodnych formułacji polimeru z lekiem oraz wartości granicy plastyczności w przypadku cieczy binghamowskich.

Wodna formułacja	Stosunek molowy klotrimazolu do polimeru	η_0 [Pa·s], w temperaturze 37 °C	τ_c [Pa], w temperaturze 37 °C
BE57_c1	0	0,08	
PC66_c1	0	0,33	
BPh40_c1	0	0,79	
BPh40_c2	0	0,03	
BE57_CLT	32	0,77	
PC66_CLT	32	49,50	
BPh40_CLT_1	8	183	
BPh40_CLT_2	16	353	2,72±0,22
BPh40_CLT_2a	16	156	2,16±0,45
BPh40_CLT_3	24	1080	13,62±0,49
BPh40_CLT_4	32		329±5,0

Badanie zależności odkształcenia od przyłożonego naprężenia ścinającego, przeprowadzone w temperaturze 25 oraz 37 °C, wykazało, że właściwości reologiczne badanych materiałów mogą być regulowane nie tylko stosunkiem leku do polimeru, ale również temperaturą. Wyznaczona wartość granicy płynięcia (z ang. *yield point*) znacząco obniża się wraz ze wzrostem temperatury pomiaru. Na przykład dla BPh40_CLT_1 wartość granicy płynięcia w temperaturze 25 °C wynosiła 76 Pa, natomiast, gdy pomiar prowadzono w temperaturze 37 °C, wartość ta wyniosła 2,7 Pa. Występowanie granicy płynięcia jest cechą charakterystyczną dla cieczy binghamowskich, dlatego przyjęto, że wodne formułacje polimeru z klotrimazolem na bazie HbPGL z liniowymi jednostkami powtarzalnymi zmodyfikowanymi grupami bifenyłowymi są cieczami binghamowskimi. Natomiast formułacje na bazie obu pochodnych fenyłowych HbPGL, to jest estrowej i uretanowej, które nie wykazywały granicy płynięcia w badanym zakresie parametrów pomiarowych uznano za ciecze pseudoplastyczne.

Warto zaznaczyć, że w przypadku formułacji spełniających właściwości cieczy binghamowskich, ich płynięcie może być wywołane jedynie poprzez przekroczenie wartości krytycznej naprężenia tzw. granicy płynięcia. Wskazuje to na fakt, że niekontrolowane, samoistne wypływanie takiej formułacji z wagi jest niemożliwe, co w przypadku powszechnie stosowanych globulek jest zjawiskiem powszechnym. W przypadku formułacji

niewykazujących granicy plastyczności (BE57_CLT oraz PC66_CLT), ze względu na wysoką wartość lepkości formułacji, można sądzić, że utrzymają się one w waginie i nie wypłyną samoistnie. Właściwość ta stanowi przewagę przygotowanych formułacji nad aktualnie stosowanymi globulkami, w kontekście dłuższego oddziaływania leku z obszarem chorobowo zmienionym. W efekcie możliwe jest ograniczenie liczby aplikacji formułacji preparatu leczniczego, co zwiększy komfort pacjentek.



Rysunek 16. Zależność modułów zachowawczego i stratności od temperatury dla lepkich cieczy na bazie hiproczalęzianego poliglicydu modyfikowanego grupami bifenylowymi. [zacierpnięte z A2]

Przeprowadzone pomiary reologiczne w trybie przemiatania temperaturą wykazały, że w przypadku formułacji na bazie bifenylowej pochodnej dominują właściwości lepkie ($G'' > G'$) – rysunek 16, co oznacza, że z reologicznego punktu widzenia nie można nazwać ich hydrożelami. Dodatkowo zaobserwowana zależność lepkości od temperatury pozwala stwierdzić, że badane materiały są termowrażliwe. Jednak wyznaczone nachylenia zależności lepkości zespolonej względem temperatury pokazały, że na zachowanie termowrażliwe formułacji nie ma wpływu ilość zaenkapsulowanego leku, dlatego wywnioskowano, że właściwości termowrażliwe są regulowane przez wodorowe oddziaływania intra- i intermolekularne, w które zaangażowany jest sam polimer.

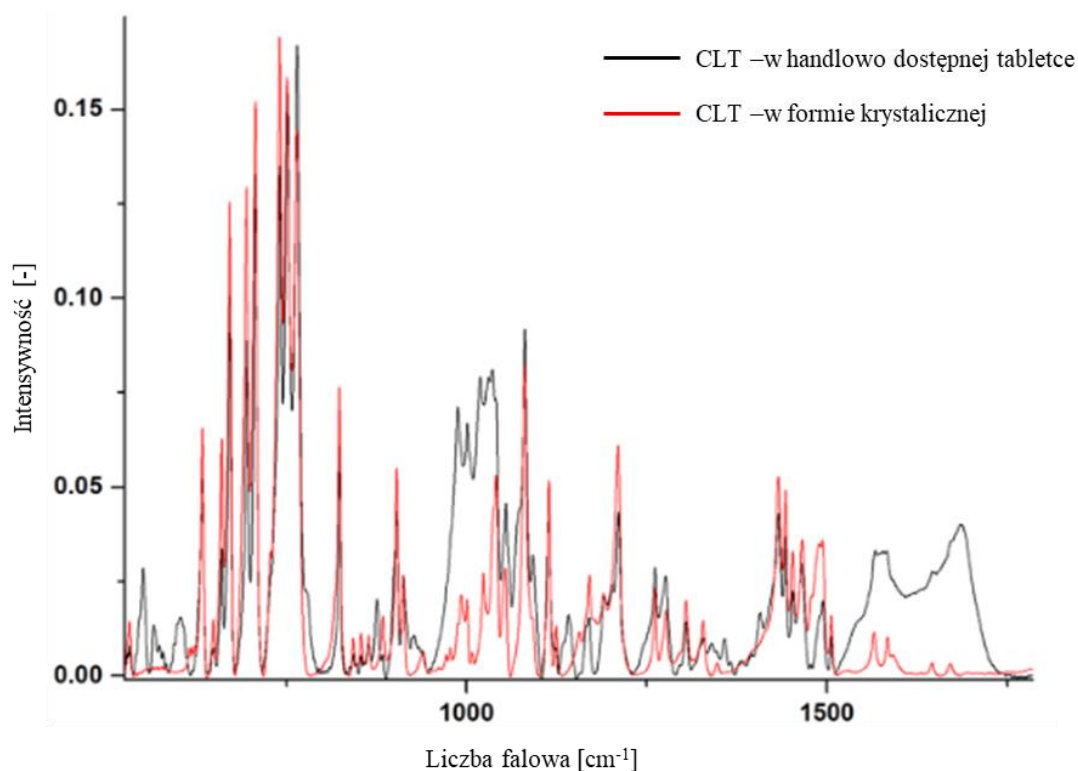
8.2.3. Analiza oddziaływań przy użyciu spektrometrii podczerwieni – FT-IR.

W celu określenia oddziaływań klotrimazolu z hydrofobizowanymi pochodnymi HbPGL wykonano badania z wykorzystaniem spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni. Zarejestrowano widma suchych polimerów zarówno przed i po zaenkapsulowaniu leku, wodnych roztworów polimerów, wodnych formułacji na bazie polimeru z lekiem, leku w formie

proszku oraz w roztworze metanolu, a także widma metanolu i wody. Okazało się, że widmo leku w formie krystalicznej – w proszku – znacząco różni się od widma zarejestrowanego dla metanolowego roztworu klotrimazolu, czyli leku zdyspergowanego molekularnie. Jako podstawę do rozróżnienia form leku przyjęto zatem pasma charakterystyczne przy długościach fal $720 - 780\text{ cm}^{-1}$, w przypadku formy krystalicznej w tym miejscu występowały trzy pasma, natomiast w przypadku widma leku zdyspergowanego molekularnie obserwowano jedno szerokie pasmo. Zarejestrowano również widmo komercyjnie dostępnej globulki, w celu scharakteryzowania postaci leku, w jakiej występuje on w preparacie.

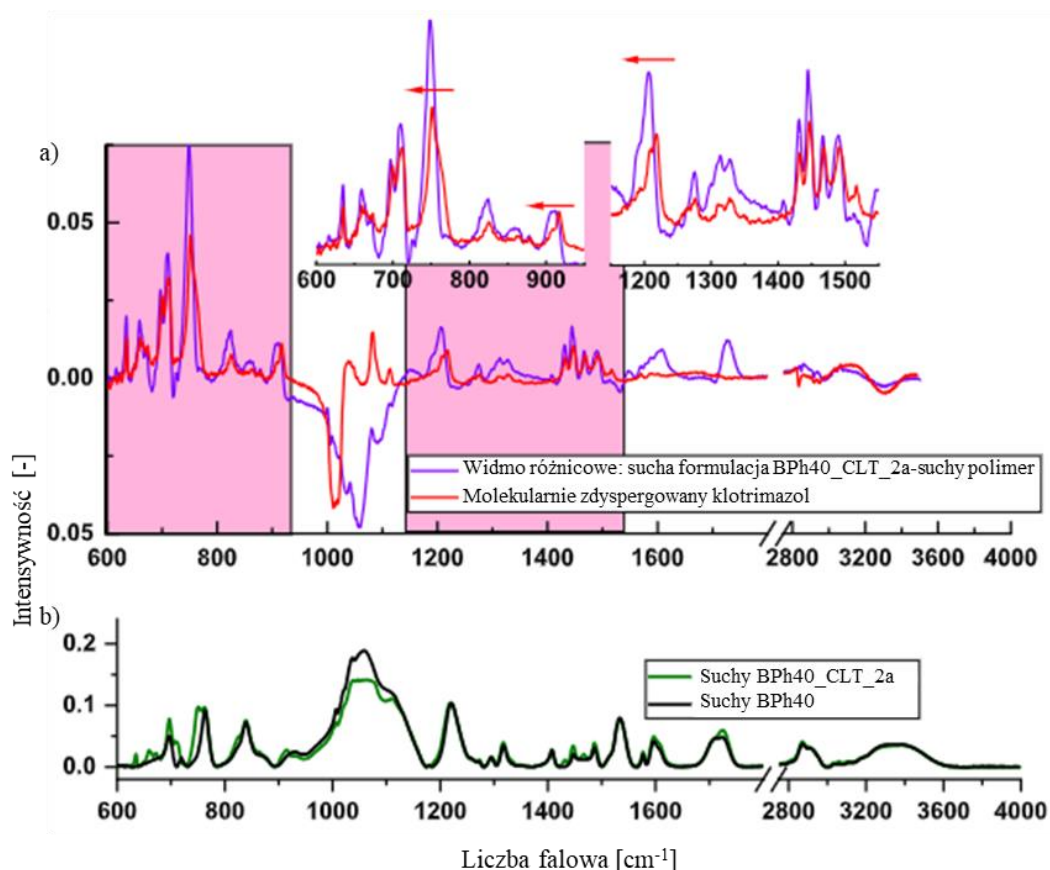
Uzyskane widma pokazały, że w przypadku globulki – rysunek 17 – ale również formulacji na bazie BE57 oraz PC66 (w formie suchej oraz uwodnionej) obecny w nich lek przyjmuje postać krystaliczną. W związku z tym uznano, że polimery BE57 oraz PC66 pomimo wysokiego stopnia hydrofobizacji rdzenia hiperrozgałęzionego poliglicydolu nie są obiecującymi matrycami do rozpuszczania silnie hydrofobowego leku jakim jest klotrimazol.

Natomiast formulacje na bazie pochodnej bifenyłowej, które w przeciwieństwie do obu pochodnych fenyłowych, były przezroczyste w każdym badanym stosunku molowym leku do polimeru w formie suchej oraz uwodnionej, mają potencjał do zastosowania jako nośniki klotrimazolu. Wykonano widma dwóch reprezentatywnych formulacji na bazie pochodnej bifenyłowej, BPh40_CLT_2a oraz BPh40_CLT_4, które pokazały, że obecny w nich klotrimazol jest w formie zdyspergowanej molekularnie, niezależnie od jego ilości ani od zawartości wody w formulacjach.



Rysunek 17. Widma absorpcyjne w zakresie IR klotrimazolu w komercyjnie dostępnej tabletkie oraz w formie krystalicznej. Dodatkowe pasma w widmie tabletki pochodzą od dodatków używanych do przygotowania formulacji w komercyjnym produkcie. [zaczepnięte z A2]

W celu poznania zmian jakie zachodzą w widmie leku wskutek enakapsulacji w strukturze amfifilowego polimeru porównano widma leku otrzymane po odjęciu widma suchego polimeru od widma suchej formulacji polimeru z lekiem oraz po odjęciu widma metanolu od widma metanolowego roztworu leku. Rysunek 18a zawiera przykład takiej analizy dla pochodnej bifenyłowej BPh40_CLT_2a. Otrzymane widma różnicowe wykazały przesunięcia w kierunku niższych wartości liczb falowych pasm odpowiadających drganiom rozciągającym wiązania C-Cl (750 cm^{-1}), a także C-H (917 cm^{-1}) i C-N (1206 cm^{-1}) obecnych w pierścieniu imidazolowym. Przesunięcie pasm drgań C-Cl jest pośrednim potwierdzeniem oddziaływania pomiędzy polimerowym nośnikiem a lekiem poprzez oddziaływania halogenowe (67,68). Przesunięcie pasma 750 cm^{-1} w stronę niższych wartości liczb falowych jest typowym efektem obecności oddziaływania halogenowego pomiędzy chlorem a nukleofilem obecnym w cząsteczce (na przykład atomem tlenu, azotu lub pierścieniem aromatycznym) (67,68). Biorąc pod uwagę fakt, że pozostałe pasma pochodzące od drgań wiązań obecnych w klotrimazolu nie ulegają przesunięciu, uznano, że wykonane analizy matematyczne widm zostały przeprowadzone prawidłowo.

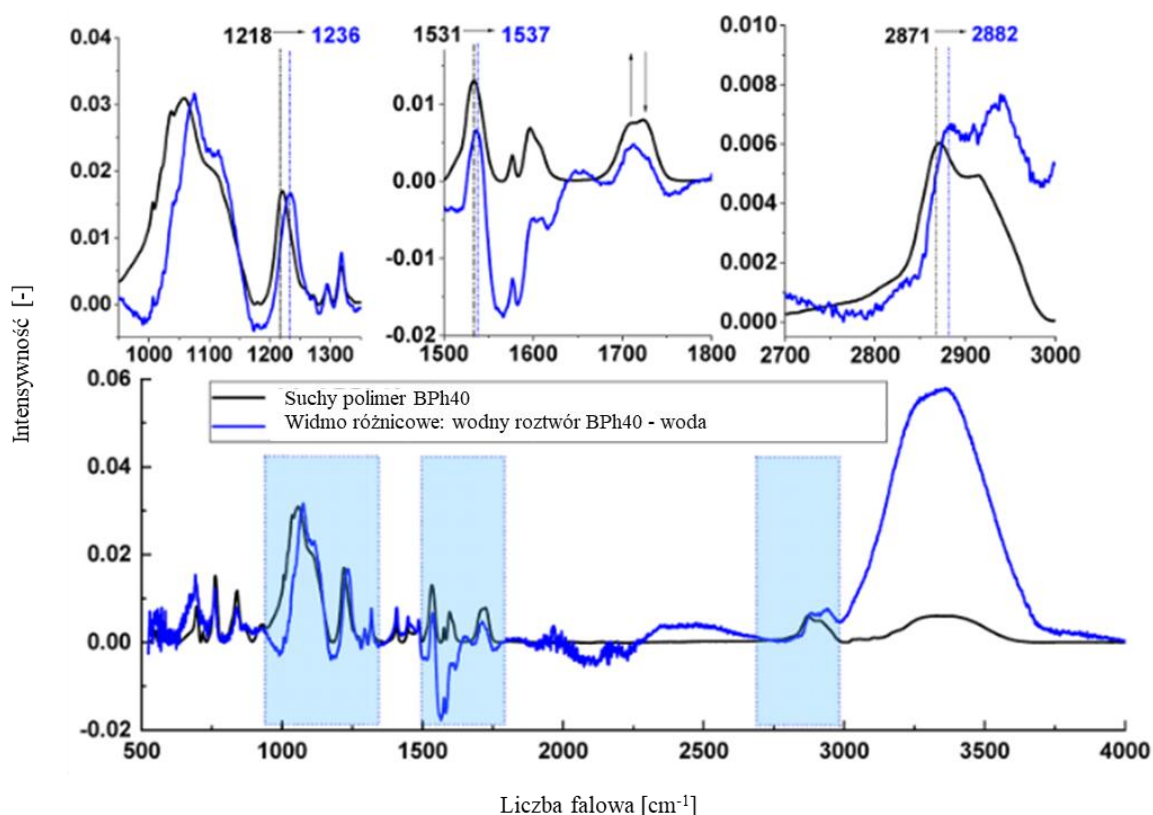


Rysunek 18. Widma obrazujące oddziaływania pomiędzy lekiem a polimerem w suchych formulacjach.[zaczepnięte z A2]

Przeprowadzono również analizę widm absorpcyjnych w zakresie IR pod kątem oddziaływań leku z polimerem. W tym celu porównano widma otrzymane dla suchego polimeru i suchej enakapsulacji – rysunek 18b. Zaobserwowano przesunięcie pasm przy liczbach falowych 1540 cm^{-1} oraz 1750 cm^{-1} , które odpowiadają odpowiednio kombinacji drgań zginających wiązań N-H i drgań rozciągających wiązań C-N, a także drgań rozciągających wiązań C=O (69,70). Przesunięcie takie oznacza, że w cząsteczce dochodzi do zrywania się wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Dodatkowym potwierdzeniem na zrywanie się wiązań wodorowych jest przesunięcie się w stronę niższych wartości liczb falowych pasma przy 1220 cm^{-1} , które odpowiada drganiom rozciągającym wiązanie C-O-C (69,70). Obserwowane efekty wskazują na przeniesienie ładunku w kierunku łańcucha, a co za tym idzie skrócenie wiązania C=O przy jednoczesnym wydłużeniu się wiązania C-O-C (71,72).

Następnie zbadano oddziaływania wody z polimerem, a także z lekiem zaenkapsulowanym w strukturze polimeru. W tym celu porównano widma zliofilizowanej oraz uwodnionej formulacji, co pozwoliło na określenie oddziaływań leku z polimerem w warunkach bezwodnych i w środowisku wodnym. Zestawienie widm wykazało, że przesunięcia pasm pochodzących od klotrimazolu nie zależą od obecności wody w układzie. Sugeruje to, że lek

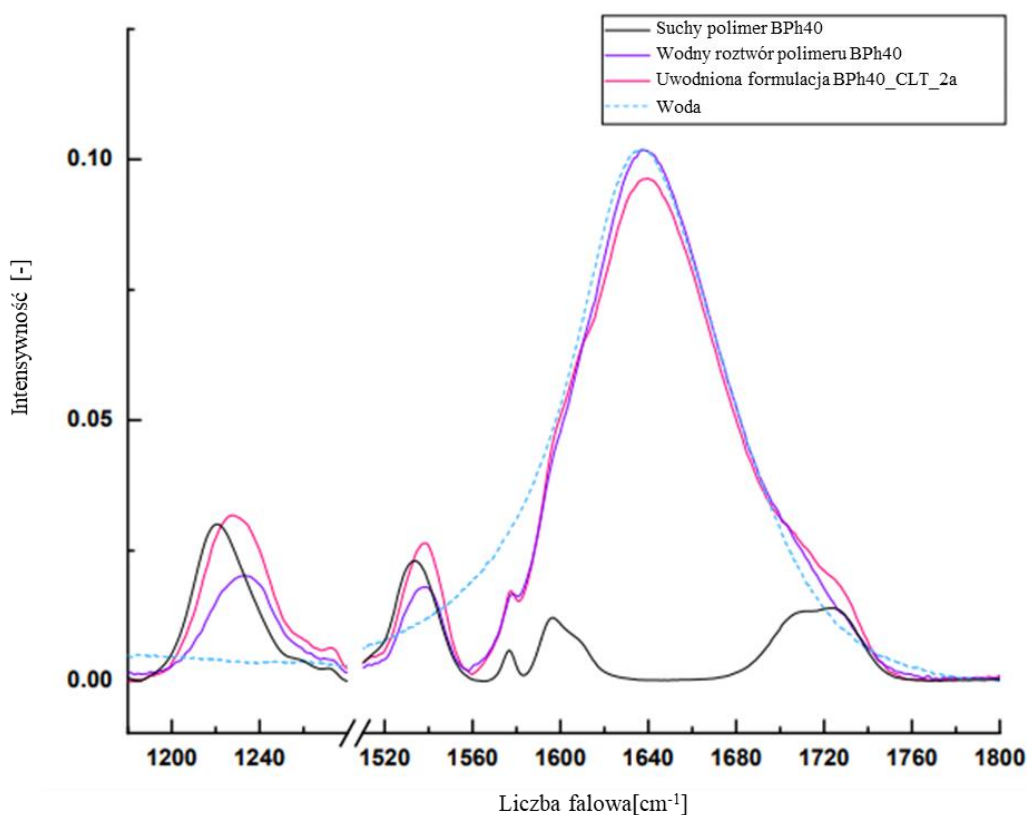
pozostaje związany z polimerem niezależnie od zawartości wody. Dodatkowym potwierdzeniem tego jest to, że otrzymana formuła pozostaje stabilna w czasie i nie obserwuje się wypadania klotrimazolu.



Rysunek 19. Widma absorpcyjne w zakresie podczerwieni zliofilizowanego oraz uwodnionego polimeru BPh40. [zaczepnięte z A2]

Chcąc zaobserwować zmiany jakie zachodzą w polimerze po uwodnieniu konieczne było przygotowanie zestawienia widma suchego polimeru oraz widma różnicowego utworzonego z widm uwodnionego polimeru po odjęciu od niego widma wody – rysunek 19. Najbardziej widoczne zmiany powinny być obserwowane dla pasm odpowiadającym drganiom najbardziej polarnych, a co za tym idzie najbardziej podatnych na hydratację, grup w układzie. Pasma odpowiadające drganiom rozciągającym wiązania C-O-C (1218 cm^{-1}) oraz kombinacji drgań zginających grupy N-H i rozciągających wiązania C-N (1531 cm^{-1}) przesuwają się pod wpływem wody w stronę wyższych wartości liczb falowych, co może zostać wytłumaczone pojawieniem się oddziaływań grupy eterowej i uretanowej z cząsteczkami wody poprzez wiązania wodorowe (69,70). Potwierdzeniem tego faktu są również zmiany obserwowane dla pasma odpowiadającego drganiom rozciągającym wiązanie C=O (ok. 1710 cm^{-1}), w którym dochodzi do zmiany relacji intensywności między pasmami charakterystycznymi dla grup biorących udział w oddziaływaniach wodorowych (1710 cm^{-1}) oraz wolnych od oddziaływań (1725 cm^{-1}) (71). Dla porównania zarejestrowano również widma dla pochodnych BE57 oraz

PC66, które pokazały, że również w przypadku tych polimerów bez leku dochodzi do oddziaływań wodorowych między polimerem a cząsteczkami wody.



Rysunek 20. Porównanie widm absorpcyjnych w zakresie podczerwieni suchego polimeru, wodnego roztworu polimeru, uwodnionej formuacji polimeru z lekiem oraz wody. [zaczepnięte z A2]

Ostatnim etapem analizy widm FT-IR było porównanie widm: uwodnionych formuacji z lekiem, polimerów, wody i suchych polimerów, co pozwoliło na ocenę wpływu leku na oddziaływanie polimeru z wodą. Zaobserwowane zmiany dla próbek bazujących na pochodnej bifenyłowej – rysunek 20 – dotyczą przede wszystkim pasm odpowiadających drganiom wiązań C-N oraz N-H (1540 cm^{-1}) i C-O-C (1240 cm^{-1}) – widoczne jest przesunięcie tych pasm w stronę wyższych wartości liczb falowych, co świadczy o dobrym uwodnieniu tych grup (71,72). Jednak w porównaniu do widma roztworu czystego polimeru obserwowane zmiany nie są tak znaczne, co oznacza, że obecność leku w formuacji spowodowała mniejszą podatność polimeru na hydratację, czyniąc go bardziej hydrofobowym.

W przypadku pochodnej zawierającej ugrupowanie fenyłowe wprowadzone poprzez wiązanie uretanowe (PC66) porównanie widm pokazało, że pasma odpowiadające grupom wrażliwym na uwodnienie, tzn. C-O-C (1220 cm^{-1}), N-H oraz C-N (1540 cm^{-1}) i C=O (1720 cm^{-1}), nie zmieniają swojego położenia względem widma roztworu polimeru, co wskazuje na brak wpływu leku na właściwości hydrofilowe polimeru. Efekt taki nie jest zaskoczeniem,

biorąc pod uwagę fakt, że cząsteczki leku krystalizują w obrębie makrocząsteczki, nie wchodząc w tak silną interakcję, jak było to w przypadku pochodnej bifenyłowej.

Porównanie widm uwodnionej formulacji z lekiem, wodnego roztworu polimeru, suchego polimeru, suchej formulacji polimeru z lekiem oraz wody wykonano również dla pochodnej estrowej (BE57). Przeprowadzona analiza wykazała, że przesunięcia pasm wrażliwych na oddziaływania wodorowe, tj. C-O-C (1260 cm^{-1}) oraz C=O (1720 cm^{-1}) w uwodnionej formulacji pokrywają się z przesunięciami tych pasm dla suchego polimeru. Świadczy to o niskim stopniu uwodnienia tej pochodnej.

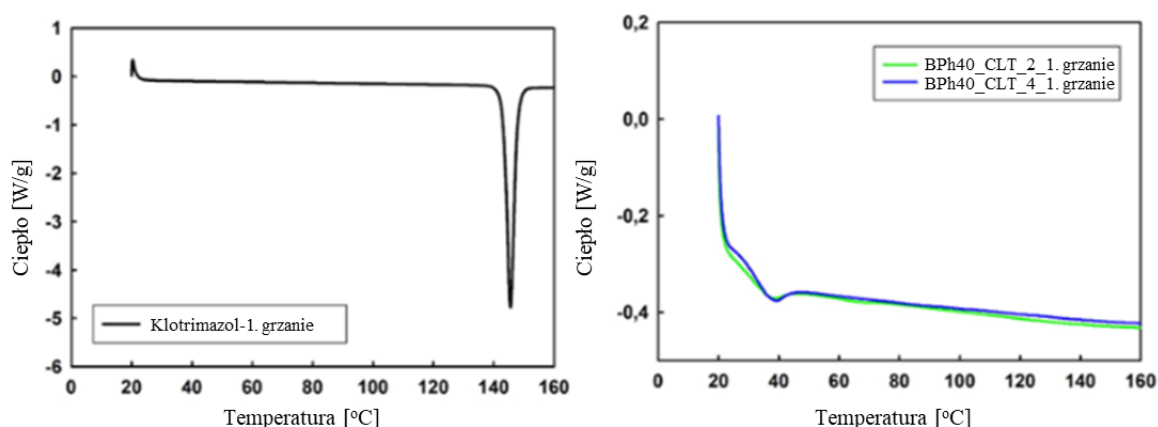
Przeprowadzone analizy doprowadziły do wniosku, że obecność większej powierzchni pierścieni aromatycznych w jednostkach hydrofobowych, stwarza dogodne warunki do zwiększenia rozpuszczalności klotrimazolu w matrycy polimerowej. Natomiast niższy stopień hydrofobizacji przekładający się na wyższą liczbę nienaruszonych grup monohydroksylowych w cząsteczce, wpływa korzystnie na możliwość absorpcji wody. Oznaczać to może, że oprócz obecności ugrupowania uretanowego w cząsteczce polimeru, oddziaływania pomiędzy pierścieniami aromatycznymi mogą mieć duże znaczenie w procesie enkapsulacji leku. Co więcej, budowa wybranego polimeru znacząco wpływa na możliwość krystalizacji leku wewnątrz struktury polimeru. W przypadku pochodnych fenyłowych obserwowana była krystalizacja cząsteczek leku w matrycy, natomiast obecność ugrupowania bifenyłowego chroniła przed tym procesem, zapewniając molekularne zdyspersgowanie leku w matrycy. Ograniczenie procesu krystalizacji cząsteczek leku w matrycy polimerowej ma ogromne znaczenie w zwiększeniu biodostępności substancji aktywnej, kontroli nad uwalnianiem leku, a co za tym idzie na działanie leku w miejscu chorobowo zmienionym.

Biorąc pod uwagę ograniczoną rozpuszczalność klotrimazolu w wodzie, wynoszącą $0,49\text{ }\mu\text{g/ml}$ (57), oraz stężenie klotrimazolu w formulacjach na bazie pochodnej bifenyłowej, które wahało się między $0,062$ a $0,211\text{ g/ml}$ w zależności od przygotowanej formulacji, zakładając, że obecny w nich klotrimazol jest w całości zdyspersgowany molekularnie, udało się zwiększyć jego rozpuszczalność aż o 127 000 razy.

8.2.4. Analiza właściwości krystalicznych otrzymanych formulacji na bazie hydrofobizowanego hiperrozgałęzionego poliglicydołu przy użyciu skaningowej kalorymetrii różnicowej

Przeprowadzono również analizy czystych polimerów, polimerów z zaenkapsulowanym lekiem, leku oraz komercyjnej globulki przy użyciu skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC). Przeprowadzone badanie pokazało, że czysty lek w formie krystalicznej wykazuje ostry

pik endotermiczny w 145,5 °C w pierwszym cyklu grzania, który odpowiada temperaturze topnienia klotrimazolu – rysunek 21. Ze względu na to, że w przyjętych warunkach eksperymentu, to znaczy ze zmianą temperatury z szybkością 10 °C na minutę, klotrimazol nie był w stanie skryształizować w cyklu chłodzenia, przygotowane formułacje polimeru z lekiem porównywane były z lekiem tylko w pierwszym cyklu grzania.



Rysunek 21. Przykładowe termogramy czystego klotrimazolu oraz suchych formułacji polimeru BPh40 z klotrimazolem. [zaczepnięte z A2]

Termogramy otrzymane dla globulki oraz formułacji na bazie BE57 oraz PC66 uwidocznily obecność szerokiego endotermicznego pik, wskazującego na obecność formy krystalicznej, co potwierdza wyniki otrzymane z analizy FT-IR. W przypadku formułacji na bazie amfifilowego hiperrozgałęzionego poliglicydolu (BE57 oraz PC66), na podstawie otrzymanych termogramów, możliwe było obliczenie stopnia krystaliczności klotrimazolu, który był równy 83% dla pochodnej estrowej oraz 93% dla pochodnej uretanowej.

Natomiast w przypadku termogramów pochodnej bifenylowej nie obserwowano endotermicznego pik odpowiadającego topnieniu klotrimazolu – rysunek 21. Potwierdza to, że zaenkapsulowany lek, bez względu na zastosowany stosunek leku do polimeru, jest dobrze zdyspergowany w matrycy polimeru, co jest spójne w wynikami otrzymanymi ze spektroskopii podczerwieni.

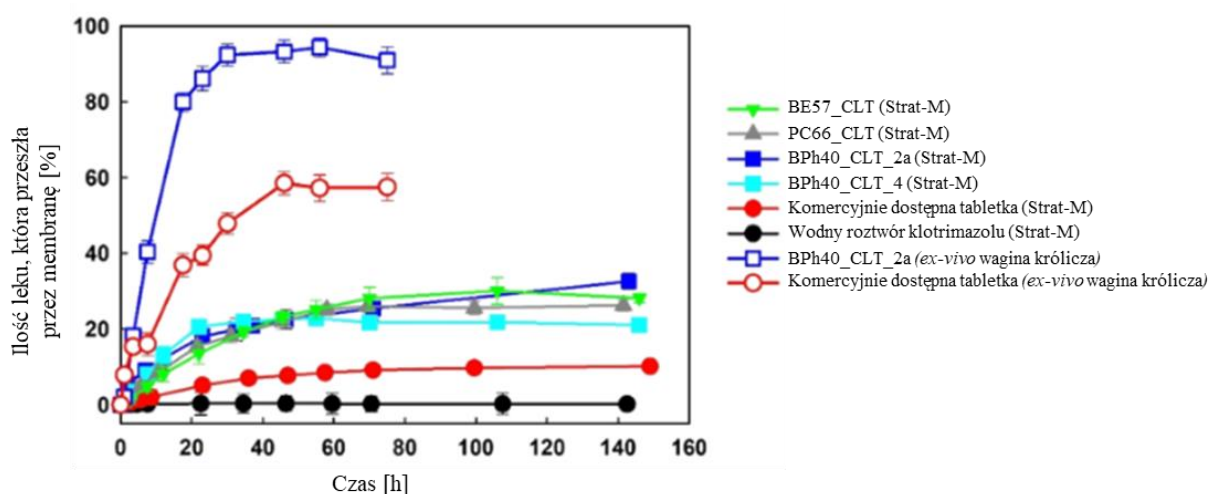
Dodatkowo porównano termogramy suchych formułacji z lekiem oraz suchych polimerów w drugim cyklu grzania. Otrzymane wyniki ujawnily, że temperatura zeszklenia polimeru wzrosła wskutek enkapsulacji leku. Na przykład dla pochodnej BPh40 temperatura zeszklenia czystego polimeru BPh40 wynosiła 9,2 °C, natomiast dla jego formułcji z lekiem temperatura zeszklenia wzrosła do 29,3 °C. Tak znacząca różnica świadczy o zmniejszeniu mobilności segmentów polimeru wskutek oddziaływań jakie mają miejsce między polimerem a lekiem.

8.2.5. Test przenikalności substancji aktywnej

W celu poznania biodostępności klotrimazolu zaenkapsulowanego wewnątrz otrzymanych polimerów w porównaniu do komercyjnie dostępnej globulki i zawiesiny leku wykonano testy *in vitro* przenikalności leku przez membranę (Strat-M), która jest obecnie najlepszym sztucznym modelem skóry ludzkiej – rysunek 22. Przeprowadzone testy ujawniły znaczącą poprawę przenikalności leku przez membranę dla materiałów bazujących na hydrofobizowanym hiperrozgałęzionym poliglicydolu w porównaniu do komercyjnie dostępnej globulki, czy leku w zawieszynie. Oznaczać to może, że przygotowane materiały nadają się jako nośniki leku do podania poprzez śluzówkę, zwiększając jego biodostępność. W celu ilościowego określenia przenikalności leku przez membranę, K_p , użyto następującej zależności:

$$K_p = \frac{Q}{A \cdot t \cdot C_0},$$

gdzie: Q to ilość leku, która przeniknęła przez membranę, A to powierzchnia membrany, t to czas, natomiast C_0 odnosi się do stężenia roztworu, z którego uwalniana jest substancja aktywna.



Rysunek 22. Ilość leku, która przeszła przez membranę w czasie. Eksperyment wykonany dla wodnych formułacji polimeru z lekiem, leku oraz komercyjnie dostępnej tabletki, przeprowadzony względem sztucznej membrany imitującej ludzką skórę – Strat-M, oraz względem króliczej waginy. [zaczepnięte z A2]

Wyznaczone wartości pokazały, że stała przenikalności klotrimazolu dla otrzymanych formułacji była około 5 razy wyższa w porównaniu do klotrimazolu w komercyjnie dostępnej globulce, natomiast w porównaniu do leku w roztworze, wartość ta była nawet 50 razy wyższa. Najwyższa wartość stałej przenikalności została wyznaczona dla formułacji na bazie pochodnej bifenylowej (BPh40_CLT_4) i wynosiła $3,36 \cdot 10^{-5}$ cm/min.

Biorąc pod uwagę, że formułacje wytworzone z hiperrozgałęzionego poliglicydolu o hydrofobizowanym wnętrzu grupami bifenyłowymi, wprowadzonymi poprzez wiązanie

uretanowe, okazały się najbardziej obiecującymi nośnikami klotrimazolu do zastosowania w terapii ginekologicznej, postanowiono wykonać dodatkowy test przenikalności *ex vivo* przy użyciu tkanki króliczej waginy. W celu porównania działania, wykonano również test dla komercyjnie dostępnej tabletki z klotrimazolem. Otrzymane wyniki wskazały, że ilość leku, która przeszła przez króliczą tkankę była wyższa niż w przypadku wcześniej stosowanej sztucznej membrany dla obu formułacji, jednak formułacja polimeru z lekiem zwiększyła przenikalność leku przez tkankę w porównaniu do zastosowanej tabletki.

Wyniki bezsprzecznie świadczą, że zastosowanie amfifilowego hiperrozgałęzionego poliglicydolu jako nośnika klotrimazolu zapewnia trwałe dostarczanie leku do miejsca chorobowo zmienionego. Efekt taki można powiązać ze zwiększoną rozpuszczalnością leku w matrycy polimerowej.

8.2.6. Stabilność uwodnionych formułacji na bazie amfifilowego hiperrozgałęzionego poliglicydolu z lekiem w warunkach symulowanego płynu waginalnego.

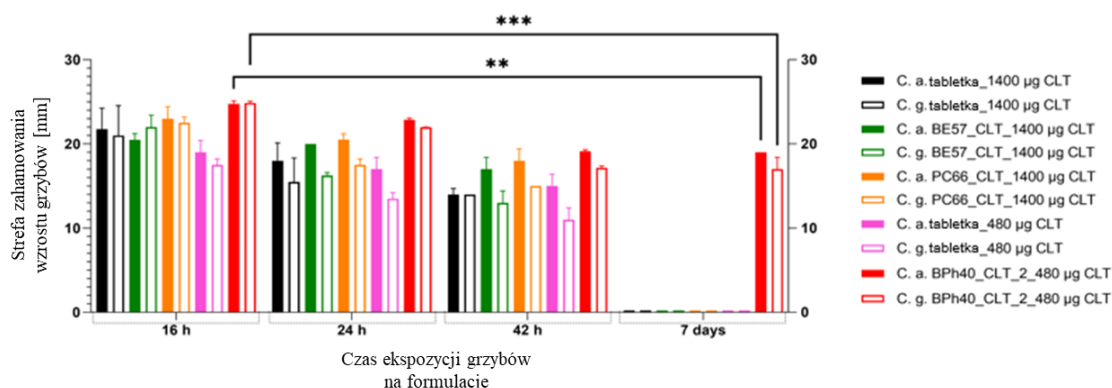
W związku z obiecującymi wynikami uzyskanymi dla pochodnej bifenyłowej przeprowadzono test wytrzymałości wodnych formułacji polimeru z lekiem na warunki środowiskowe panujące w pochwie, czyli potencjalnym miejscu podania. W tym celu umieszczono fragment formułacji na plastikowym krążku, a także na kawałku świńskiej skóry, które następnie zanurzono w roztworze symulującym płyn waginalny i trzymano w temperaturze 37 °C przez 24 godziny, jako że po tym czasie uzyskano maksymalne stężenie uwolnionego leku. Zauważono, że z upływem czasu dochodziło do stopniowego uwalniania się polimeru z formułacji wraz ze stopniowym bieleniem materiału na krążku, pomimo to formułacja z lekiem pod wpływem czasu podwoiła zajmowaną powierzchnię nie tracąc przy tym ciągłości struktury.

Po zakończonym eksperymencie wykonano analizę ¹H NMR roztworu znad formułacji, która wykazała obecność tak samo polimeru i leku w roztworze. Efekt taki zaobserwowano dla obu próbek, niezależnie od materiału na jakim zostały umieszczone. Mając na uwadze to, że śluzówka waginy podlega regularnemu złuszczeniu, a pełen cykl odnowy tkanki trwa 96 godzin (3), polimerowa matryca wraz z lekiem powinny zostać samoistnie usunięte z waginy.

8.2.7. Badania *in vitro* aktywności przeciwwgrzybiczej leku zamkniętego w wodnych formułacjach polimeru z lekiem

W celu określenia działania przeciwwgrzybicznego otrzymanych materiałów w porównaniu z komercyjnie dostępną tabletką, wykonano badanie wpływu leku zamkniętego

w wytworzonych formulacjach na wzrost grzybów. Do badania wybrano grzyby ze szczepów najczęściej powodujących grzybicę pochwy, to znaczy *Candida albicans* oraz *Candida glabrata* (73).



Rysunek 23. Wielkość strefy zahamowania wzrostu grzybów w czasie w zależności od zastosowanej formulacji polimeru z lekiem. [zaczepnięte z A2]

Wpływ leku zawartego w przygotowanych formulacjach na wybrane szczepy grzybów określono poprzez pomiar strefy zahamowania wzrostu grzybów i porównanie wyników w przedziałach czasowych – rysunek 23. Otrzymane wyniki wskazują, że formulacje na bazie pochodnych fenylowych (BE57 oraz PC66) mają bardzo zbliżone właściwości przeciwgrzybicze jak komercyjnie dostępna tabletka, o czym świadczą podobne wielkości stref zahamowania wzrostu grzybów. Próbkki referencyjne, wykonane z handlowo dostępnej globulki działały podobnie bez względu na zastosowaną dawkę leku.

Zaskakująco dobre działanie przeciwko obu szczepom grzybów prezentowała wytworzona formuacja na bazie pochodnej bifenyłowej. Pomimo dużego rozcieńczenia i znacznie niższej zawartości leku działanie formuacji było lepsze w każdym punkcie pomiarowym niż w przypadku pozostałych badanych materiałów. Co więcej, udowodniono działanie przeciwgrzybicze formuacji BPh40_CLT_2a nawet do siedmiu dni, czego nie udało się zaobserwować, dla żadnej innej próbki.

8.2.8. Wnioski

Podsumowując najważniejszym osiągnięciem tej części pracy jest opracowanie metody zwiększenia rozpuszczalności klotrimazolu w wodzie poprzez jego enkapsulację w wytworzonych matrycach polimerowych. Wykorzystanie do tego celu hiperrozgałęzionego poliglicydolu o rdzeniu hydrofobizowanym jednostkami bifenyłowymi wprowadzonymi poprzez wiązanie uretanowe doprowadziło do zwiększenia rozpuszczalności klotrimazolu nawet 127 000 razy.

Wszystkie próbki na bazie pochodnej bifenylowej z zaekapsulowanym lekiem w stosunkach molowych leku do polimeru od 8 do 32, były jednolitymi, przezroczystymi formulacjami, w których potwierdzono za pomocą spektroskopii podczerwieni oraz skaningowej kalorymetrii różnicowej, że lek występuje w formie molekularnej, czego nie udało się osiągnąć dla próbek na bazie amfifilowego HbPGL o rdzeniu modyfikowanym ugrupowaniami z jednym pierścieniem aromatycznym.

Dodatkowo materiały wykonane z *h*HbPGL z ugrupowaniami bifenyłowymi wykazywały korzystniejsze właściwości reologiczne oraz były stabilniejsze w stosunku do materiałów na bazie fenylowych pochodnych. W zależności od składu formulacje wykazywały granicę plastyczności lub dużą lepkość w temperaturze 37 °C. Takie cechy zapewniają utrzymanie nośnika leku w pochwie, bez obaw o niekontrolowane wypłynięcie, które często występuje w przypadku stosowania aktualnie dostępnych form dopochwowych leków przeciwwrządczych. Dzięki temu otrzymane formulacje zapewniają dłuższe oddziaływanie leku z miejscem chorobowo zmienionym i redukują liczbę koniecznych aplikacji leku.

Warto również wspomnieć, że zastosowanie matrycy polimerowej zwiększyło przenikalność leku nie tylko przez membranę Strat-M, ale również przez tkankę biologiczną w stosunku do przenikalności leku z handlowo dostępnej globulki czy z roztworu.

Przeprowadzony eksperyment działania otrzymanych formulacji z lekiem wykazał, że działanie klotrimazolu zostało wydłużone nawet do 7 dni poprzez zastosowanie matrycy polimerowej na bazie pochodnej bifenylowej.

Mając na uwadze otrzymane wyniki, za sukces należy uznać wytworzenie formulacji o prostym składzie, wygodnej aplikacji i efektywnym działaniu przeciwwrządczym.

8.3. Właściwości termowrażliwe hydrofobizowanego hiperrozgałęzionego poliglicydołu.

Hydrofobizacja HbPGL sprawia, że jego pochodne wykazują właściwości termowrażliwe. Dotychczas polimery te były modyfikowane w sposób niekontrolowany. Brak jednak doniesień dotyczących termowrażliwości HbPGL hydrofobizowanego selektywnie poprzez modyfikację grup monohydroksylowych. Przeprowadzone w tym zakresie badania zostały opisane w artukule A3.

8.3.1. Badania turbidymetryczne otrzymanych amfifilowych polimerów

Do przeprowadzenia badań wykorzystano hiperrozgałęzione poliglicydoły o różnym stopniu hydrofobizacji grupami fenyłowymi wprowadzonymi poprzez wiązania estrowe lub uretanowe. Polimery poddane analizie zestawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Charakterystyka hiperrozgałęzionych poliglicydoli o hydrofobizowanym rdzeniu przy użyciu grup fenylowych wprowadzonych za pomocą wiązań estrowych i uretanowych.

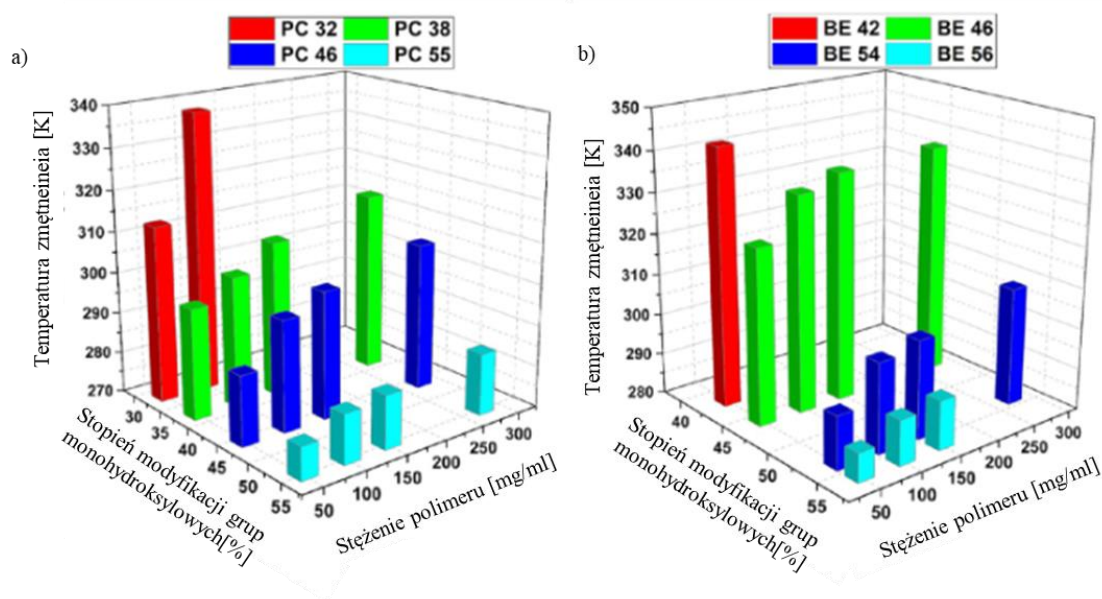
Wiązanie	hHbPGL	Udział molowy jednostek monohydroksylowych modyfikowanych jednostkami hydrofobowymi [mol%]	Liczba grup hydrofobowych przypadająca na jedną makrocząsteczkę	T _g [°C]
uretanowe	PC14	0,137	5	-16,6
	PC26	0,260	8	-8,2
	PC32	0,321	13,7	3,4
	PC38	0,38	17,8	9,2
	PC46	0,46	17,9	13
	PC55	0,55	22	21,2
	PC64	0,64	23,1	21,6
estrowe	BE19	0,186	6,9	-26,4
	BE33	0,333	12,6	-22,3
	BE42	0,416	16	-10,2
	BE46	0,454	19,9	1,9
	BE54	0,544	25,3	1,7
	BE56	0,561	27	0,4
	BE71	0,706	30	-1,2

Termowrażliwość otrzymanych polimerów amfifilowych badano przy użyciu spektroskopii UV-Vis, poprzez analizę zmiany transmitancji wraz ze wzrostem temperatury przygotowanych roztworów w szerokim zakresie stężeń – 50 – 275 mg/ml. Jako temperaturę zmętnienia próbki przyjęto temperaturę, w której transmitancja zaczęła spadać – tak zwany onset point.

Zaobserwowano, że w przypadku przygotowanych polimerów modyfikowanych grupami fenyłowymi rozpuszczalność w wodzie ściśle zależała od stopnia podstawienia liniowych grup monohydroksylowych. Polimery modyfikowane grupami fenyłowymi poprzez wiązania uretanowe o stopniu podstawienia poniżej 30% molowych nie wykazywały termowrażliwości, w przypadku stopnia modyfikacji 32-55% molowych obserwowano zachowanie termowrażliwe, natomiast przy wyższym udziale grup hydrofobowych polimer był nierozpuszczalny w wodzie. Polimery modyfikowane grupami fenyłowymi wprowadzonymi poprzez wiązanie estrowe wykazywały podobne zachowanie. HbPGL, którego jednostki liniowe były zmodyfikowane w stopniu do 33% molowych nie wykazywały termowrażliwości,

w zakresie 42-56% molowych obserwowane było zachowanie termowrażliwe. Natomiast gry stopień podstawienia grup monohydroksylowych był wyższy niż 71% molowych polimer był nierozpuszczalny.

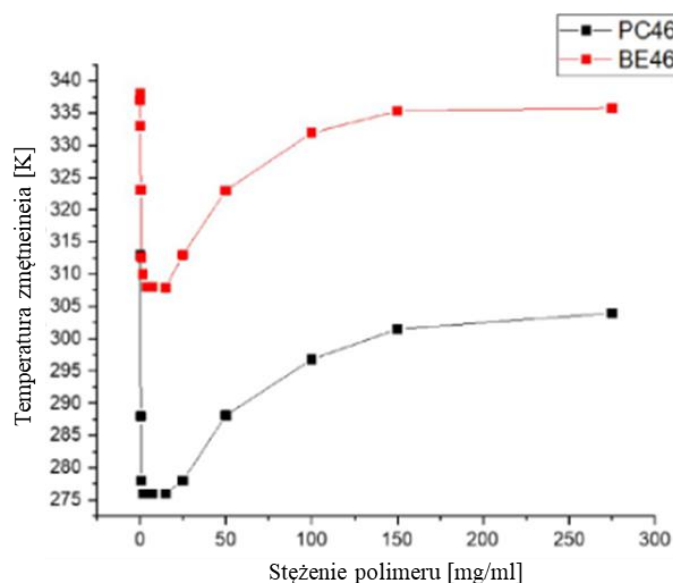
Warto zauważyć, że wzrost stężenia polimeru powodował wzrost temperatury zmętnienia jego roztworu, co nie jest typową zależnością obserwowaną dla polimerów wykazujących termowrażliwość. Oznacza to, że wraz ze wzrostem stężenia poprawiała się rozpuszczalność badanych polimerów. Porównanie zachowania termowrażliwego pochodnych HbPGL modyfikowanych grupami fenyłowymi wprowadzonych za pomocą wiązań estrowych bądź uretanowych ujawniło wyraźne różnice w wartościach T_c pomimo porównywalnego stopnia podstawienia. Przykładowo, dla pochodnej uretanowej o stopniu podstawienia grup monohydroksylowych równym 46% w stężeniu 50 mg/ml, temperatura zmętnienia wynosiła 287,7 K, natomiast dla pochodnej estrowej o podobnym stopniu modyfikacji (BE46) i w tym samym stężeniu, temperatura zmętnienia wynosiła 322,8 K – rysunek 24.



Rysunek 24. Zależność temperatury zmętnienia od stężenia oraz od stopnia podstawienia grup monohydroksylowych grupami fenyłowymi poprzez wiązania uretanowe (a) oraz estrowe (b). [zaczepnięte z A3]

Przeprowadzone badania pokazały, że wraz ze wzrostem stopnia modyfikacji liniowych grup konstytucyjnych $L_{1,3}$ oraz $L_{1,4}$ obniża się temperatura zmętnienia, co oznacza, że wraz ze wzrostem hydrofobowości układu zmniejsza się jego rozpuszczalność co jest typowym zachowaniem termowrażliwym (49,74).

Dla pochodnych HbPGL zhydrofobizowanych w podobnym stopniu (BE46 oraz PC46) opracowano wykresy fazowe na podstawie pomiarów turbidymetrycznych w szerokim zakresie stężeń tj. 0,12 - 275 mg/ml – rysunek 25.



Rysunek 25. Zależność temperatury zmętnienia od stężenia polimeru dla dwóch pochodnych hiperrozgałęzionego poliglicydolu o wnętrzu modyfikowanym grupami fenyłowymi wprowadzonymi poprzez wiązanie estrowe bądź uretanowe. [zaczepnięte z A3]

Przedstawione wyniki wskazują, że zależność temperatury zmętnienia wodnych roztworów obu polimerów od stężenia jest asymetryczna. W szerokim zakresie stężeń, to znaczy od 15 do 275 mg/ml obserwowany jest wzrost temperatury zmętniania wraz ze wzrostem stężenia polimeru. Zależność występuje dla obu polimerów, niezależnie od wiązania, jakim grupa fenyłowa została wprowadzona do rdzenia hiperrozgałęzionego poliglicydolu. W przypadku obu polimerów w zakresie 3,75-15 mg/ml temperatura zmętnienia roztworu polimeru nie zmieniała się, natomiast skutek wzrostu stężenia od 0,12 do 3,75 mg/ml temperatura zmętnienia malała. Biorąc pod uwagę stężenia w jakich przygotowuje się sieci polimerowe na bazie amfifilowego HbPGL należy wziąć pod uwagę zachowanie termowrażliwe tego polimeru, ponieważ może mieć ono znaczący wpływ na właściwości otrzymanych hydrożeli.

W węższym zakresie stężeń (0,24-30 mg/ml) przeprowadzono również badania przy pomocy dynamicznego rozproszenia światła, które wykazały, że *h*HbPGL w temperaturze poniżej temperatury zmętnienia występuje w postaci jednocząsteczkowych miceli, o średnicy hydrodynamicznej około 10 nm. Wzrost temperatury skutkował agregacją makrocząstek i separacją oleistej, lepkiej cieczy o gęstości większej niż woda, co jest konsekwencją niskiej temperatury zeszklenia otrzymanych zhydrofobizowanych pochodnych HbPGL. Zdjęcia mikroskopowe potwierdziły pojawianie się kropli polimeru po osiągnięciu temperatury

zmętnienia roztworu, które wraz ze wzrostem temperatury łączyły się w większe obiekty – rysunek 26.

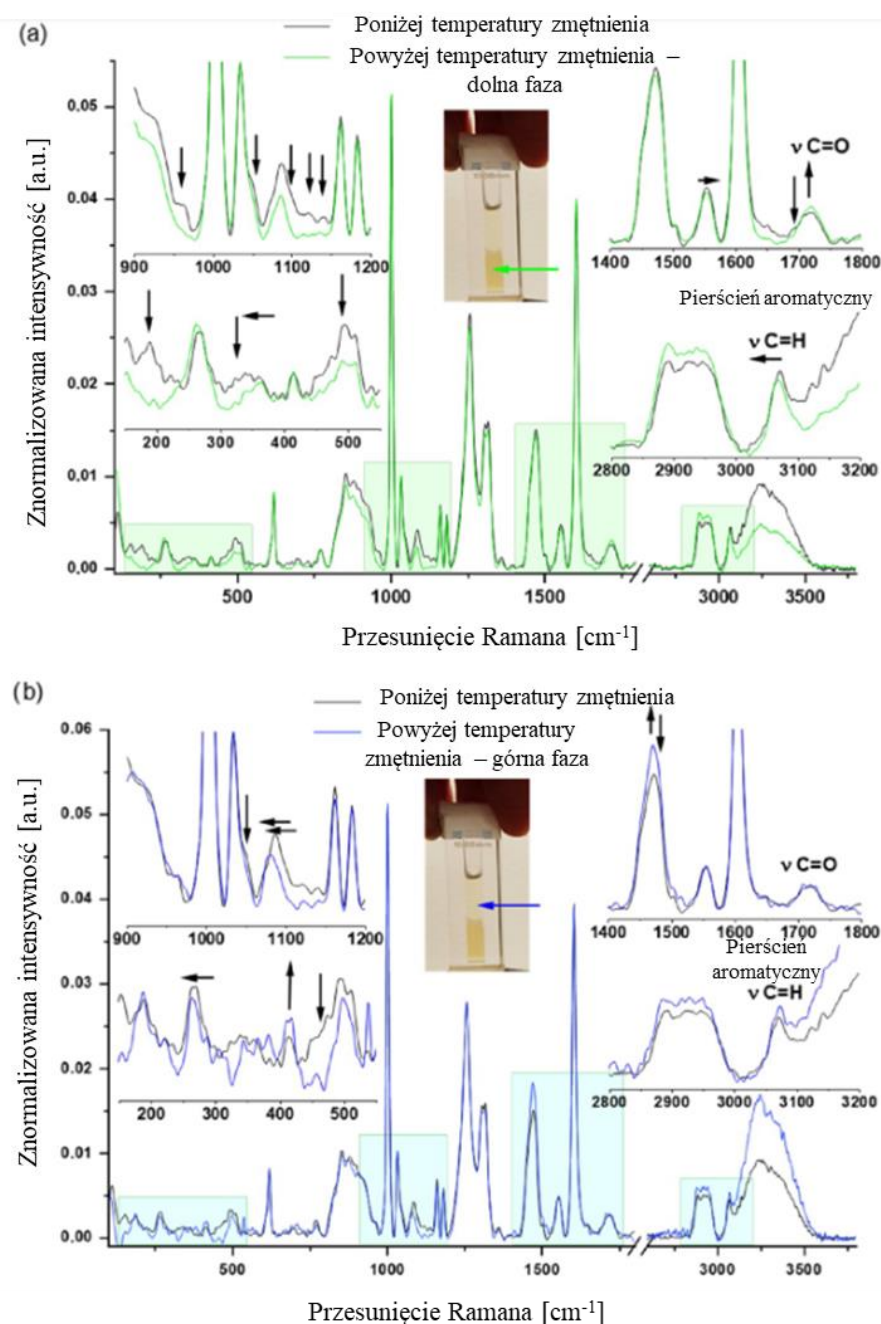


Rysunek 26. Zdjęcia mikroskopowe wodnych roztworów polimerów na przykładzie polimeru PC46 w temperaturze przed przejściem fazowym (a), w temperaturze zmętnienia (b) oraz w temperaturze wyższej niż temperatura zmętnienia (c). [zaczepnięte z A3]

8.3.2. Badania wodnych roztworów hydrofobizowanych pochodnych HbPGL z wykorzystaniem spektroskopii Ramana

Chcąc poznać zachowanie amfifilowych makrocząsteczek na bazie hiperrozgałęzionego poliglicydołu w wodnych roztworach poniżej i powyżej temperatury zmętniania wykonano analizę przy użyciu spektroskopii ramanowskiej. Dodatkowo miało to na celu wyjaśnienie różnicy w hydrofilowości zsyntezowanych polimerów. Do analiz wykorzystano polimery o zbliżonym stopniu podstawienia BE46 oraz PC46 w stężeniu 150 mg/ml i wykonano dla nich widma poniżej temperatury zmętnienia oraz dla obu faz otrzymanych w wyniku separacji polimeru od wody powyżej temperatury przejścia fazowego.

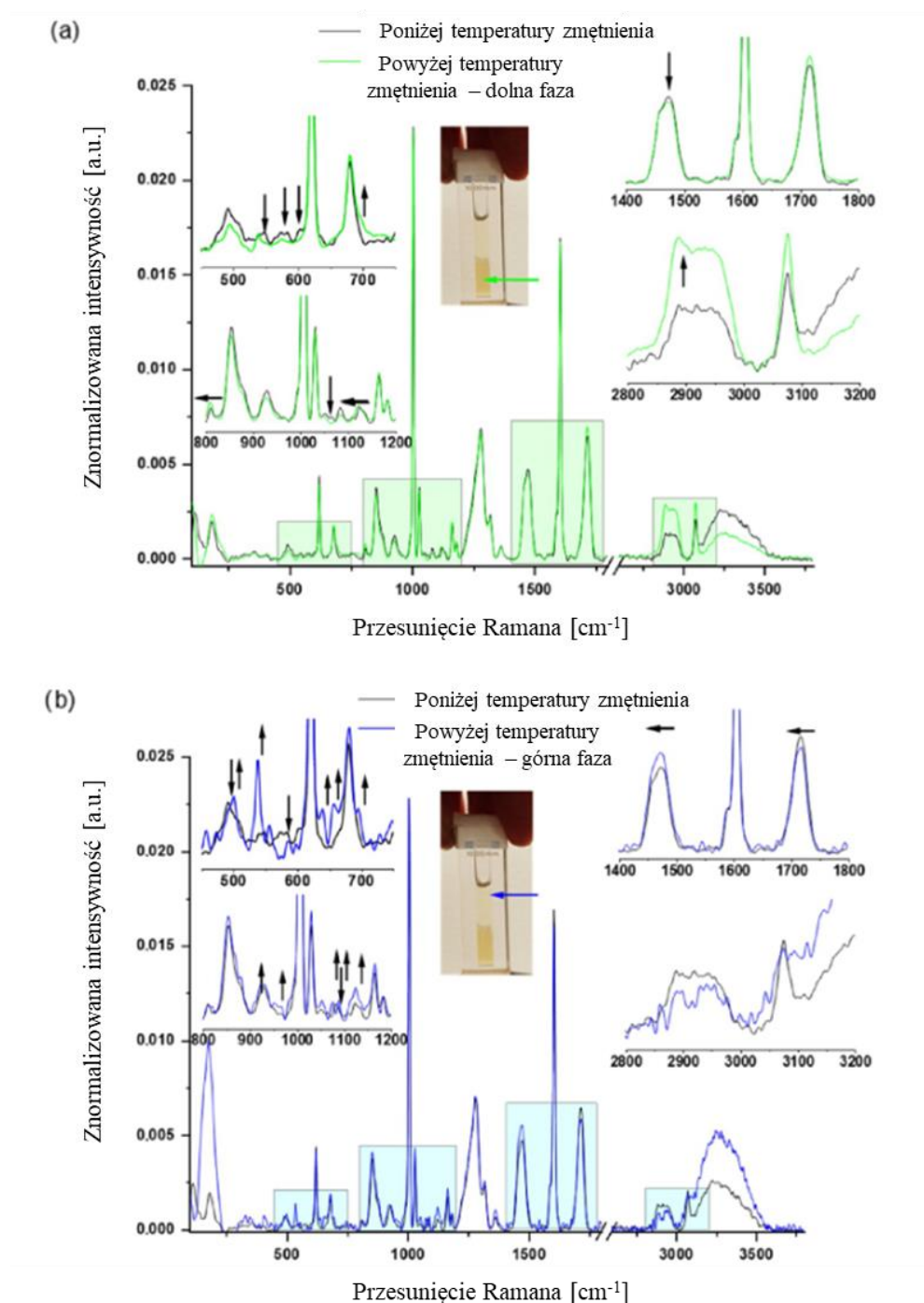
Wstępna analiza otrzymanych widm pozwoliła na potwierdzenie obserwacji wizualnych. Zaobserwowano, że intensywność pasma odpowiadającego drganiom cząsteczek wody (3250 cm^{-1}) w widmie zarejestrowanym dla dolnej fazy jest znacznie niższa niż w widmie zarejestrowanym dla górnej fazy (zmiana widoczna dla obu badanych polimerów) – rysunki 27 oraz 28. Oznacza to, że dolna faza była roztworem bogatym w polimer, natomiast górna faza była roztworem bogatym w wodę, jednak w obu obecne były makrocząsteczki polimeru – co zostało również potwierdzone przy użyciu spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego.



Rysunek 27. Zestawienie widm ramanowskich wodnego roztworu polimeru PC46 z dolną fazą (a) oraz z górną fazą (b) otrzymanymi w wyniku separacji faz powyżej temperatury zmętnienia polimeru PC46. [zaczepnięte z A3]

Widma przedstawione na rysunkach 27 oraz 28 pokazały różnice w zachowaniu makrocząsteczek w zależności od wiązania zastosowanego do wprowadzenia grup hydrofobowych. Okazało się, że widmo dolnej fazy pochodnej uretanowej (rysunek 27a) zmieniło się znacząco w zakresie odpowiadającym drganiom wiązania C=O, to znaczy intensywność pasma przy 1690 cm⁻¹, odpowiadającego drganiom wiązania C=O biorącym udział w wiązaniach wodorowych z wodą spadała, przy jednoczesnym wzroście intensywności pasma przy 1720 cm⁻¹, które odpowiada drganiom niehydratowanych grup karbonylowych

(75,76). Obserwacja takich zmian wskazuje na dehydratację polimeru. Dodatkowo, obserwowano przesunięcie się pasm odpowiadającym drganiom rozciągającym wiązania C-H w pierścieniu aromatycznym (3060 cm^{-1}) w stronę niższych wartości, co wskazuje na dehydratację pierścieni aromatycznych i wzmocnienie oddziaływań π - π pomiędzy pierścieniami fenylowymi.



Rysunek 28. Zestawienie widm ramanowskich wodnego roztworu polimeru BE46 z dolną fazą (a) oraz z górną fazą (b) otrzymanymi w wyniku separacji faz powyżej temperatury zmętnienia polimeru BE46. [zaczernięte z A3]

Najbardziej widoczne zmiany obserwowane dla pochodnej uretanowej występowały w zakresie $1100 - 1150\text{ cm}^{-1}$ oraz $150 - 550\text{ cm}^{-1}$, w których występują pasma odpowiadające drganiom wiązań najbardziej wrażliwych na hydratację oraz zmiany konformacyjne segmentów polieterowych (77). Dodatkowym potwierdzeniem zmian w hydratacji rdzenia polieterowego są obserwowane zmiany pasm przy 960 oraz 1040 cm^{-1} (71).

Porównując wyniki otrzymane dla obu pochodnych, okazało się, że hiperrozgałęziony poliglicydol modyfikowany ugrupowaniami fenyłowymi wprowadzonymi poprzez wiązania estrowe, nie wykazuje tak znaczących zmian w widmie jak w przypadku pochodnej fenylouretanowej. W przypadku pochodnej estrowej nie zaobserwowano zmian w zakresie pasm odpowiadających drganiom wiązań C-H obecnym w pierścieniach fenyłowych. Analizując widmo zarejestrowane dla dolnej fazy zaobserwowano wzrost intensywności pasma przy 2880 cm^{-1} , co świadczy o dehydratacji segmentów glicydolowych (75). Obserwowane różnice pomiędzy pochodnymi fenyłowymi nie mogą zostać wytłumaczone jedynie przez różnicę temperatur, w jakich dochodzi do zmętnienia roztworu polimerowego. Otrzymane wyniki wskazują, że wiązania wodorowe obecne w pochodnej estrowej są znacznie stabilniejsze w wyższych temperaturach, niż te w przypadku pochodnej uretanowej, co świadczy o większej hydrofilowości pochodnej estrowej, pomimo porównywalnego stopnia hydrofobizacji rdzenia HbPGL.

W kolejnym etapie porównano widma ramanowskie dla górnych faz uzyskanych wskutek przejścia fazowego w wodnych roztworach badanych polimerów. W przypadku pochodnej uretanowej – PC46 – nie zaobserwowano znaczących zmian w zakresie drgań wiązań obecnych w pierścieniu aromatycznym oraz grupy karbonylowej, w porównaniu do widma roztworu poniżej temperatury zmętnienia, co świadczy o podobnym uwodnieniu układu przed, jak i po przejściu fazowym. Natomiast, znaczące zmiany obserwowano w intensywnościach pasm 1450 i 1470 cm^{-1} , które odpowiadają drganiom zginającym wiązania eterowego, co bezpośrednio świadczy o zachodzeniu zmian konformacyjnych w strukturze polimeru. Dodatkowym potwierdzeniem zachodzących zmian konformacyjnych są różnice obserwowane w zakresie pasm 1085 oraz $150 - 550\text{ cm}^{-1}$. Mając na uwadze, że makrocząsteczki obecne w górnej fazie pozostają w podobnym stopniu zhydratowane, jak w przypadku makrocząsteczek obecnych w wyjściowym roztworze polimeru, można wnioskować, że w mechanizmie odpowiadającym za termowrażliwość hHbPGL polieterowe segmenty łańcuchów odgrywają znaczącą rolę.

Przeprowadzając analizę zmian zachodzących w widmach zarejestrowanych dla próbki BE46, warto zwrócić uwagę, że w żadnej z utworzonych faz nie odnotowano różnic w drganiach wiązań obecnych w pierścieniu aromatycznym. Co więcej, zmiany obserwowane

w zakresie drgań grup karbonylowych są niewielkie w każdej z badanych faz, co świadczy o dobrej hydratacji tej grupy przed, ale też po osiągnięciu temperatury zmętnienia. W górnej fazie roztworu pochodnej estrowej zaobserwowano niewielkie przesunięcie pasma przy 1720 cm^{-1} w stronę niższych wartości liczb falowych, co wskazuje na częściową dehydratację grupy C=O. W przypadku górnej fazy, otrzymanej w skutek ogrzania roztworu pochodnej estrowej powyżej temperatury zmętnienia, najbardziej widoczne zmiany w widmie ramanowskim zachodziły w zakresie pasm przy $450 - 700$ oraz $1440 - 1490\text{ cm}^{-1}$, które to pasma świadczą o hydratacji oraz zmianie konformacji polieterowych segmentów obecnych w HbPGL. Świadczy to o znaczącym wpływie zmian konformacyjnych łańcuchów polieterowych na efekt zmętnienia wodnych roztworów polimeru.

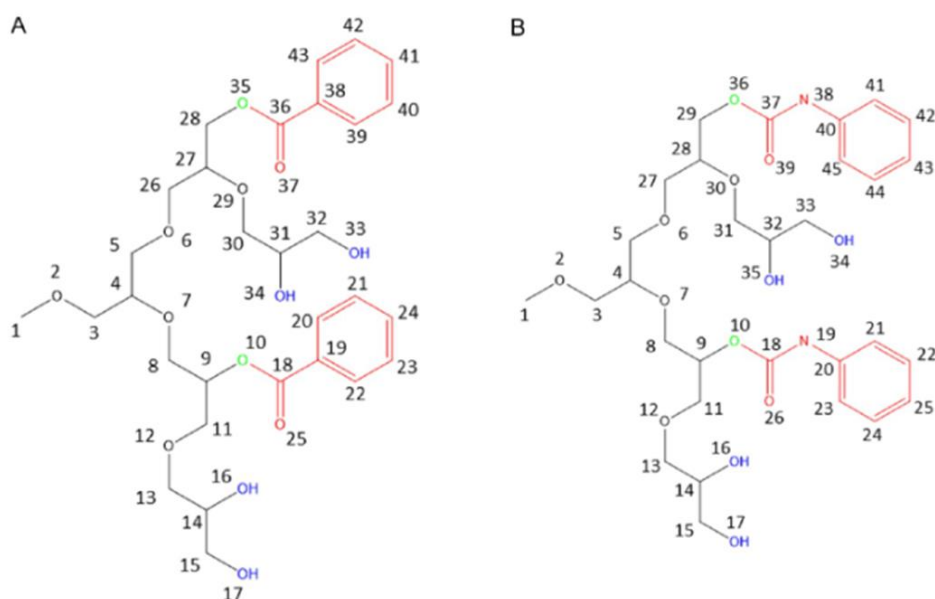
Przeprowadzone badania przy użyciu spektroskopii Ramana wskazują na silniejsze oddziaływania makrocząsteczek pochodnej estrowej z cząsteczkami wody, niż jest to obserwowane w przypadku pochodnej uretanowej, co bezpośrednio wpływa na znaczące różnice w temperaturze zmętnienia wodnych roztworów polimerów o zbliżonym stopniu hydrofobizacji i o tym samym stężeniu. Wyniki analiz spektroskopowych wskazały na wyższą hydrofilowość polimeru zawierającego wiązania estrowe, co jest skutkiem formowania się stabilniejszych wiązań wodorowych pomiędzy grupami karbonyłowymi a cząsteczkami wody w polimerze BE46.

8.3.3. Analiza zachowania termowrażliwego amfifilowych polimerów z wykorzystaniem obliczeń komputerowych

Wyraźne różnice w wartościach temperatury zmętnienia pochodnych HbPGL o podobnym stopniu modyfikacji grupami fenyłowymi przyłączonymi za pomocą wiązań estrowych lub uretanowych oraz wyższa hydrofilowość pochodnej estrowej skłoniły do podjęcia badań z wykorzystaniem obliczeń i symulacji komputerowych.

W pierwszej kolejności wykorzystano do tego celu metodę teorii gęstości funkcyjnego, DFT (z ang. *Density Functional Theory*), która posłużyła do wyznaczenia powierzchni gęstości elektronowej struktur. Metoda ta jest bardzo dokładna, ale struktury o złożonej budowie, jak ma to miejsce w przypadku makrocząsteczek będących obiektem niniejszej pracy, optymalizowane są mało efektywnie. Oszacowano, że obliczenia dla całych makrocząsteczek HbPGL zajęłyby miesiące. W związku z tym postanowiono poddać analizie wyodrębnione elementy hydrofobizowanego hiperrozgałęzionego poliglicydolu, które stanowiły około 1/8 pojedynczej makrocząsteczki. Wyizolowane fragmenty nie przedstawiają wszystkich możliwych izomerów, jednak pozwalają na zbadanie najistotniejszych oddziaływań jakie

zachodzą między pierścieniami fenylowymi, grupami karbonyłowymi, segmentami eterowymi oraz grupami 1,2-diolowymi w konstytucyjnych jednostkach terminalnych.



Rysunek 29. Struktury wyizolowanych fragmentów amfifilowych makrocząsteczek poddane analizie metodą DFT - pochodna estrowa (a) oraz pochodna uretanowa (b). [zaczepnięte z A3]

Przedstawione na rysunku 29 fragmenty struktur zoptymalizowano w próżni metodą DFT. Otrzymane ładunki cząstkowe poszczególnych atomów zestawiono w tabeli 8. Wyznaczone wartości ładunków dostarczyły pierwszych informacji o różnicach pomiędzy obiema pochodnymi. W przypadku pochodnej estrowej atomy tlenu w grupach 1,2-diolowych, obecnych w jednostkach terminalnych, mają najbardziej ujemny ładunek cząstkowy, natomiast najwyższy dodatni ładunek obserwowano dla atomów węgla w wiązaniach karbonylowych. Z kolei w przypadku pochodnej uretanowej HbPGL najniższy ładunek cząstkowy stwierdzono dla atomu azotu, a najwyższy dla atomu węgla w grupie uretanowej.

Dodatkowo analiza DFT pokazała tworzenie się wiązań wodorowych o długości ok. 2 Å, pomiędzy atomami tlenu znajdującymi się w eterowych fragmentach cząsteczki z atomami wodoru obecnymi w grupach hydroksylowych w 1,2-diolach w jednostkach terminalnych. Obserwacja ta dotyczyła obu pochodnych.

W następnym etapie zoptymalizowano fragmenty struktur amfifilowych hiperrozgałęzionych poliglicydoli wraz z cząsteczkami wody w celu analizy zachowania struktury uwodnionej. W przypadku obu pochodnych liczba utworzonych, po optymalizacji układu, wiązań wodorowych pomiędzy polimerem a cząsteczkami wody była zbliżona. Zaobserwowano natomiast różnice w długościach utworzonych wiązań wodorowych. W przypadku pochodnej estrowej wiązania wodorowe miały długości w zakresie 1,8 – 2,3 Å

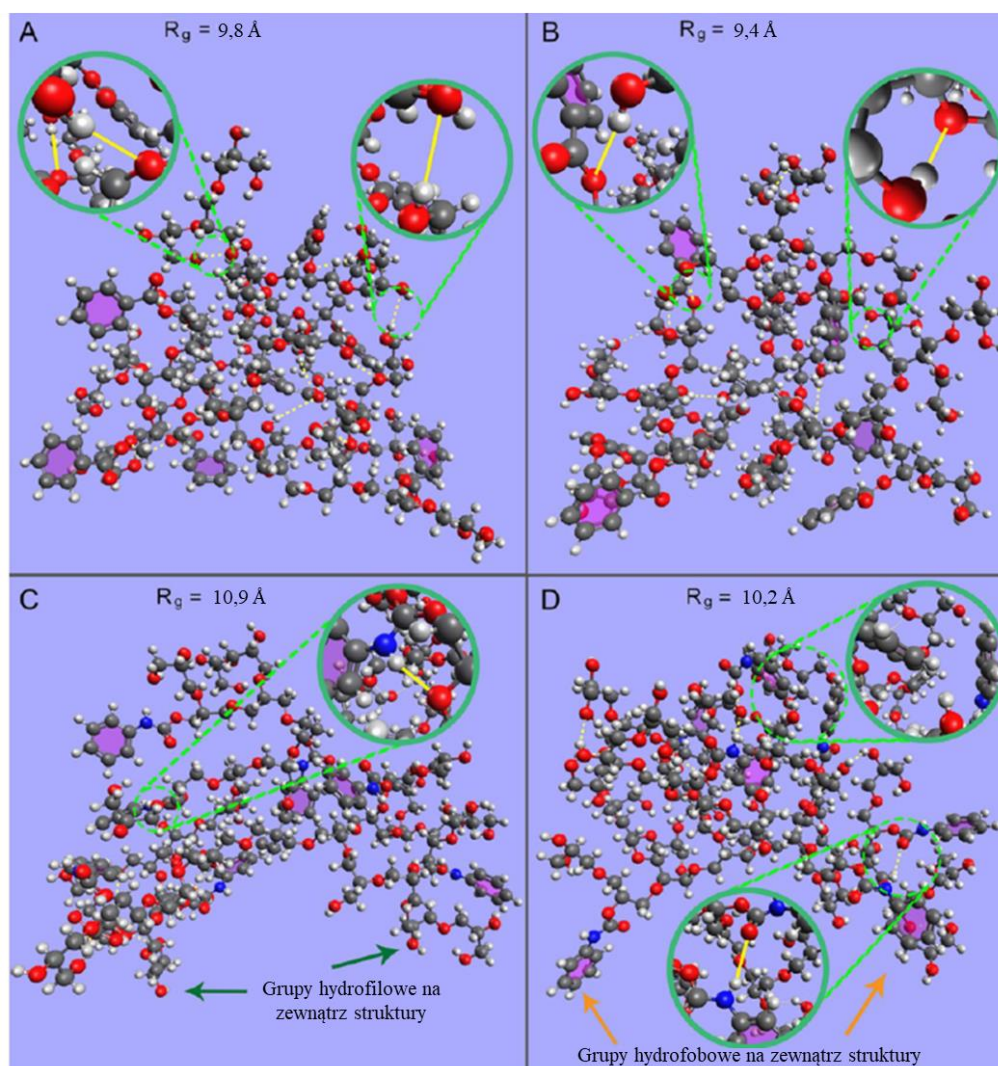
i były dłuższe niż w przypadku pochodnej uretanowej (1,8 – 2 Å). Co więcej, zauważono, że w przypadku próbki PC dodatek wody w środowisku polimeru spowodował zrywanie się wiązań wodorowych wewnątrzcząsteczkowych pomiędzy atomami tlenu grup karbonylowych obecnych w wiązaniu uretanowym a atomami wodoru pochodzącymi z grup 1,2-diolowych obecnych w jednostkach terminalnych. Takie zachowanie nie było obserwowane dla pochodnej estrowej.

Tabela 8. Wartości ładunków cząstkowych wyrażone w jednostkach ładunku elektronowego dla pochodnej estrowej oraz pochodnej uretanowej, wyznaczone metodą Merz-Singh-Kollmana..

Pochodna estrowa						Pochodna uretanowa					
Nr	Atom	Ładunek	Nr	Atom	Ładunek	Nr	Atom	Ładunek	Nr	Atom	Ładunek
1	C	-0,139	24	C	-0,122	1	C	-0,11	24	C	-0,066
2	O	-0,272	25	O	-0,473	2	O	-0,281	25	C	-0,207
3	C	0,045	26	C	-0,299	3	C	-0,019	26	O	-0,452
4	C	-0,085	27	C	0,555	4	C	0,103	27	C	-0,118
5	C	0,337	28	C	-0,179	5	C	0,161	28	C	0,44
6	O	-0,313	29	O	-0,479	6	O	-0,319	29	C	-0,14
7	O	-0,261	30	C	0,071	7	O	-0,336	30	O	-0,503
8	C	-0,199	31	C	0,397	8	C	-0,363	31	C	0,194
9	C	0,084	32	C	0,086	9	C	0,547	32	C	0,283
10	O	-0,333	33	O	-0,544	10	O	-0,536	33	C	0,031
11	C	0,18	34	O	-0,646	11	C	-0,103	34	O	-0,526
12	O	-0,397	35	O	-0,32	12	O	-0,358	35	O	-0,634
13	C	-0,117	36	C	0,7	13	C	-0,092	36	O	-0,388
14	C	0,405	37	O	-0,514	14	C	0,31	37	C	0,942
15	C	0,027	38	C	-0,16	15	C	0,04	38	N	-0,799
16	O	-0,628	39	C	-0,051	16	O	-0,598	39	O	-0,563
17	O	-0,632	40	C	-0,117	17	O	-0,625	40	C	0,539
18	C	0,536	41	C	-0,115	18	C	0,789	41	C	-0,379
19	C	0,021	42	C	-0,135	19	N	-0,617	42	C	-0,037
20	C	-0,097	43	C	-0,048	20	C	0,424	43	C	-0,227
21	C	-0,124				21	C	-0,341	44	C	-0,055
22	C	-0,152				22	C	-0,053	45	C	-0,342
23	C	-0,089				23	C	-0,269			

Otrzymane wyniki obliczeń komputerowych metodą DFT, wskazały, że obecne w grupach karbonylowych w polimerach atomy tlenu są zaangażowane w tworzenie wiązań wodorowych z cząsteczkami wody. Nieoczekiwanie atom azotu o znaczącym ujemnym ładunku cząstkowym, nie tworzył wiązań wodorowych z cząsteczkami wody. Może zostać to wytłumaczone obecnością zawady przestrzennej uniemożliwiającej zbliżenie się atomów na tyle, aby utworzenie wiązania wodorowego było możliwe. Innym wyjaśnieniem może być fakt, że atom tlenu obecny w grupie karbonylowej, pomimo większego ładunku cząstkowego

może tworzyć wiązania wodorowe o mniejszej długości, a co za tym idzie silniejsze, przez co jest bardziej faworyzowany w trakcie tworzenia wiązań wodorowych. W dodatku, badania prowadzone przy użyciu metody DFT pokazały, że część atomów węgla tworzących pierścienie aromatyczny w pochodnej uretanowej wykazuje wyższy potencjał niż jest to obserwowane w przypadku pochodnej estrowej. Jest to skutkiem obecności atomu azotu, o silnie ujemnym ładunku cząstkowym, bezpośrednio związanego z pierścieniem. W związku z tym pierścienie aromatyczne w pochodnej uretanowej są bardziej wyeksponowane poza łańcuchy eterowe niż jest to obserwowane w przypadku pochodnej estrowej.



Rysunek 30. Przykładowe struktury wyizolowane z symulacji makrocząsteczek w wodnych roztworach o stężeniu 150 mg/ml. Zdjęcia przedstawiają struktury polimerów bez cząsteczek wody: pochodną BE50^M w temperaturze 25 °C (a) oraz w temperaturze 80 °C (b) oraz pochodną PC50^M w temperaturze 25 °C (c) oraz 45 °C (d). Wyniki otrzymane przy użyciu potencjałów TIP4P/2005 oraz OPLS-AA. Podane wartości R_g określają wartości promieni bezwładności makrocząsteczek. [zaczepnięte z A3]

Ze względu na liczne ograniczenia metody DFT, chcąc uzyskać lepszą statystykę wiązań wodorowych w badanych układach wykonano również symulacje komputerowe metodą dynamiki molekularnej LAMMPS. Wykorzystanie tej techniki pozwoliło na zbadanie

oddziaływać w całej cząsteczce. Badania przeprowadzono w temperaturach bliskich temperaturom zmętnienia wyznaczonych doświadczalnie dla roztworów polimerów PC46 oraz BE46 o stężeniu 150 mg/ml i wynoszących odpowiednio 40 i 72 °C. Obliczenia komputerowe przeprowadzono dla dwóch makrocząsteczek, uretanowej oraz estrowej pochodnej HbPGL o podobnym stopniu podstawienia: BE50^M oraz PC50^M, w przypadku których 50% liniowych grup monohydroksylowych zostało zmodyfikowane ugrupowaniami fenyłowymi. Symulacje prowadzono powyżej i poniżej wyznaczonej temperatury zmętnienia

Otrzymane wyniki symulacji pokazały, że w przypadku obu pochodnych, PC oraz BE, poniżej temperatury zmętnienia występują wiązania wodorowe pomiędzy atomami wodoru w terminalnych grupach 1,2-diolowych oraz atomami tlenu w polieterowych łańcuchach rdzenia hiperrozgałęzionego poliglicydolu. Ponadto, symulacje ujawniły różnice w położeniu hydrofobowych pierścieni aromatycznych względem hydrofilowych łańcuchów eterowych makrocząsteczki. Okazało się, że w przypadku pochodnej uretanowej, PC, pierścienie fenyłowe są wyeksponowane poza strukturę polimeru, czego nie obserwuje się w przypadku pochodnej estrowej, BE. Można to wytłumaczyć odnosząc się do wyników otrzymanych z obliczeń metodą DFT, gdzie w przypadku pochodnej uretanowej atom azotu o znaczącym ujemnym ładunku cząstkowym, bezpośrednio połączony z pierścieniem aromatycznym powoduje lepszą separację ładunków cząstkowych na atomach węgla obecnych w grupie fenyłowej oraz wyższą polarność całej makrocząsteczki. W dodatku obecność dłuższego wiązania łączącego pierścienie aromatyczny z hiperrozgałęzionym poliglicydołem, w przypadku pochodnej uretanowej w porównaniu do pochodnej estrowej wpływa na większą swobodę ruchów pierścienia aromatycznego w polimerze PC.

Otrzymane wyniki symulacji pokazały, że atom tlenu obecny w grupie karbonyłowej, niezależnie od pochodnej, jest zaangażowany w tworzenie wiązań wodorowych z grupami 1,2-diolowymi obecnymi w jednostkach terminalnych, które z kolei tworzą wiązania wodorowe z cząsteczkami wody obecnymi w układzie. Dodatkowo, dla pochodnej PC zaobserwowano, że wiązanie N-H miało charakter protonodonorowy i tworzyło wiązania wodorowe z atomami tlenu obecnymi w grupach eterowych.

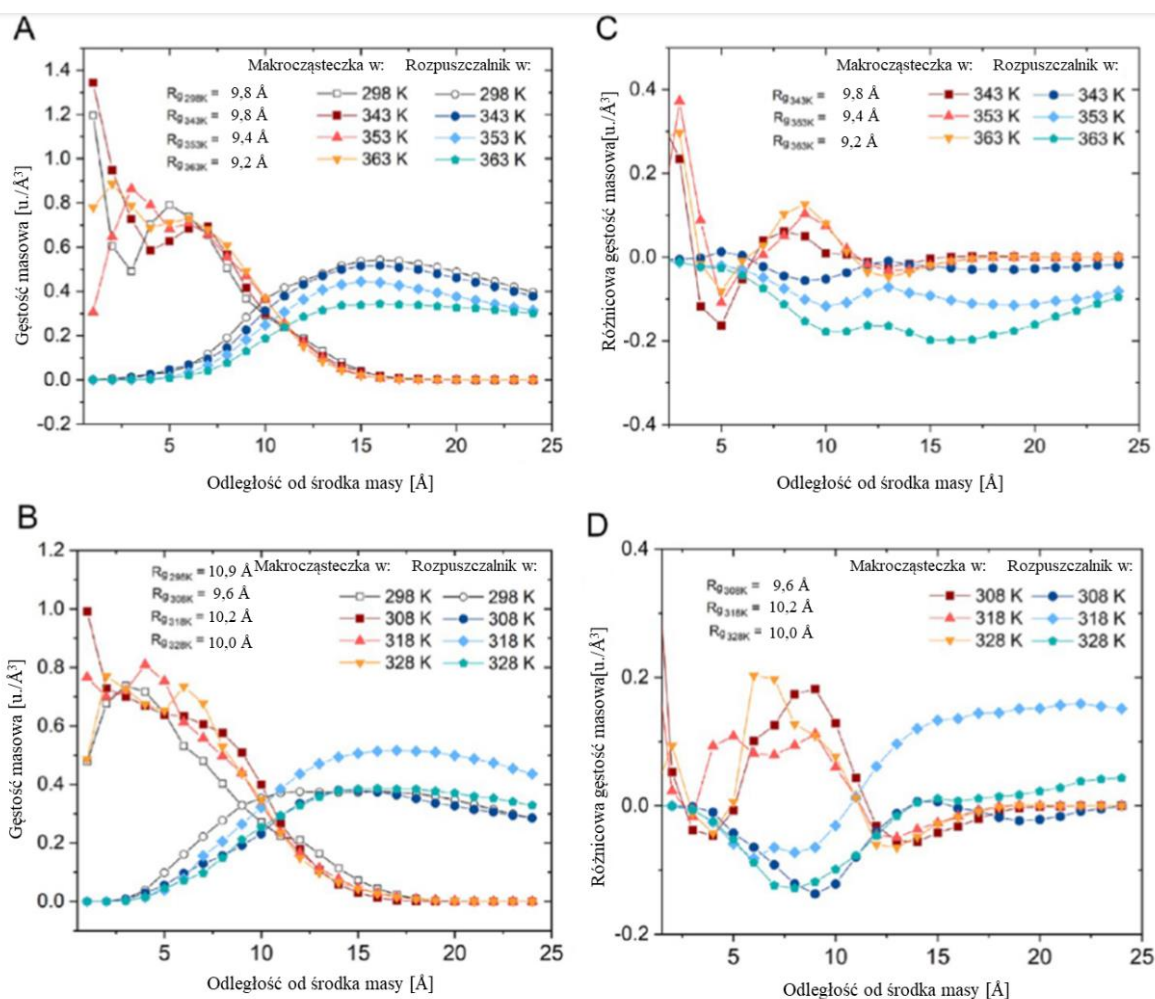
Wzrost temperatury powyżej temperatury zmętnienia spowodował zwiększenie liczby wiązań wodorowych wewnątrzcząsteczkowych w przypadku pochodnej uretanowej, a co za tym idzie zmniejszenie odległości między łańcuchami eterowymi hiperrozgałęzionego poliglicydolu, to znaczy zapadnięcie się struktury polimeru, przy czym obserwowane było jeszcze silniejsze wyeksponowanie pierścieni aromatycznych poza strukturę makrocząsteczki – rysunek 30. Zachowanie takie nie było obserwowane dla pochodnej estrowej. W przypadku

polimeru BE uwodnione łańcuchy eterowe były w bliskiej odległości od pierścieni aromatycznych poniżej, ale również powyżej temperatury zmętnienia, uniemożliwiając oddziaływania między pierścieniami fenyłowymi. Takie zachowanie świadczy o wyższej hydrofilowości pochodnej estrowej względem pochodnej uretanowej, co jest potwierdzeniem obserwacji dokonanych podczas analizy widm otrzymanych metodą spektroskopii Ramana.

Dokonano analizy zmian gęstości masowej wody oraz makrocząsteczek: PC50^M oraz BE50^M, powyżej i poniżej temperatury zmętnienia roztworu – rysunek 31. Pozwoliło to na obserwację zmian strukturalnych, hydratacji oraz promienia bezwładności badanych polimerów. W przypadku pochodnej BE, wraz ze wzrostem temperatury dochodzi do obniżenia wartości promienia bezwładności, co wskazuje na zapadnięcie się tej struktury. Otrzymane wykresy zależności gęstości masowej od odległości od środka masy, wskazały na wypychanie cząsteczek wody ze struktury polimeru, które następowało w skutek wzrostu temperatury w środowisku makrocząsteczki. Obserwowano również nieznaczne przesunięcia się grup fenyłowych na zewnątrz makrocząsteczki, jednak ze względu na zawadę przestrzenną, jaką jest obecność uwodnionych łańcuchów eterowych w pobliżu pierścieni aromatycznych, oddziaływania π - π nie są preferowane w przypadku tej pochodnej.

Przeprowadzone symulacje komputerowe uretanowej pochodnej HbPGL ujawniły bardziej złożony mechanizm termowrażliwości, niż w przypadku pochodnej estrowej. Osiągnięcie temperatury zmętnienia roztworu polimeru PC (40 °C), skutkowało zapadnięciem się łańcuchów polieterowych do wnętrza struktury, przy jednoczesnym silniejszym wyeksponowaniu pierścieni aromatycznych na zewnątrz struktury makrocząsteczki. Jest to efektem zrywania się wiązań wodorowych pomiędzy fragmentami uretanowymi a grupami 1,2-diolowymi obecnymi w jednostkach konstytucyjnych i równoczesnym tworzeniu się oddziaływań π - π pomiędzy wysuniętymi grupami hydrofobowymi.

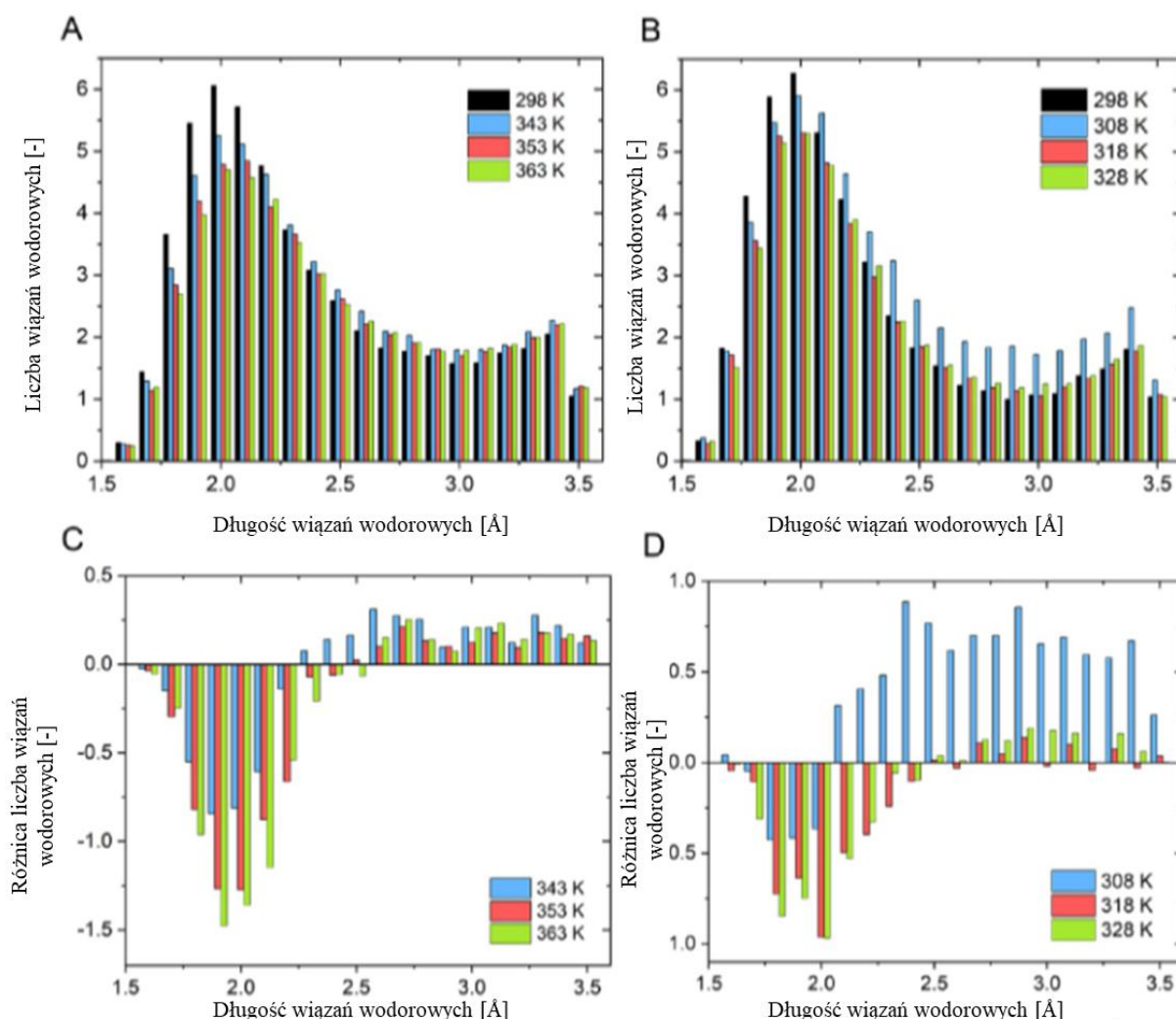
Obliczenia wykonane metodą dynamiki molekularnej pokazały, że w przypadku pochodnej PC, tworzenie się oddziaływań między pierścieniami jest znacznie łatwiejsze niż w przypadku pochodnej BE. Wiąże się to najprawdopodobniej z wyższym potencjałem cząstkowym zlokalizowanym na atomach węgla w pierścieniu aromatycznym w pochodnej uretanowej. Ma to najprawdopodobniej bezpośredni wpływ na znacznie niższą temperaturę zmętnienia tego polimeru.



Rysunek 31. Zależność gęstości masowej od odległości od środka masy makrocząsteczki wyznaczone w temperaturach 25, 70, 80 oraz 90 °C dla pochodnej estrowej (a), w temperaturach 25, 35, 45, 55 °C dla pochodnej uretanowej (b), oraz różnicowe gęstości masowej pochodnej estrowej (c) oraz uretanowej (d) w zależności od odległości od środka masy względem temperatury pokojowej. Wyniki otrzymano korzystając z potencjałów TIP4P/2005 dla wody oraz OPLS-AA dla polimeru. [zacierpnięte z A3]

W przypadku pochodnej uretanowej zaobserwowano również wzrost gęstości masowej cząsteczek wody z obręb makrocząsteczki tuż powyżej temperatury zmętnienia roztworu, co nie było obserwowane w przypadku pochodnej estrowej. Zachowanie takie można tłumaczyć tym, że stosunkowo niska temperatura zmętnienia roztworu polimerowego powoduje, że fragmenty eterowe nadal pozostają dobrze uwodnione, ponieważ wiązania wodorowe między wodą a łańcuchami eterowymi są znacznie stabilniejsze niż pomiędzy grupą uretanową a 1,2-diolami. W związku z tym obserwowany był wzrost promienia bezwładności makrocząsteczki. Zaobserwowano również, że oddziaływania hydrofobowe między pierścieniami w koronie makrocząsteczki prowadziły do oddzielenia tych hydrofobowych domen poprzez dobrze uwodnione fragmenty hydrofilowe, przez co struktura makrocząsteczki stała się bardziej otwarta. Tworzące się hydrofobowe domeny prowadzące do zmętnienia roztworu polimerowego mogą być efektywnie separowane przez dobrze zhydratowane

fragmenty polimerowe. Sytuacja zmienia się, gdy stężenie polimeru w roztworze zwiększa się, ponieważ zwiększa się wtedy możliwość powstawania hydrofobowych oddziaływań międzycząsteczkowych i może dochodzić do nietypowego zachowania termowrażliwego.



Rysunek 32. Liczba wiązań wodorowych o konkretnej długości w zależności od temperatury dla pochodnej estrowej (a) i uretanowej (b) oraz różnica liczby wiązań wodorowych względem liczby wiązań w temperaturze pokojowej dla pochodnej estrowej (c) i uretanowej (d). Wyniki otrzymano korzystając z potencjałów TIP4P/2005 dla wody oraz OPLS-AA dla polimeru. [zaczepnięte z A3]

W celu analizy zmian, jakie zachodzą w makrocząsteczkach w zakresie wiązań wodorowych wraz ze wzrostem temperatury, przygotowano histogramy przedstawiające liczbę wiązań wodorowych przypadającą na makrocząsteczkę w zależności od temperatury – rysunek 32. Przedstawione histogramy wskazują na spadek liczby krótkich wiązań wodorowych wraz ze wzrostem temperatury dla obu badanych pochodnych. Analizując otrzymane wyniki w przypadku pochodnej uretanowej zaobserwowano znaczny wzrost słabych wiązań wodorowych (o długości powyżej 2,5 Å) w temperaturze tuż poniżej temperatury zmętnienia. Po osiągnięciu temperatury zmętnienia dla PC50^M, liczba zarówno słabych jak i silnych wiązań

wodorowych zmniejszyła się. Zrywanie się wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydroksylowymi w polimerze a cząsteczkami wody w temperaturze 45 °C, przy jednoczesnym tworzeniu się wiązań wodorowych wewnątrzcząsteczkowych, powoduje zapadanie się struktury makrocząsteczki polimeru.

W przypadku pochodnej estrowej BE50^M nie zaobserwowano żadnych nagłych zmian w liczbie wiązań wodorowych, ani wewnątrz- ani międzycząsteczkowych. Wraz ze wzrostem temperatury wiązania wodorowe stopniowo zanikały, co świadczyło o łagodnym charakterze przejścia tej makrocząsteczki ze stanu hydrofilowego do hydrofobowego. W przypadku polimeru BE50^M wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe nie były preferowane, a ich liczba zmniejszała się wraz ze wzrostem temperatury.

Dodatkowo, przeprowadzone analizy zmian ilości wiązań wodorowych o długościach między 2,5 – 3,5 Å w trakcie podwyższania temperatury, wykazały, że pochodna PC50^M jest mniej uwodniona niż pochodna BE50^M, co potwierdza jej bardziej hydrofobową naturę.

Zauważono, że wraz ze wzrostem temperatury zerwaniu ulegają dość silne wiązania wodorowe między atomem azotu z grupy N-H, a atomem tlenu, w grupach eterowych, co prowadziło do eksponowania pierścieni aromatycznych poza strukturę makrocząsteczki. Wiązania te są odtwarzane w temperaturze 55 °C, czyli znacznie powyżej temperatury zmętnienia, a ich długość waha się w zakresie 1,5 – 3,5 Å. Tworzenie się wiązań pomiędzy grupami uretanowymi a eterowymi, znajdującymi się w pobliżu grupy karbonylowej, powoduje stabilizację oddziaływań między pierścieniami fenyłowymi i zwiększenie prawdopodobieństwa wystąpienia oddziaływań π - π , co jest zbieżne z zachowaniem zaobserwowanym w widmach ramanowskich. Wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania pomiędzy hydrofilowymi fragmentami makrocząsteczki, powodują silne wypychanie hydrofobowych pierścieni fenyłowych poza strukturę, co ułatwia ich interakcję.

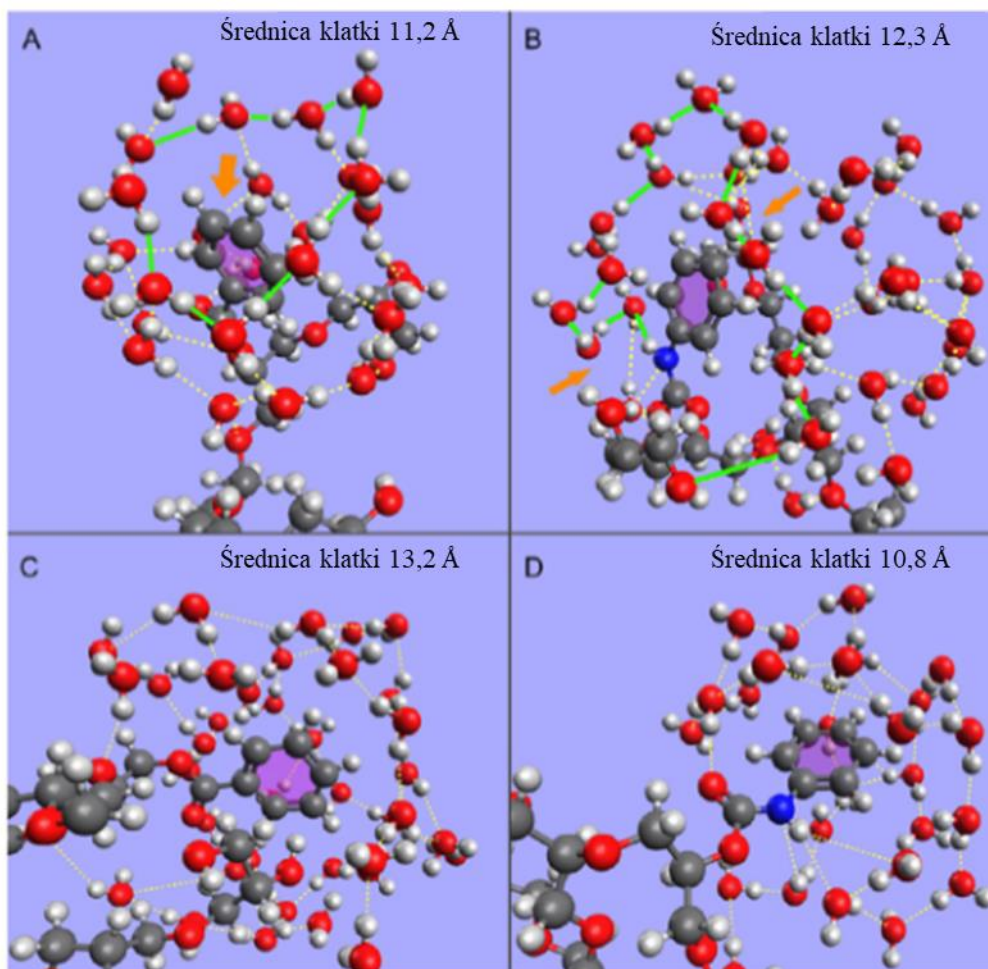
Informacje uzyskane z symulacji komputerowych potwierdzają bardziej hydrofobowy charakter pochodnej PC50^M w porównaniu z pochodną estrową i tłumaczą niższą temperaturę zmętnienia obserwowaną dla pochodnej uretanowej. Pierścienie aromatyczne w pochodnej BE50^M również były wyeksponowane na zewnątrz struktury makrocząsteczki, jednak pozostawały w bliskiej odległości od hydrofilowych łańcuchów polieterowych, które tworzą zawadę do tworzenia się oddziaływań pomiędzy pierścieniami.

Mając na uwadze, że zachowanie termowrażliwe amfifilowych polimerów opiera się na balansie między oddziaływaniami hydrofilowymi i hydrofobowymi, warto przyjrzeć się bliżej pierścieniom aromatycznym obecnym w strukturze polimeru. Hydrofilowe cząsteczki wody nie wchodziły w bezpośrednie reakcje z hydrofobowym pierścieniem aromatycznym, a wiązania

między kolejnymi cząsteczkami wody są zdeformowane w bliskim otoczeniu pierścieni fenylowych i tworzą struktury podobne do klatek – rysunek 33. Zauważono, że poniżej temperatury zmętnienia, cząsteczki wody znajdujące się w pobliżu pierścieni aromatycznych obecnych w pochodnej estrowej tworzą dość regularną i zwięzłą klatkę, otwartą od strony krawędzi pierścienia aromatycznego. Wzrost temperatury spowodował rozluźnienie się klatki. Natomiast w przypadku pochodnej uretanowej, w temperaturze pokojowej, obserwowana klatka była mniej regularna i zwarta, charakteryzowała się większą średnicą i była otwarta od strony powierzchni pierścienia. Wzrost temperatury powyżej temperatury zmętnienia polimeru w danym stężeniu spowodował zapadnięcie się łańcuchów polieterowych, wyeksponowanie pierścieni i utworzenie bardziej zwartej formy klatki wokół nich, przy czym wiązanie N-H w grupie uretanowej nadal uczestniczyło w stabilizacji klatki. Obecność klatek zbudowanych z cząsteczek wody stabilizowała cały układ, w tym pierścienie aromatyczne w zewnętrznej strefie makrocząsteczki. W efekcie obserwowane było zwiększenie się promienia bezwładności makrocząsteczki tuż po osiągnięciu temperatury zmętnienia wodnego roztworu polimeru.

Jak wcześniej wspomniano, nawet powyżej temperatury zmętnienia wodnego roztworu polimeru BE50^M, w pobliżu pierścieni aromatycznych obecne były hydrofilowe łańcuchy polieterowe, które dodatkowo stabilizowały obserwowane klatki wokół pierścieni aromatycznych. W przypadku polimeru PC50^M, efekt ten jednak nie występował. Ekspozycja pierścieni fenylowych otoczonych klatkami zbudowanymi z cząsteczek wody prowadzi do lokalnej separacji faz, co jest procesem niekorzystnym energetycznie i prowadzić może do agregacji pierścieni aromatycznych w większe domeny hydrofobowe.

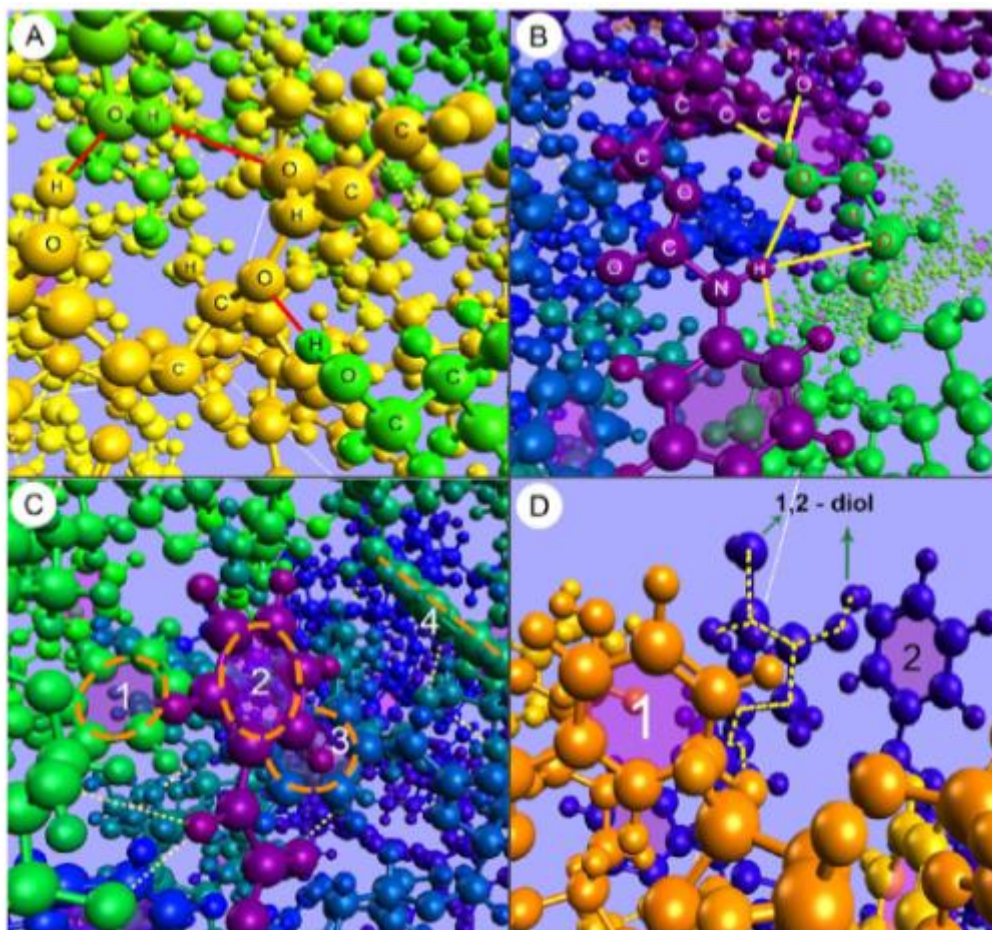
Aby dokonać analizy badanych układów w jeszcze większej skali dokonano symulacji komputerowej umieszczając w środowisku symulacyjnym 10 makrocząsteczek polimeru wraz z cząsteczkami wody odtwarzając stężenie takie jak w symulacjach MD w małej stali, to znaczy 150 mg/ml. Do tego celu użyto programu YASARA, jednego z najszybszych narzędzi do symulacji metodą dynamiki molekularnej. Przeprowadzenie tego typu symulacji pozwoliło na zbadanie procesu agregacji makrocząsteczek w środowisku wodnym, którego efektem jest separacja faz.



Rysunek 33. Zdjęcia przedstawiające zaobserwowane struktury klatek zbudowane z cząsteczek wody wokół pierścieni aromatycznych w przypadku pochodnej BE50^M w temperaturze 25 °C (a) oraz 80 °C (c) i w przypadku pochodnej PC50^M w temperaturze 25 °C (b) i 45 °C (d). Zielone kreski obrazują wiązania wodorowe dookoła otwartej strony klatki, natomiast pomarańczowe strzałki wskazują na położenie otwartej części klatki względem pierścienia aromatycznego. [zaczepnięte z A3]

W przypadku pochodnej uretanowej, obserwowano większą liczbę wiązań wodorowych niż w przypadku pochodnej estrowej. W wyniku podwyższenia temperatury otoczenia, w miejscu zerwanych wiązań wodorowych między grupami hydroksylowymi w 1,2-diolach a cząsteczkami wody, powstaje duża liczba wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych pomiędzy grupą N-H a grupami 1,2-diolowymi w jednostkach terminalnych. Powyżej temperatury zmętnienia dochodziło do tworzenia klastrów hydrofobowych pomiędzy aromatycznymi pierścieniami – rysunek 34. Najczęściej obserwowane były oddziaływania między pierścieniami ustawionymi do siebie pod kątem około 90°. W temperaturze poniżej temperatury przejścia fazowego polimeru obserwowano znacznie mniejszą liczbę interakcji między pierścieniami, głównie ze względu na zawadę sferyczną w postaci rozprostowanych łańcuchów polieterowych w pobliżu pierścieni aromatycznych. Z tego samego powodu,

w przypadku pochodnej BE, oddziaływania między pierścieniami były rzadziej obserwowane, bez względu na temperaturę w jakiej prowadzono symulacje.



Rysunek 34. Zbliżenia na wybrane fragmenty struktur po zakończeniu symulacji – kolory atomów zostały wybrane tak, aby jak najlepiej przedstawić informację, z której makrocząsteczki pochodzą. Cząsteczki wody zostały usunięte, dla lepszego uwidocznienia oddziaływań zachodzących pomiędzy makrocząsteczkami. Zdjęcia przedstawiają: międzycząsteczkowe wiązania wodorowe, w które zaangażowane są atomy tlenu w grupach eterowych oraz grupy hydroksylowe w przypadku pochodnej PC50^M poniżej temperatury zmętnienia (a), międzycząsteczkowe oddziaływania, w których udział biorą grupy uretanowe powyżej temperatury zmętnienia polimeru PC50^M (b), zgrupowane pierścienie aromatyczne w pochodnej PC50^M powyżej temperatury zmętnienia (c) oraz zawada sferyczna w postaci łańcucha oligoglicydylowego uniemożliwiająca oddziaływania π - π pomiędzy grupami fenylowymi w przypadku pochodnej BE50^M powyżej temperatury zmętnienia (d).

[zaczepnięte z A3]

Przeprowadzone symulacje komputerowe wraz z badaniami przy użyciu spektroskopii Ramana pozwoliły poznać mechanizmy odpowiadające za przejście fazowe obserwowane w wodnych roztworach hydrofobizowanego hiperrozgałęzionego poliglicydołu. Zachowanie termowrażliwe badanych polimerów zależy od równowagi pomiędzy oddziaływaniami hydrofobowymi i hydrofilowymi wewnątrz i pomiędzy makrocząsteczkami. Obserwowana separacja faz jest bezpośrednim wynikiem obecności silnie hydrofobowych grup w strukturze makrocząsteczki i jest hamowana przez uwodnione łańcuchy hydrofilowe rozdzielające pierścienie aromatyczne. Przeprowadzone badania pokazały, że aby doprowadzić do separacji

faz konieczne jest podwyższenie temperatury wodnego roztworu polimeru, co skutkuje zrywaniem wiązań wodorowych między polimerem a cząsteczkami wody. Przeprowadzona w ten sposób dehydratacja struktury zwiększa możliwość tworzenia się oddziaływań π - π pomiędzy pierścieniami fenyłowymi, których siła wzrasta wraz ze wzrostem temperatury, prowadząc do agregacji pierścieni aromatycznych w większe domeny hydrofobowe. Pojawiające się domeny hydrofobowe prowadzą do zwiększenia hydrofobowości układu, a następnie do wyizolowania polimeru z wody.

Biorąc pod uwagę mechanizmy odpowiadające za zachowanie termowrażliwe *hHbPGL*, obserwowana dla tych układów zależność, to znaczy wzrost temperatury zmętnienia roztworu wraz ze wzrostem stężenia w szerokim zakresie stężeń, wynika z równomiernego rozmieszczenia pierścieni aromatycznych w strukturze rozgałęzionej i obecności silnie uwodnionych, giętkich łańcuchów polieterowych, które zapewniają możliwość reorganizacji makrocząsteczki podczas podwyższania temperatury.

8.3.4. Wnioski

Przeprowadzone badania wykazały znaczące różnice w zachowaniu amfifilowego hiperrozgałęzionego poliglicydolu w jego wodnych roztworach w zależności od sposobu modyfikacji polimeru. Okazało się, że pochodne modyfikowane grupami fenyłowymi wprowadzonymi poprzez wiązanie uretanowe wykazują wyższą hydrofobowość niż te modyfikowane poprzez wiązanie estrowe. Wyznaczone na podstawie badań turbidymetrycznych temperatury zmętnienia okazały się znacznie niższe dla bardziej hydrofobowych pochodnych PC, przy takich samych stężeniach i zbliżonych stopniach podstawienia do pochodnych BE. Nieoczekiwanie otrzymano niesymetryczne wykresy fazowe, przy czym w zakresie stężeń istotnych z aplikacyjnego punktu widzenia wodne roztwory polimerów wykazywały podwyższenie temperatury przejścia fazowego wraz ze wzrostem stężenia polimeru – co należy uznać za zachowanie anomalne.

Przeprowadzone symulacje komputerowe, podparte badaniami z wykorzystaniem spektroskopii Ramana, pozwoliły wytłumaczyć mechanizmy zachodzące w badanych roztworach i obserwowane różnice pomiędzy badanymi pochodnymi.

Właściwości hydrofobowe polimeru PC wynikały z wypychania pierścieni fenyłowych na zewnątrz makrocząsteczki, czego nie obserwowano w przypadku pochodnej estrowej wskutek efektywnego ekranowania pierścieni aromatycznych przez uwodnione łańcuchy polieterowe. W efekcie pochodna uretanowa wykazuje większą tendencję do tworzenia oddziaływań π - π .

Obserwowany wzrost temperatury zmętnienia wodnego roztworu amfifilowego hiperrozgałęzionego polimeru wraz ze wzrostem jego stężenia jest wynikiem równowagi pomiędzy wiązaniami wodorowymi tworzącymi się pomiędzy hydrofilowymi fragmentami polimeru a cząsteczkami wody, a hydrofobowymi oddziaływaniami π - π między pierścieniami fenyłowymi. Zwiększenie stężenia polimeru prowadziło do zwiększenia prawdopodobieństwa oddziaływań między pierścieniami pochodzącymi od różnych molekuł, co sprzyjało formowaniu hydrofobowych agregatów.

Podsumowując, do najważniejszych osiągnięć tej części pracy należy zaliczyć poznanie mechanizmów termowrażliwości hydrofobizowanych przy użyciu grup fenyłowych hiperrozgałęzionych poliglicydoli. Przeprowadzone analizy potwierdziły bardziej hydrofobowy charakter pochodnej uretanowej względem pochodnej estrowej. Wyjaśniono również zaobserwowany w szerokim zakresie stężeń wzrost temperatury zmętnienia wodnego roztworu polimeru zachodzący wraz ze wzrostem jego stężenia. Przeprowadzone symulacje komputerowe, podparte doświadczeniami i analizą z użyciem spektroskopii Ramana rzuciły światło na dotąd nieznane zachowanie hiperrozgałęzionego poliglicydolu o rdzeniu modyfikowanym grupami fenyłowymi wprowadzonymi poprzez wiązania uretanowe lub estrowe i mogą wskazać drogę do syntezy podobnych układów.

8.4. Badania nieopublikowane

8.4.1. Amfifilowy hiperrozgałęziony poliglicydol w terapii przeciwnowotworowej

Jak wcześniej wspomniano, choroby nowotworowe nadal stanowią ogromne niebezpieczeństwo dla społeczeństwa. Wśród najczęściej występujących nowotworów u kobiet wymienić należy nowotwór szyjki macicy. Celem tej części pracy było wytworzenie hydrożelowej matrycy do dostarczania leku przeciwnowotworowego, który mógłby działać w miejscu chorobowo zmienionym. Przeprowadzone badania zostały opisane w manuskrypcie A4.

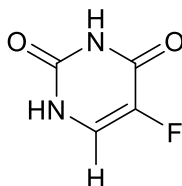
8.4.1.1. Synteza amfifilowych polimerów na bazie hiperrozgałęzionego poliglicydolu i enkapsulacja leku

Do realizacji tego zadania wykorzystano hiperrozgałęziony poliglicydol o wnętrzu modyfikowanym ugrupowaniami hydrofobowymi przy użyciu estrów benzoilowych, grup fenylouretanowych oraz bifenylouretanowych – tabela 9. Polimery zostały otrzymane w wyniku syntezy opisanej wcześniej.

Tabela 9. Charakterystyka hiperrozgałęzionego poliglicydolu modyfikowanego grupami hydrofobowymi.

Polimer	Udział molowy jednostek monohydroksylowych modyfikowanych jednostkami hydrofobowymi [mol %]	Liczba grup hydrofobowych przypadająca na jedną makrocząsteczkę	Tg [°C] (DSC)
HbPGL_PC30	12,2	19,5	3,4
HbPGL_PC42	17,4	27,8	13
HbPGL_BE45	18	28,8	1,9
HbPGL_BPh40	16	25,6	33,4

Jako substancję o działaniu przeciwnowotworowym wytypowano 5-fluorouracyl (5-FU). Związek ten jest analogiem uracylu, w którym atom wodoru w pozycji C-5 zastąpiony został atomem fluoru (78) – rysunek 35. Jest to lek o silnie ograniczonej rozpuszczalności w wodzie (11 mg/ml (79)) ze względu na jego zdolność do formowania fibryli w środowisku wodnym, w tym w warunkach fizjologicznych, przez co jego biodostępność jest niewielka. Wprowadzenie różnych grup funkcyjnych do struktury HbPGL powinno zapobiegać agregacji 5-FU.



Rysunek 35. Struktura chemiczna 5-fluorouracylu.

Omawiany lek jest powszechnie stosowany w leczeniu nowotworów piersi i jelita grubego (80). 5-fluorouracyl charakteryzuje się krótkim okresem półtrwania w osoczu (15-20 minut), w związku z czym, aby osiągnąć stężenie terapeutyczne leku wymagane jest podawanie wysokich dawek (81). Co więcej, lek ten nie działa selektywnie, oznacza to, że w trakcie leczenia substancja wpływa niekorzystnie również na prawidłowe komórki obecne w ciele pacjenta, prowadząc do wyniszczenia organizmu (78). Mając na uwadze powyższe fakty, otrzymanie systemów hydrożelowych, umożliwiających podanie leku bezpośrednio do miejsca zmienionego chorobowo jest niezwykle ważne.

Z tego względu zaenkapsulowano 5-fluorouracyl w wybranych konstrukcjach na bazie *h*HbPGL. Do tego procesu wybrano metodę odparowania rozpuszczalnika, to jest metanolu. W wyniku przeprowadzonych enkapsulacji uzyskano konstrukty zawierające 5, 10 lub 20

cząsteczek leku na makrocząsteczkę polimeru. Tak otrzymane próbki poddano testom cytotoksyczności.

8.4.1.2. Badania cytotoksyczności konstruktów lek-polimer wobec komórek prawidłowych i nowotworowych

Testy cytotoksyczności roztworów czystych polimerów oraz konstruktów z zaenkapsulowanym lekiem przeprowadzono stosując linię ludzkich komórek śródbłónka mikronaczyniowego skóry, HMEC (z ang. *Human Microvascular Endothelial Cells*) oraz linię ludzkich komórek śródbłónka raka szyjki macicy, HeLa (z ang. *Human Cervical Cancer Endothelial Cells*). Otrzymane wyniki zestawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Zestawienie wyników działania roztworów polimerów, leku oraz formulacji polimeru z lekiem na linie komórkowe w różnych przedziałach czasowych..

			HeLa		HMEC-1	
Nazwa próbki	Polimer	Stosunek 5FU:polimer	24 h	48 h	24 h	48 h
	PC30	-	>300	>300	>300	>300
	PC42	-	>300	>300	>300	>300
	BE45	-	>300	>300	>300	>300
	BPh40	-	>300	>300	>300	>300
5-FU	-		>300	>300	>300	>300
CAP168	PC30	5	73,46±2,54	1,13±6,24	>300	87,60±5,59
CAP156	PC30	10	>300	>300	>300	22,04±4,20
CAP245	PC30	20	>300	15,46±7,67	>300	>300
CAP169	PC42	5	>300	37,49±4,42	>300	>300
CAP157	PC42	10	>300	59,3±4,82	>300	>300
CAP246	PC42	20	>300	8,02±6,05	>300	>300
CAP170	BE45	5	>300	>300	>300	16,62±2,86
CAP158	BE45	10	>300	>300	>300	18,42±2,24
CAP247	BE45	20	>300	25,15±4,85	>300	>300
CAP172	BPh40	5	257,86±6,14	17,59±3,00	>300	41,05±5,83
CAP171	BPh40	10	>300	25,98±3,52	>300	27,86±2,38
CAP248	BPh40	20	>300	2,92±6,97	>300	170,68±5,03

Przedstawione dane świadczą o tym, że wytworzone polimery nie wykazują cytotoksyczności względem przygotowanych linii komórkowych. Taki sam wniosek można wysnuć z eksperymentu działania czystego leku na szczepy komórek. Natomiast enkapsulacja 5-fluorouracylu w *hHbPGL* doprowadziła do pożądanego działania 5-FU na komórki nowotworowe. Jednak w większości przypadków, działanie to uzyskano dopiero po 48 godzinach inkubacji.

Wykonane testy pokazują, że najlepsze działanie mają polimery z zaenkapsulowanym lekiem w stosunku 1:20. W większości przypadków badane materiały wykazały toksyczność również względem komórek prawidłowych, HMEC-1, jednak należy zauważyć, że efekt cytotoksyczności był mniejszy niż ten uzyskany względem komórek nowotworowych.

Spśród przebadanych polimerów jedynie pochodna uretanowa o stopniu podstawienia liniowych grup monohydroksylowych równym 42% molowych wykazała selektywność w działaniu toksycznym, to znaczy komórki prawidłowe nie zostały zabite, również po 48 godzinach inkubacji.

8.4.1.3. Tworzenie hydrofobizowanych hydrożeli z zaenkapsulowanym lekiem oraz testy cytotoksyczności otrzymanych systemów.

Hydrożelowe nośniki 5-FU otrzymano na drodze odwracalnego sieciowania hydrofobizowanego hiperrozgałęzionego poliglicydołu kwasem borowym wbudowanym w strukturę poliakrylamidu. Przeprowadzono testy cytotoksyczności roztworów homopolimeru akrylamidowego oraz kopolimeru poly(AM-*ran*-2-AAPBA) i ich konstruktu z lekiem. Testy przeprowadzono dla kopolimerów o różnym stosunku akrylamidu do kwasu borowego. Otrzymane wyniki testów przedstawiono w tabeli 11.

Tabela 11. Zestawienie wyników przeprowadzonych testów cytotoksyczności roztworów polimerów z lekiem jak i bez wobec komórek prawidłowych i nowotworowych w przedziałach czasowych.

		HeLa		HMEC-1	
Polimer	5FU	24 h	48 h	24 h	48 h
Homopolimer	-	>300	>300	>300	>300
70/30	-	>300	247,36±4,03	>300	>300
80/20	-	>300	>300	>300	>300
90/10	-	>300	235,17±7,66	>300	>300
70/30	+	>300	148,60±2,64	>300	>300
80/20	+	137,56±4,93	103,80±3,81	>300	>300
90/10	+	161,36±8,48	33,32±4,80	>300	>300

Przeprowadzone testy pokazały, że homopolimer i badane kopolimery nie są toksyczne dla żadnej z przetestowanych linii komórkowych. Jednak dodatek leku do kopolimerów aktywował selektywne działanie przeciwnowotworowe 5-fluorouracylu – tabela 11. Efekt taki nie był obserwowany dla układu zawierającego homopolimer akrylamidowy i lek.

Biorąc jednak pod uwagę najkorzystniejszy wpływ kopolimeru o relacji molowej akrylamidu i 2-AAPBA 90/10 na działanie przeciwnowotworowe 5-FU do przygotowania hydrożelowych nośników leku wybrano ten układ.

Testy cytotoksyczności przeprowadzono poprzez nałożenie hydrożeli na płytki zawierające linie komórkowe i analizę wpływu badanych układów na komórki po 24 godzinach. Przeprowadzono testy również dla systemów hydrożelowych nie zawierających leku, które wykazały, że otrzymane hydrożele nie są toksyczne dla żadnej z testowanych linii komórkowych. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 12.

Co ciekawe, przeprowadzone badania wykazały znacznie szybsze działanie przeciwnowotworowe leku zamkniętego w hydrożelowym nośniku, niż w przypadku samych konstruktów polimerowych. Okazało się, że w przeciwieństwie do wodnych roztworów polimerów z zaenkapsulowanym lekiem, gdzie konieczny był czas inkubacji wynoszący 48 godzin, w przypadku hydrożeli efekt uśmiercenia znacznej liczby komórek nowotworowych obserwowany był już po 24 godzinach. Otrzymany wynik wskazuje, że korzystając z systemu hydrożelowego czas konieczny do oddziaływania leku z miejscem chorobowo zmienionym byłby znacznie krótszy niż w przypadku wodnych roztworów, co zapewnia mniejsze narażenie komórek prawidłowych na toksyczne działanie leku.

Tabela 12. Wyniki analizy wpływu nośników leku na żywotność komórek prawidłowych oraz nowotworowych, po 24 godzinach inkubacji, wyrażone w procentach wzrostu lub spadku liczebności żywych komórek.

Polimer	PC30			PC42			BE45			BPh40		
Stosunek 5-FU:polimer	5	10	20	5	10	20	5	10	20	5	10	20
HeLa	-98,9	+9,4	-97,6	-51	+7,8	-98,7	-99,8	-99,9	-94,1	+11,4	+20,8	-100
HMEC-1	-1,9	-24,7	-21,7	+23,5	-6,2	-14,9	-6,1	-28,4	-36,1	Zahamowanie wzrostu		

8.4.1.4. Podsumowanie

Podsumowując, przeprowadzone badania na dwóch wybranych liniach komórkowych wykazały, że sam 5-fluorouracyl nie wykazuje najlepszych właściwości przeciwnowotworowych. Po zakotwiczeniu leku w strukturze hydrofobizowanego HbPGL

okazało się, że zastosowanie nośnika leku zwiększyło jego działanie, chociaż efekt uśmiercania komórek najczęściej obserwowany był dopiero po 48h. Sprawdzono również wpływ działania kopolimerów akrylamidowych o różnym udziale molowych akrylamidu do 2-AAPBA, który wykazał znaczne polepszenie działania substancji aktywnej względem komórek nowotworowych, przy jednoczesnym działaniu selektywnym.

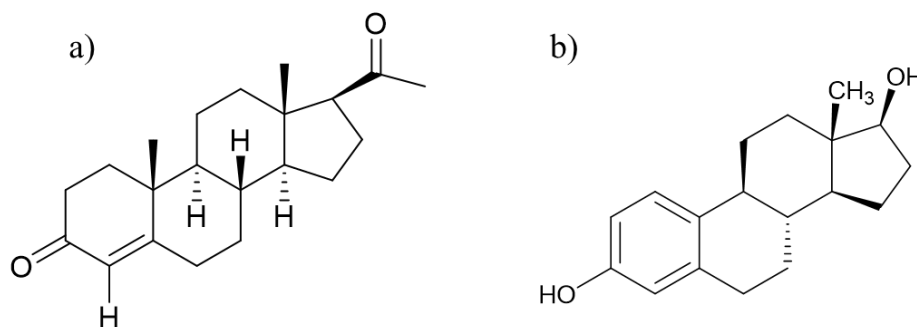
Znając właściwości komponentów do wytworzenia hydrożeli wybrano kopolimer o stosunku molowym 90/10, jako że prezentował najlepsze wyniki w zakresie śmiertelności komórek nowotworowych pod wpływem tego polimeru zmieszanego z lekiem. Wytworzone żełe o dynamicznych węzłach sieci wykazały znacznie szybsze działanie względem komórek nowotworowych – efekt obserwowany był już po 24 h. Co więcej, w przypadku żeli wytworzonych z pochodnej fenylouretanowej oraz bifenylouretanowej, można mówić o selektywności działania otrzymanych hydrożeli. To znaczy obserwowano uśmiercanie komórek nowotworowych przy niewielkim wpływie na żywotność komórek prawidłowych, na przykład w przypadku polimeru PC42 o stosunku molowych polimeru do 5-fluorouracylu 1:20 zaobserwowano śmiertelność komórek nowotworowych na poziomie około 99%, przy czym tylko niecałe 15% komórek prawidłowych zostało zabitych. Otrzymanie nośnika leku przeciwnowotworowego, który wykazuje selektywne działanie przeciwnowotworowe jest kluczowym zadaniem, mającym na celu zwiększenie efektywności terapii onkologicznych przy jednoczesnym zwiększeniu komfortu życia pacjentów.

8.4.2. Zwiększenie rozpuszczalności hormonów

Biorąc pod uwagę również problemy i choroby ginekologiczne, które wymagają stosowania leczenia hormonalnego oraz trudności wynikające ze stosowania aktualnie dostępnych form leczenia, takich jak zastrzyki, globulki czy terapia doustna (82) podjęto również próbę wytworzenia nośnika dostosowanego do tej grupy leków. Celem takiego nośnika jest zwiększenie rozpuszczalności hormonów w wodzie, dzięki czemu można byłoby osiągnąć ich lepszą biodostępność, co dałoby możliwość ograniczenia ilości stosowanych dawek, zwiększając tym samym komfort życia kobiet cierpiących na zaburzenia hormonalne.

8.4.2.1. Hormony stosowane w terapiach ginekologicznych

Progesteron (PGT) i estrogen (EST) są głównymi hormonami stosowanymi w terapiach ginekologicznych. Hormony te są do siebie zbliżone strukturalnie – rysunek 36.



Rysunek 36. Schemat przedstawiający wzór strukturalny progesteronu (a) oraz estradiolu (b).

Progesteron jest naturalnym hormonem steroidowym, który odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu prawidłowej fizjologii żeńskiego układu rozrodczego. Jest powszechnie stosowany w celu podtrzymania ciąży, zapobiegając przedwczesnemu porodowi, w trakcie fazy lutealnej wspomaga zapłodnienia *in vitro*. Stosowany jest także w zastępczej terapii hormonalnej, czy podczas leczenia przerostu endometrium (22,82). Jest silnie hydrofobowy, co skutkuje bardzo słabą rozpuszczalnością w środowisku wodnym (10 µg/ml(22)) i niską biodostępnością.

Innymi często stosowanymi hormonami w terapiach ginekologicznych są estrogeny, przy czym najczęściej używany jest estradiol. Jest on bardzo trudno rozpuszczalny w wodzie (3,9 µg/ml (83)). Jest lekiem stosowanym w antykoncepcji, leczeniu zrostów śródmaciczych oraz w hormonalnej terapii zastępczej (18,23,84).

8.4.2.2. Wytworzenie systemu dostarczającego leki

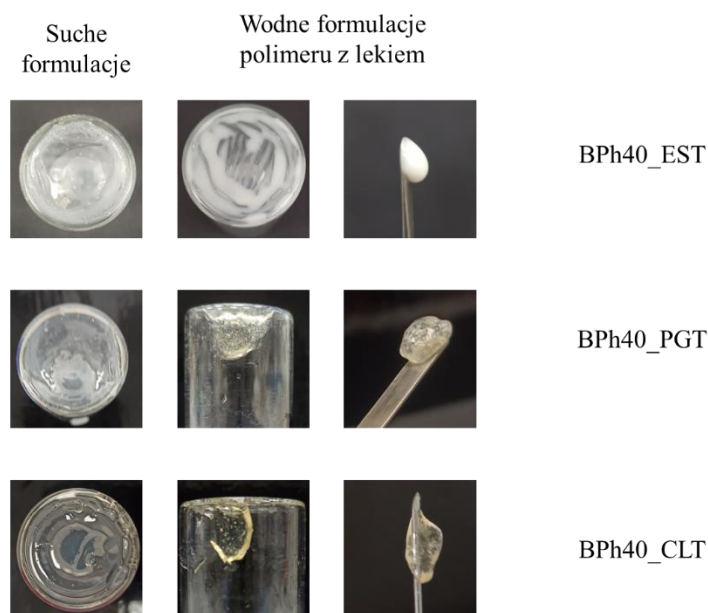
Obserwując bardzo efektywne działanie hydrofobizowanych hiperrozgałęzionych poliglicydoli, jako rozpuszczalników związków trudno rozpuszczalnych w wodzie, postanowiono wykonać próbę enkapsulacji hormonów w struktury na bazie HbPGL.

Do eksperymentu enkapsulacji wytypowano hiperrozgałęziony poliglicydol modyfikowany ugrupowaniami bifenylowymi wprowadzonymi poprzez wiązania uretanowe, o stopniu modyfikacji grup monohydroksylowych równym 40%, ze względu na bardzo dobre wyniki tej pochodnej w testach enkapsulacji klotrimazolu. Przygotowano formułacje o tym samym stopniu enkapsulacji z wykorzystaniem różnych substancji aktywnych – tabela 13. Z tak przygotowanych próbek podjęto próbę wytworzenia żeli sieciowanych kopolimerem kwasu borowego oraz wodne formułacje na bazie polimeru, leku i wody.

Tabela 13. Zawartość hormonów i polimerów w wytworzonych formulacjach.

Formulacja	Stosunek molowy leku do polimeru
BPh40_EST	16
BPh40_PGT	16
BPh40_CLT	16

Po próbie przygotowania hydrożeli sieciowanych poli(AM-*ran*-2-AAPBA) na bazie próbek BPh40_PGT, BPh40_EST oraz BPh40_CLT okazało się, że oddziaływania polimeru z lekiem mają dominujący udział, przez co zaburzona została możliwość tworzenia dynamicznych węzłów sieci pomiędzy polimerem HbPGL a kopolimerem kwasu borowego. W efekcie otrzymane hydrożele straciły zdolność do samonaprawy sieci polimerowej. Z uzyskanych próbek próbowano również utworzyć wodne formulacje polimeru z lekiem. Wytworzone materiały charakteryzowały się zwiększoną lepkością, jednak ani progesteron, ani estradiol nie oddziaływały na tyle silnie z polimerem, żeby utworzyć tak lepkie formulacje, jak miało to miejsce w przypadku klotrimazolu. Przygotowane formulacje przedstawiono na rysunku 37.



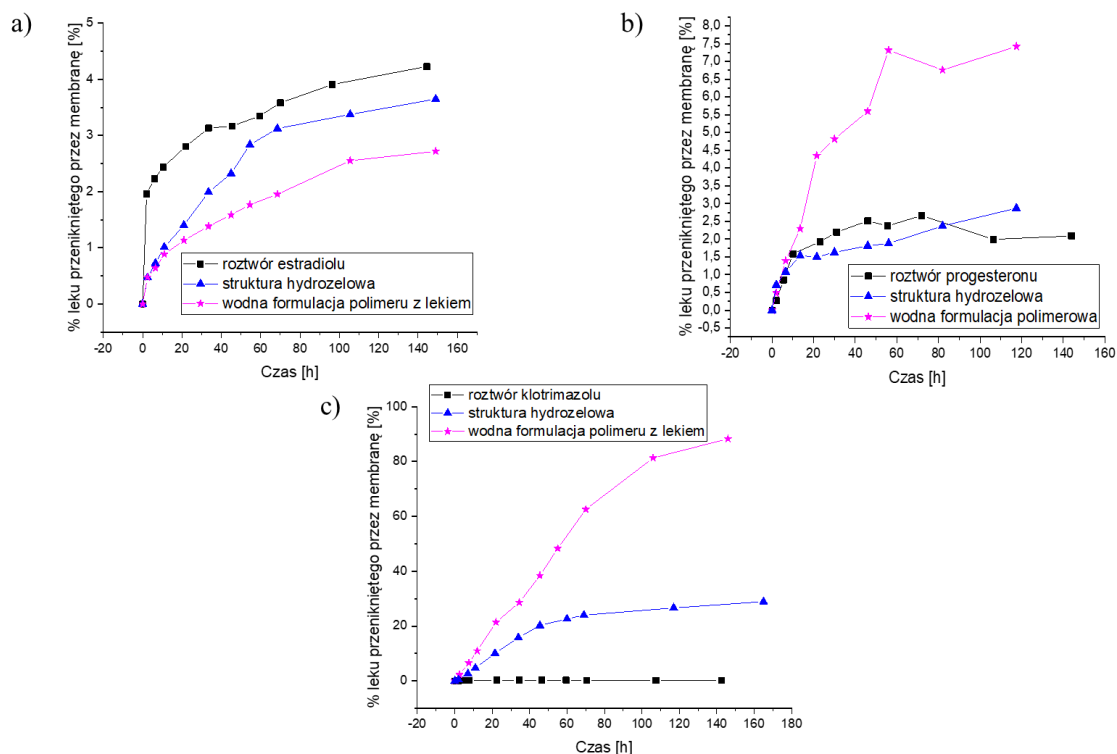
Rysunek 37. Zestawienie zdjęć wykonanych przed i po uwodnieniu polimerowych formulacji z lekiem: estradiolem, progesteronem i klotrimazolem.

Zaobserwowano znaczące różnice w wyglądzie otrzymanych materiałów zawierających lek. W przypadku formulacji zawierającej estradiol już suchy materiał był lekko mętny, natomiast dodatek wody prowadził do utworzenia białej lepkiej cieczy. W przypadku związku zawierającego progesteron materiał bardziej przypominał wodne formulacje otrzymane

w wyniku enkapsulacji klotrimazolu, jednak ich forma była mniej stabilna – szybciej dochodziło do płynięcia materiału.

8.4.2.3. Testy przenikalności leków przez membranę Strat-M.

Wykorzystując obie otrzymane formy nośnika leków wykonano testy przenikalności substancji aktywnej przez membranę Strat-M przy użyciu celki dyfuzyjnej Franz. Otrzymane profile uwalniania przedstawione zostały na rysunku 38.



Rysunek 38. Zestawienie profili uwalniania estradiolu (a), progesteronu (b) oraz klotrimazolu z nośników leku na bazie hydrofobizowanego hiperrozagłężonego poliglicydolu.

Porównując procentowy udział leku, który przeszedł przez membranę, zaobserwowano, że w przypadku estradiolu zastosowanie matrycy polimerowej nie zwiększyło biodostępności tego leku. Wykorzystanie *hHbPGL* jako nośnika, czy to w formie hydrożelu sieciowanego kopolimerem zawierającym ugrupowania kwasu borowego, czy też wodnej formuacji, nie zwiększyło ilości leku, który przeniknął przez membranę. Osiągnięto natomiast spowolnione uwalnianie, znacząco redukując efekt pierwszego wyrzutu (z ang. *Burst Release*), obserwowany po pierwszych 2 godzinach eksperymentu w przypadku wodnego roztworu leku.

W przypadku testów przeprowadzonych dla progesteronu, zaobserwowano wzrost ilości leku przenikniętego przez membranę dla wodnej formuacji polimeru z lekiem. Zastosowanie hydrożelowego nośnika sieciowanego kwasem borowym nie wpłynęło znacząco na proces

uwalniania, a co się z tym wiąże na biodostępność progesteronu. Nadal jednak efekt przenikania przez membranę jest bardzo niski, to znaczy maksymalnie około 8% leku przeniknęło do roztworu.

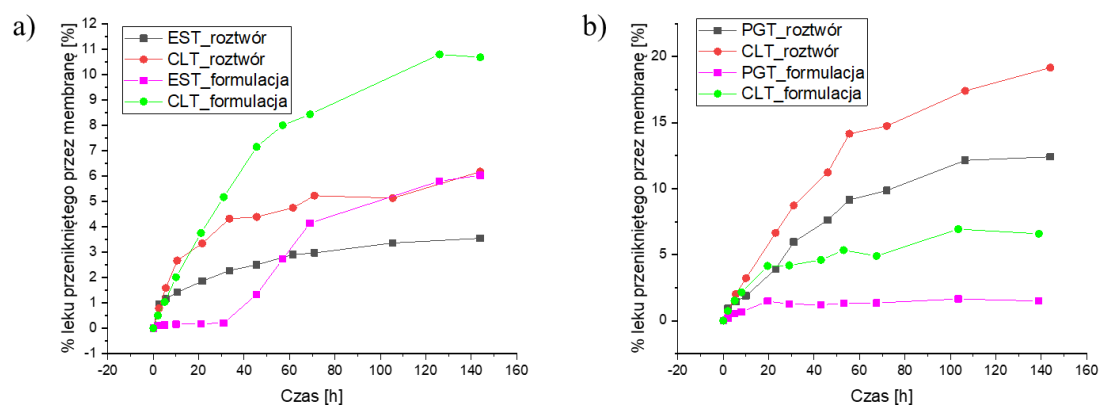
Obserwując wyniki testu przenikania przez membranę klotrimazolu, można zobaczyć pożądaną efekt działania nośnika leku na przenikanie leku trudno rozpuszczalnego w wodzie. Zastosowanie hydrofobizowanego hiperrozgałęzionego poliglicydolu jako transportera klotrimazolu zwiększyło jego zdolność do przenikania przez membranę.

Mając na uwadze spadek zdolności do samonaprawy otrzymanych hydrożeli polimerowych na bazie *hHbPGL* z lekiem oraz kopolimeru poly(AM-*ran*-2-AAPBA), który był wynikiem dominujących oddziaływań hydrofobowych dalsze prace przeprowadzono na wodnych formuacjach polimeru z lekiem. Otrzymane nośniki leków trudno rozpuszczalnych w wodzie połączono poprzez mechaniczne wymieszanie ich ze sobą tworząc materiały zawierające w swojej strukturze jednocześnie hormon oraz klotrimazol. W wyniku tego zabiegu przygotowano próbki przedstawione w tabeli 14.

Tabela 14. Zestawienie materiałów zawierających dwie substancje: mieszaninę klotrimazolu z progesteronem oraz klotrimazolu z estradiolem.

Formulacja	Stosunek molowy hormonu do polimeru	Stosunek molowy klotrimazolu do polimeru	m_{hHbPGL}/V_{H_2O} [g/ml]	$m_{hormonu}/V_{H_2O}$ [g/ml]	m_{CLT}/V_{H_2O} [g/ml]
BPh40_PGT_CLT	16	16	0,496	0,124	0,176
BPh40_EST_CLT	16	16	0,496	0,107	0,176

Przygotowane formuacje również poddano testom przenikalności leku przez membranę z wykorzystaniem celki dyfuzyjnej Franz, które przedstawiono na rysunku 39.



Rysunek 39. Profile uwalniania klotrimazolu oraz hormonów z wodnych roztworów oraz z wodnych formuacji polimerowych.

Przeprowadzone badania dostarczyły ciekawych informacji. Okazało się, że zastosowanie mieszaniny leków doprowadziło do zwiększenia przenikalności estrogeneru przez membranę, gdy był w matrycy polimerowej. Natomiast zastosowanie nośnika leku wpłynęło niekorzystnie na przenikalność progesteronu przez membranę.

Porównując otrzymane wyniki z eksperymentu przenikalności dla mieszaniny leków z wynikami eksperymentów przeprowadzonych na nośnikach leków zawierających tylko jedną substancję czynną okazuje się, że zastosowanie mieszaniny dwóch leków znacząco wpływa na profile uwalniania. W przypadku matrycy zawierającej estrogen zastosowanie mieszaniny leków wpłynęło korzystnie, udało się zwiększyć biodostępność leku w porównaniu do leku w roztworze wodnym. Przy czym nadal obserwowano spowolnione uwalnianie leku z matrycy polimerowej.

Natomiast w przypadku progesteronu, zastosowanie polimerowego nośnika do mieszaniny dwóch substancji aktywnych w postaci progesteronu i klotrimazolu, spowodowało obniżenie procentu przenikniętego leku przez membranę, co jest sprzeczne z wynikami otrzymanymi dla formułacji zawierających jedynie jeden lek. Oznaczać to może, że progesteron wchodzi w interakcję z klotrimazolem, tworząc swego rodzaju agregaty, których przejście przez membranę jest utrudnione. W tym przypadku podobnie jak w przypadku wyników otrzymanych dla estradiolu zaobserwowano wzmożone uwalnianie substancji aktywnych z wodnego roztworu mieszaniny leków w stosunku do przenikalności leków uwalnianych z matrycy polimerowej.

Korzystając z otrzymanych danych wyznaczono wartości stałych przenikalności, które zestawiono w tabeli 15.

Do obliczeń wykorzystano równanie na stałą przenikalności K_p :

$$K_p = \frac{Q}{A \cdot t \cdot C_0},$$

gdzie: Q to ilość leku, która przeniknęła przez membranę, A to powierzchnia membrany, t to czas, natomiast C_0 odnosi się do stężenia roztworu, z którego uwalniana jest substancja aktywna oraz równanie na wyznaczenie wartości przepływu leku J:

$$J = \frac{Q}{A \cdot t}$$

gdzie: Q to ilość leku, która przeniknęła przez membranę, A to powierzchnia membrany, natomiast t to czas.

Tabela 15. Zestawienie wartości stałej przenikania (K_p) i przepływu (J) estradiolu, progesteronu i klotrimazolu przez membranę.

Matryca	Lek	K_p [cm/min]	J [mg/cm ² ·min]
Hydrożel	Estrogen	$1,8 \cdot 10^{-8}$	$4,5 \cdot 10^{-6}$
Wodna formulacja	Estrogen	$4,62 \cdot 10^{-8}$	$3,4 \cdot 10^{-6}$
Wodny roztwór	Estrogen	$4,5 \cdot 10^{-7}$	$4,7 \cdot 10^{-6}$
Hydrożel	Progesteron	$2 \cdot 10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-6}$
Wodna formulacja	Progesteron	$2,2 \cdot 10^{-7}$	$1,7 \cdot 10^{-5}$
Wodny roztwór	Progesteron	$2,2 \cdot 10^{-7}$	$2,2 \cdot 10^{-6}$
Hydrożel	Klotrimazol	$6,73 \cdot 10^{-7}$	$4,6 \cdot 10^{-5}$
Wodna formulacja	Klotrimazol	$1,7 \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^{-4}$
Wodny roztwór	Klotrimazol	$6,73 \cdot 10^{-7}$	$1,62 \cdot 10^{-6}$
Wodna formulacja	Estrogen	$3 \cdot 10^{-7}$	$7,2 \cdot 10^{-6}$
	Klotrimazol	$5,3 \cdot 10^{-7}$	$1,9 \cdot 10^{-5}$
Wodny roztwór	Estrogen	$3,8 \cdot 10^{-7}$	$3,5 \cdot 10^{-6}$
	Klotrimazol	$6,6 \cdot 10^{-7}$	$6,2 \cdot 10^{-6}$
Wodna formulacja	Progesteron	$9,4 \cdot 10^{-8}$	$2,9 \cdot 10^{-6}$
	Klotrimazol	$4,1 \cdot 10^{-7}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$
Wodny roztwór	Progesteron	$1,3 \cdot 10^{-6}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$
	Klotrimazol	$2 \cdot 10^{-6}$	$1,9 \cdot 10^{-5}$

Otrzymane wartości potwierdzają obserwacje dokonane na wykresach. Wskazują one, że estrogen charakteryzuje się najwyższą stałą przenikalności przez membranę, z wodnego roztworu, gdy jest połączony z klotrimazolem. Podobny wynik otrzymano dla progesteronu.

8.4.2.4. Podsumowanie

Przygotowane formułacje wykazują różnice w wyglądzie w zależności od stosowanego leku. Przedstawione zdjęcia mogą świadczyć o lepszym zdyspergowaniu trudno rozpuszczalnego progesteronu w strukturze polimeru, co obserwuje się poprzez otrzymanie klarownej formułacji bez widocznych agregatów cząsteczek leku w strukturze.

Podsumowując, chcąc zwiększyć biodostępność stosowanych w terapiach hormonalnych progesteronu i estradiolu, konieczne jest zastosowanie podobnego podejścia do problemu. W przypadku obu hormonów, zwiększenie rozpuszczalności leku, definiowane na podstawie wyników otrzymanych z testu przenikalności leku przez membranę, udało się uzyskać dopiero

po połączeniu wodnych roztworów zawierających hormon i klotrimazol. Oznacza to najprawdopodobniej, że obecność drugiej substancji czynnej prowadzi do powstania oddziaływań, które w efekcie prowadzą do polepszenia rozpuszczalności hormonów w imitowanym płynie waginalnym, pozwalając nieznacznie podwyższyć ilość leku przenikniętego przez membranę.

Przeprowadzenie testów dla wodnych roztworów leków pokazało, że połączenie na krążku dyfuzyjnym klotrimazolu z hormonami poprawiło przepuszczalność estradiolu i progesteronu przez membranę. Prawdopodobnie jednak zakotwiczenie ich w strukturze polimeru prowadzi do powstania na tyle silnych oddziaływań, że dyfuzja substancji aktywnych z formulacji polimerowej zostaje utrudniona.

9. Podsumowanie i wnioski

W wyniku prowadzonych prac syntetycznych uzyskano bibliotekę hydrofobizowanych hiperrozgałęzionych poliglicydoli zawierających ugrupowania fenyłowe wprowadzone poprzez wiązania estrowe bądź uretanowe oraz ugrupowania bifenyłowe. Wykazano, że w strukturze uzyskanych amfifilowych polimerów można efektywnie enkapsulować substancje bioaktywne trudno rozpuszczalne w wodzie, co pokazano na przykładzie klotrimazolu, progesteronu i estrogeny oraz leki hydrofilowe wykazujące tendencję do tworzenia fibryli – 5-fluorouracyl. Na bazie hydrofobizowanych HbPGL otrzymano serię hydrożelowych nośników leków wykorzystując ugrupowania 1,2-diolowe w koronie do wytworzenia dynamicznej sieci z kopolimerem akrylamidowym zawierającym grupy kwasu borowego.

Stopień modyfikacji HbPGL miał wyraźny wpływ na właściwości reologiczne otrzymanych hydrożeli. Zauważono, że wraz ze wzrostem stopnia hydrofobizacji wzrasta zdolność polimeru do efektywnej enkapsulacji leku, natomiast zdolność do samonaprawy sieci hydrożelowej maleje. Badania reologiczne ujawniły, że oprócz dynamicznych węzłów sieci w tworzenie hydrożelu zaangażowane są również oddziaływania hydrofobowe pierścieni aromatycznych.

Wykazano również, że wprowadzenie 5-FU w matrycę hydrożelową na bazie hydrofobizowanych HbPGL skutkowało selektywnym działaniem przeciwnowotworowym wobec komórek szyjki macicy. Biorąc pod uwagę obecnie stosowane formuły w leczeniu nowotworów, system działający selektywnie w miejscu chorobowo zmienionym byłby przełomem w leczeniu onkologicznym.

Enkapsulacja trudno rozpuszczalnych w wodzie substancji aktywnych powszechnie stosowanych w terapiach ginekologicznych, jakimi są hormony, prowadziła do wytworzenia

cieczy o zwiększonej lepkości. Próba otrzymania dynamicznych hydrożeli pokazała, że najprawdopodobniej dochodzi do dominującego udziału oddziaływań hydrofobowych, co w efekcie zaburzało możliwość samonaprawy sieci polimerowej. Co więcej, przeprowadzone badania wykazały, że obecność w mieszaninie drugiego leku, w tym przypadku klotrimazolu, zwiększała możliwość przeniknięcia hormonów przez membranę.

Odpowiednio dobrany stopień hydrofobizacji skutkowało możliwością tworzenia prostych formułacji w wyniku enkapsulacji klotrimazolu o właściwościach lepkich cieczy z granicą płynięcia w warunkach fizjologicznych. Otrzymane konstrukty, dzięki swojej wysokiej lepkości mają potencjał do dłuższego utrzymania się w pochwie, a co za tym idzie wydłużonego czasu oddziaływania substancji aktywnej z miejscem chorobowo zmienionym, co znacząco poprawiłoby jakość życia pacjentek w trakcie terapii ginekologicznych. Badania mikrobiologiczne wykazały efektywne działanie formułacji na najczęściej występujące szczepy grzybów prowadzących do grzybicy pochwy. Zaskakująco, działanie pochodnej bifenylowej utrzymało się nawet do 7 dni.

Hydrofobizacja liniowych jednostek konstytucyjnych HbPGL prowadziła do uzyskania układów termowrażliwych. Pokazano, że pochodna uretanowa ze względu na bardziej hydrofobowy charakter niż pochodna estrowa o podobnym stopniu modyfikacji wykazuje niższe temperatury separacji faz.

Symulacje komputerowe pozwoliły wyjaśnić wpływ oddziaływań wewnątrz- i międzycząsteczkowych na termowrażliwe zachowanie badanych układów. Badania te potwierdziły bardziej hydrofilową naturę pochodnej estrowej względem pochodnej uretanowej. Wykazały również, że wzrost temperatury powoduje zmiany w konformacji polimeru, prowadzące do wzmocnienia wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, przy jednoczesnym zrywaniu wiązań wodorowych pomiędzy polimerem a wodą. W przypadku pochodnej uretanowej prowadziło to do ekspozycji grup fenylowych na zewnątrz makrocząsteczki. W rezultacie w przypadku tej pochodnej obserwowano agregację domen hydrofobowych.

Wyniki przeprowadzonych badań prowadzą do poniższych wniosków.

1. Opracowano bibliotekę hydrofobizowanych hiperrozgałęzionych poliglicydoli zawierających ugrupowania fenylouretanowe, benzoilowe i bifenylouretanowe.
2. Udowodniono, że otrzymane amfifilowe polimery efektywnie enkapsulują substancje bioaktywne.

3. Przygotowano dynamiczne sieci hydrożelowe oparte na wiązaniach estrowych między grupami 1,2-diolowymi w hiperrozgałęzionym poliglicydolu oraz kopolimerze akrylamidowym z kwasem borowym.
4. Wykazano, że zwiększona hydrofobizacja HbPGL poprawia enkapsulację leku, ale ogranicza samonaprawę sieci hydrożelowej.
5. Oddziaływania hydrofobowe pomiędzy pierścieniami aromatycznymi wspierają tworzenie stabilnej sieci hydrożelowej.
6. Zaenkapsulowanie 5-fluorouracylu w hydrożelu opartym na HbPGL sprzyja selektywnemu działaniu przeciwko komórkom nowotworowym raka szyjki macicy.
7. Wprowadzenie hormonów do struktury HbPGL w badanym stosunku molowym wpłynęło niekorzystnie na możliwość samonaprawy sieci hydrożelu, natomiast doprowadziło do wytworzenia cieczy o zwiększonej lepkości. Co więcej, dodatek klotrimazolu do wodnych roztworów hormonów zwiększył ich przenikalność przez membranę.
8. Zastosowanie polimerów modyfikowanych odczynnikami o większej powierzchni pierścieni pozwoliło na uzyskanie klotrimazolowych formułacji o lepkości sprzyjającej wydłużonemu oddziaływaniu z miejscem zmienionym chorobowo oraz o wydłużonym czasie działania przeciwgrzybicznego.
9. Pochodne uretanowe HbPGL wykazują niższe temperatury separacji faz ze względu na większą hydrofobowość układu.
10. Symulacje komputerowe potwierdziły, że wzrost temperatury prowadzi do zmiany konformacji polimeru, wspierając agregację domen hydrofobowych.

10. Wykaz cytowanej literatury

1. Bręborowicz G. Położnictwo i ginekologia. Vol. 2. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2019. strony 1–10.
2. dos Santos AM, Carvalho SG, Araujo VHS, Carvalho GC, Gremião MPD, Chorilli M. Recent advances in hydrogels as strategy for drug delivery intended to vaginal infections. Vol. 590, International Journal of Pharmaceutics. Elsevier B.V.; 2020.
3. Linhares IM, Summers PR, Larsen B, Giraldo PC, Witkin SS. Contemporary perspectives on vaginal pH and lactobacilli. Am J Obstet Gynecol. 2011;204(2):120.e1-120.e5.
4. Gupta S, Kakkar V, Bhushan I. Crosstalk between Vaginal Microbiome and Female Health: A review. Vol. 136, Microbial Pathogenesis. Academic Press; 2019.
5. Cook MT, Brown MB. Polymeric gels for intravaginal drug delivery. Vol. 270, Journal of Controlled Release. Elsevier B.V.; 2018. p. 145–57.
6. Han Y, Liu Z, Chen T. Role of Vaginal Microbiota Dysbiosis in Gynecological Diseases and the Potential Interventions. Vol. 12, Frontiers in Microbiology. Frontiers Media S.A.; 2021.
7. Palmeira-de-Oliveira R, Palmeira-de-Oliveira A, Martinez-de-Oliveira J. New strategies for local treatment of vaginal infections. Vol. 92, Advanced Drug Delivery Reviews. Elsevier B.V.; 2015. p. 105–22.
8. Sobel JD. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. Am J Obstet Gynecol. 1985;152(7):924–35.
9. de Cássia Orlandi Sardi J, Romário Silva D, Cristina Anibal P, Joanna Carvalho Moraes de Campos Baladin J, Rodrigues Ramalho S, Luiz Rosalen P, et al. Vulvovaginal Candidiasis: Epidemiology and Risk Factors, Pathogenesis, Resistance, and New Therapeutic Options. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12281-021-00415-9>
10. Rodrigues CF, Silva S, Henriques M. Candida glabrata: A review of its features and resistance. Vol. 33, European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Springer Verlag; 2014. p. 673–88.
11. Hassan Y, Chew SY, Than LTL. Candida glabrata: Pathogenicity and resistance mechanisms for adaptation and survival. Vol. 7, Journal of Fungi. MDPI AG; 2021.
12. Czechowicz P, Nowicka J, Gościński G. Virulence Factors of Candida spp. and Host Immune Response Important in the Pathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis. Vol. 23, International Journal of Molecular Sciences. MDPI; 2022.
13. Jonathan Torgovnik. WHO-cervical cancer.

14. Keyvani V, Kheradmand N, Navaei ZN, Mollazadeh S, Esmaeili SA. Epidemiological trends and risk factors of gynecological cancers: an update. Vol. 40, Medical Oncology. Springer; 2023.
15. Harro CD, Pang YYS, Roden RBS, Hildesheim A, Wang Z, Reynolds MJ, et al. Safety and Immunogenicity Trial in Adult Volunteers of a Human Papillomavirus 16 L1 Virus-Like Particle Vaccine [Internet]. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article/93/4/284/2906462>
16. Okunade KS. Human papillomavirus and cervical cancer. Vol. 40, Journal of Obstetrics and Gynaecology. Taylor and Francis Ltd; 2020. p. 602–8.
17. Abdul Y, Al-Tarawneh K. THE PREDICTIVE ABILITY OF MENSTRUAL DISORDERS AND HORMONAL IMBALANCE IN THE LEVEL OF MOOD DISORDERS IN FEMALES. Vol. 19. 2024.
18. Rodriguez-Tenreiro C, Alvarez-Lorenzo C, Rodriguez-Perez A, Concheiro A, Torres-Labandeira JJ. Estradiol sustained release from high affinity cyclodextrin hydrogels. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2007 Apr;66(1):55–62.
19. Almomen A, Cho S, Yang CH, Li Z, Jarboe EA, Peterson CM, et al. Thermosensitive progesterone hydrogel: A safe and effective new formulation for vaginal application. Pharm Res. 2015 Jul 30;32(7):2266–79.
20. Türk H, Shukla A, Rodrigues PCA, Rehage H, Haag R. Water-soluble dendritic core-shell-type architectures based on polyglycerol for solubilization of hydrophobic drugs. Chemistry - A European Journal. 2007;13(15):4187–96.
21. Ye C, Chi H. A review of recent progress in drug and protein encapsulation: Approaches, applications and challenges. Vol. 83, Materials Science and Engineering C. Elsevier Ltd; 2018. p. 233–46.
22. Vinarov Z, Dobрева P, Tcholakova S. Effect of surfactant molecular structure on Progesterone solubilization. J Drug Deliv Sci Technol. 2018 Feb 1;43:44–9.
23. Nie L, Zou P, Dong J, Sun M, Ding P, Han Y, et al. Injectable vaginal hydrogels as a multi-drug carrier for contraception. Applied Sciences (Switzerland). 2019 Apr 1;9(8).
24. Mohammed NN, Pandey P, Khan NS, Elokely KM, Liu H, Doerksen RJ, et al. Clotrimazole–cyclodextrin based approach for the management and treatment of Candidiasis – A formulation and chemistry-based evaluation. Pharm Dev Technol. 2016 Jul 3;21(5):619–29.

25. Pai M, Venkatesh S, Gupta P. The role of infections in infertility: A review. Vol. 6, *International Journal of Academic Medicine*. Wolters Kluwer Medknow Publications; 2020. p. 189–96.
26. Li J, Mooney DJ. Designing hydrogels for controlled drug delivery. Vol. 1, *Nature Reviews Materials*. Nature Publishing Group; 2016.
27. Jaworska-Krych D, Gosecka M, Gosecki M, Urbaniak M, Dzitko K, Ciesielska A, et al. Enhanced Solubility and Bioavailability of Clotrimazole in Aqueous Solutions with Hydrophobized Hyperbranched Polyglycidol for Improved Antifungal Activity. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2024 Apr 17;16(15):18434–48.
28. Neufeld L, Bianco-Peled H. Pectin–chitosan physical hydrogels as potential drug delivery vehicles. *Int J Biol Macromol*. 2017 Aug 1;101:852–61.
29. Gosecka M, Jaworska-Krych D, Gosecki M, Wielgus E, Marcinkowska M, Janaszewska A, et al. Self-Healable, Injectable Hydrogel with Enhanced Clotrimazole Solubilization as a Potential Therapeutic Platform for Gynecology. *Biomacromolecules*. 2022 Oct 10;23(10):4203–19.
30. Islam A, Riaz M, Yasin T. Structural and viscoelastic properties of chitosan-based hydrogel and its drug delivery application. *Int J Biol Macromol*. 2013;59:119–24.
31. Gosecka M, Gosecki M, Jaworska-Krych D. Hydrophobized Hydrogels: Construction Strategies, Properties, and Biomedical Applications. Vol. 33, *Advanced Functional Materials*. John Wiley and Sons Inc; 2023.
32. Zhang X, Achazi K, Steinhilber D, Kratz F, Dervede J, Haag R. A facile approach for dual-responsive prodrug nanogels based on dendritic polyglycerols with minimal leaching. *Journal of Controlled Release*. 2014 Jan 28;174(1):209–16.
33. Sosa L, Calpena AC, Silva-Abreu M, Espinoza LC, Rincón M, Bozal N, et al. Thermoreversible gel-loaded amphotericin B for the treatment of dermal and vaginal candidiasis. *Pharmaceutics*. 2019 Jul 1;11(7).
34. Hussein YHA, Youssry M. Polymeric micelles of biodegradable diblock copolymers: Enhanced encapsulation of hydrophobic drugs. Vol. 11, *Materials*. MDPI AG; 2018.
35. Jones MC, Ranger M, Leroux JC. pH-sensitive unimolecular polymeric micelles: Synthesis of a novel drug carrier. *Bioconj Chem*. 2003;14(4):774–81.
36. Gosecki M, Kazmierski S, Gosecka M. Diffusion-Controllable Biomineralization Conducted in Situ in Hydrogels Based on Reversibly Cross-Linked Hyperbranched Polyglycidol. *Biomacromolecules*. 2017 Oct 9;18(10):3418–31.

37. Jin X, Sun P, Tong G, Zhu X. Star polymer-based unimolecular micelles and their application in bio-imaging and diagnosis. *Biomaterials*. 2018 Sep 1;178:738–50.
38. Ambade A V., Savariar EN, Thayumanavan S. Dendrimeric micelles for controlled drug release and targeted delivery. Vol. 2, *Molecular Pharmaceutics*. 2005. p. 264–72.
39. Abbina S, Vappala S, Kumar P, Siren EMJ, La CC, Abbasi U, et al. Hyperbranched polyglycerols: recent advances in synthesis, biocompatibility and biomedical applications. Vol. 5, *Journal of Materials Chemistry B*. Royal Society of Chemistry; 2017. p. 9249–77.
40. Jafari M, Abolmaali SS, Najafi H, Tamaddon AM. Hyperbranched polyglycerol nanostructures for anti-biofouling, multifunctional drug delivery, bioimaging and theranostic applications. Vol. 576, *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V.; 2020.
41. Sunder A, Hanselmann R, Frey H, Mülhaupt R. Controlled synthesis of hyperbranched polyglycerols by ring-opening multibranching polymerization. *Macromolecules*. 1999 Jun 29;32(13):4240–6.
42. Schömer M, Schüll C, Frey H. Hyperbranched aliphatic polyether polyols. *J Polym Sci A Polym Chem*. 2013 Mar 1;51(5):995–1019.
43. Haryanto, Singh D, Huh PH, Kim SC. Hyperbranched poly(glycidol)/poly(ethylene oxide) crosslinked hydrogel for tissue engineering scaffold using e-beams. *J Biomed Mater Res A*. 2016 Jan 1;104(1):48–56.
44. Li J, Li H, Yang X, Luo P, Wu Z, Zhang X. The supramolecular hydrogel based on hyperbranched polyglycerol and dextran as a scaffold for living cells and drug delivery. *RSC Adv*. 2015;5(105):86730–9.
45. Kurniasih IN, Keilitz J, Haag R. Dendritic nanocarriers based on hyperbranched polymers. *Chem Soc Rev*. 2015 Jun 21;44(12):4145–64.
46. Kurniasih IN, Liang H, Kumar S, Mohr A, Sharma SK, Rabe JP, et al. A bifunctional nanocarrier based on amphiphilic hyperbranched polyglycerol derivatives. *J Mater Chem B*. 2013 Aug 7;1(29):3569–77.
47. Daniel W, Stiriba SE, Holger F. Hyperbranched polyglycerols: From the controlled synthesis of biocompatible polyether polyols to multipurpose applications. *Acc Chem Res*. 2010 Jan 19;43(1):129–41.
48. Ying H, He G, Zhang L, Lei Q, Guo Y, Fang W. Hyperbranched polyglycerol/poly(acrylic acid) hydrogel for the efficient removal of methyl violet from aqueous solutions. *J Appl Polym Sci*. 2016 Feb 1;133(5).

49. Zhang Y, Wang RC, Liu HJ, Chen Y. Hyperbranched polyglycerol derivatives exhibiting normal or abnormal thermoresponsive behaviours in water: Facile preparation and investigation by turbidimetry and fluorescence techniques. *Soft Matter*. 2017;13(44):8136–43.
50. Groves P. Diffusion ordered spectroscopy (DOSY) as applied to polymers. Vol. 8, *Polymer Chemistry*. Royal Society of Chemistry; 2017. p. 6700–8.
51. Singh UC, Kollman PA. An Approach to Computing Electrostatic Charges for Molecules.
52. Besler BH, Merz KM, Kollman PA. Atomic Charges Derived from Semiempirical Methods.
53. Sadus R. J. Particle-Particle and Particle-Mesh (PPPM) Methods. In: *Molecular Simulation of Fluids*. Amsterdam: Elsevier Science; 1999. p. 162–9.
54. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys*. 1983;79(2):926–35.
55. Gosecki M, Urbaniak M, Gostynski B, Gosecka M. Influence of Glycoluril Molecular Clip Isomerization on the Mechanisms of Resorcinol Molecule Complexation. *Journal of Physical Chemistry C*. 2020 Apr 16;124(15):8401–10.
56. Grimling B, Karolewicz B, Nawrot U, Włodarczyk K, Górniak A. Physicochemical and antifungal properties of clotrimazole in combination with high-molecular weight chitosan as a multifunctional excipient. *Mar Drugs*. 2020 Dec 1;18(12).
57. Saadatfar F, Shayanfar A, Rahimpour E, Barzegar-Jalali M, Martinez F, Bolourtchian M, et al. Measurement and correlation of clotrimazole solubility in ethanol + water mixtures at $T = (293.2 \text{ to } 313.2) \text{ K}$. *J Mol Liq*. 2018 Apr 15;256:527–32.
58. Prabagar B, Yoo BK, Woo JS, Kim JA, Rhee JD, Piao MG, et al. Enhanced Bioavailability of Poorly Water-Soluble Clotrimazole by Inclusion with 13-Cyclodextrin [Internet]. Vol. 30, *Arch Pharm Res*. 2007. Available from: <http://apr.psk.or.kr>
59. Gosecki M, Ziemczonek P, Gosecka M, Urbaniak M, Wielgus W, Marcinkowska M, et al. Cross-linkable star-hyperbranched unimolecular micelles for the enhancement of the anticancer activity of clotrimazole. *J Mater Chem B*. 2023 Feb 21;11(24):5552–64.
60. Gosecki M, Zgardzinska B, Gosecka M. Temperature-Induced Changes in the Nanostructure of Hydrogels Based on Reversibly Cross-Linked Hyperbranched Polyglycidol with B(OH)_4^- Ions. *Journal of Physical Chemistry C*. 2016 Aug 18;120(32):18323–32.

61. Robb ID, Smeulders JBAF. The rheological properties of weak gels of poly(vinyl alcohol) and sodium borate. Vol. 38. Elsevier Science Ltd; 1997.
62. Winter HH. Can the Gel Point of a Cross-linking Polymer Be Detected by the G' - G'' Crossover?
63. Herbst F, Döhler D, Michael P, Binder WH. Self-healing polymers via supramolecular forces. Vol. 34, *Macromolecular Rapid Communications*. 2013. p. 203–20.
64. Schubert C, Osterwinter C, Tonhauser C, Schömer M, Wilms D, Frey H, et al. Can hyperbranched polymers entangle? Effect of hydrogen bonding on entanglement transition and thermorheological properties of hyperbranched polyglycerol melts. *Macromolecules*. 2016 Nov 22;49(22):8722–37.
65. Ma L, Barbosa-Chovas G V. Rheological Characterization of Mayonnaise. Part II: Flow and Viscoelastic Properties at Different Oil and Xanthan Gum Concentrations. Vol. 25, *Journal of Food Engineering*.
66. Kwak MS, Ahn HJ, Song KW. Rheological investigation of body cream and body lotion in actual application conditions. *Korea Australia Rheology Journal*. 2015 Aug 1;27(3):241–51.
67. Cavallo G, Metrangolo P, Milani R, Pilati T, Priimagi A, Resnati G, et al. The halogen bond. Vol. 116, *Chemical Reviews*. American Chemical Society; 2016. p. 2478–601.
68. Vasylyeva V, Catalano L, Nervi C, Gobetto R, Metrangolo P, Resnati G. Characteristic redshift and intensity enhancement as far-IR fingerprints of the halogen bond involving aromatic donors. *CrystEngComm*. 2016 Apr 7;18(13):2247–50.
69. Bahadur A, Shoaib M, Saeed A, Iqbal S. FT-IR spectroscopic and thermal study of waterborne polyurethane-acrylate leather coatings using tartaric acid as an ionomer. *E-Polymers*. 2016 Nov 1;16(6):463–74.
70. Teo LS, Chen CY, Kuo JF. Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study on Effects of Temperature on Hydrogen Bonding in Amine-Containing Polyurethanes and Poly(urethane-urea)s. 1997.
71. Piechocki K, Kozanecki M, Saramak J. Water structure and hydration of polymer network in PMEO2MA hydrogels. *Polymer (Guildf)*. 2020 Dec 1;210.
72. Maeda Y, Kubota T, Yamauchi H, Nakaji T, Kitano H. Hydration changes of poly(2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate) during thermosensitive phase separation in water. *Langmuir*. 2007 Oct 23;23(22):11259–65.

73. Sun Z, Ge X, Qiu B, Xiang Z, Jiang C, Wu J, et al. Vulvovaginal candidiasis and vaginal microflora interaction: Microflora changes and probiotic therapy. Vol. 13, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2023.
74. Jain K, Vedarajan R, Watanabe M, Ishikiriya M, Matsumi N. Tunable LCST behavior of poly(N-isopropylacrylamide/ionic liquid) copolymers. *Polym Chem*. 2015 Oct 14;6(38):6819–25.
75. Olejniczak MN, Kozanecki M, Saramak J, Matusiak M, Kadlubowski S, Matyjaszewski K. Raman spectroscopy study on influence of network architecture on hydration of poly(2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate) hydrogels. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2017 Mar 1;48(3):465–73.
76. Maeda Y, Yamauchi H, Kubota T. Confocal micro-Raman and infrared spectroscopic study on the phase separation of aqueous poly(2-(2-methoxyethoxy)ethyl (meth)acrylate) solutions. *Langmuir*. 2009 Jan 6;25(1):479–82.
77. Miyazawa T, Fukushima K, Ideguchi Y. Molecular vibrations and structure of high polymers. III. Polarized infrared spectra, normal vibrations, and helical conformation of polyethylene glycol. *J Chem Phys*. 1962;37(12):2764–76.
78. He W, Du Q, Cao DY, Xiang B, Fan LF. Study on colon-specific pectin/ethylcellulose film-coated 5-fluorouracil pellets in rats. *Int J Pharm*. 2008 Feb 4;348(1–2):35–45.
79. Akay S, Kayan B, Jouyban A, Martínez F. Solubility and dissolution thermodynamics of 5-fluorouracil in (ethanol + water) mixtures. *J Mol Liq*. 2021 Jul 1;333.
80. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. Vol. 3, *Nature Reviews Cancer*. 2003. p. 330–8.
81. Handali S, Moghimipour E, Rezaei M, Ramezani Z, Kouchak M, Amini M, et al. A novel 5-Fluorouracil targeted delivery to colon cancer using folic acid conjugated liposomes. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2018 Dec 1;108:1259–73.
82. Velázquez NS, Turino LN, Luna JA, Mengatto LN. Progesterone loaded thermosensitive hydrogel for vaginal application: Formulation and in vitro comparison with commercial product. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2019 Dec 1;27(8):1096–106.
83. Ilardia-Arana D, Kristensen HG, Müllertz A. Biorelevant dissolution media: Aggregation of amphiphiles and solubility of estradiol. *J Pharm Sci*. 2006;95(2):248–55.
84. Ouyang H, Xu R, Xie X, Tan S, Luo X, Xie Y, et al. A tough estradiol-loaded hydrogel barrier for intrauterine adhesions treatment [Internet]. Available from: <https://ssrn.com/abstract=4046455>

11. Życiorys naukowy

Wykształcenie

10.2020 – 10.2024 Politechnika Łódzka, Interdyscyplinarna Szkoła Doktorska, studia stacjonarne, dziedzina: nauki chemiczne

03.2019 – 09.2020 Politechnika Łódzka, Wydział Chemiczny, studia stacjonarne, kierunek nanotechnologia, temat pracy: *Proces hydratacji termoczulych hydrożeli polimerowych o różnej gęstości sieci*, tytuł zawodowy: **magister**

10.2015 – 02.2019 Politechnika Łódzka, Wydział Chemiczny, studia stacjonarne, kierunek nanotechnologia, temat pracy: *Optymalizacja procesu syntezy oraz badanie procesów sorpcji/desorpcji w termoczulych hydrożelach z PMEO2MA*, tytuł zawodowy: **inżynier**

Szkolenia

2017 „Wykorzystanie technik analitycznych w badaniach nietypowych produktów na przykładzie obiektów archeologicznych”

2017 „Podstawowe wymagania dla materiałów do kontaktu z żywnością”

2017 „Zastosowanie biotransformacji oraz magnetycznej nanotechnologii w otrzymywaniu enancjomerycznie czystych związków leczniczych pochodnych kwasu 2- arylopropionowego”

Doświadczenie zawodowe

2018-2019 ZOOLEK Andrzej Mikuła, trzymiesięczny **staż naukowy** w laboratorium badawczo – rozwojowym, w ramach programu „Chemiku! Praktykuj!”

2018 ZOOLEK Andrzej Mikuła, sześciotygodniowe **praktyki**

2018 Bilplast S.A., czterotygodniowe **praktyki**

2018 Saint-Petersburg State University of Technology and Design, Sankt Petersburg (Rosja), dwutygodniowe **praktyki**

Działalność naukowo-badawcza

Publikacje naukowe

5 publikacji w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym:

- Gosecka M., **Jaworska-Krych D.**, Gosecki M., Urbaniak M., Wielgus E., Gostynski B., Marcinkowska M., Janaszewska A., Klajnert-Maculewicz B., Construction of dynamic hydrogel inducing effective and selective 5-fluorouracil monotherapy against cervical cancer cells, w przygotowaniu

- Jaworska-Krych D., Gosecka M., Maczugowska P., Hałagan K., Szutkowski K., Gosecki M., Urbaniak M., Kozanecki M., Thermosensitive Behavior of Internally Phenyl-Enriched Hyperbranched Polyglycidols in Water – The influence of a Covalent Bond Used for the Hydrophobization, *Macromolecules*, 2024, 57, 19, 9135-9156. (IF₂₀₂₃=5,1)
- Jaworska-Krych D., Gosecka M., Gosecki M., Urbaniak M., Dzitko K., Ciesielska A., Wielgus E., Kadłubowski S., Kozanecki M., Enhanced solubility and bioavailability of clotrimazole in aqueous solutions with hydrophobized hyperbranched polyglycidol for improved antifungal activity, *Applied Materials and Interfaces*, 2024, 16, 15, 18434–18448 (IF₂₀₂₃=8,3)
- Gosecka M., Gosecki M., Jaworska-Krych D., Hydrophobized Hydrogels: Construction Strategies, Properties, and Biomedical Applications, *Advanced Functional Materials*, 2023, 33, 25, 2212302 (IF₂₀₂₃=18,5)
- Gosecka M., Jaworska-Krych D., Gosecki M., Wielgus E., Marcinkowska M., Janaszewska A., Klajnert-Maculewicz B., Self-Healable, Injectable Hydrogel with Enhanced Clotrimazole Solubilization as a Potential Therapeutic Platform for Gynecology, *Biomacromolecules*, 2022, 23, 10, 4203-4219. (IF₂₀₂₂=6,2)

Zgłoszenie patentowe

- Numer zgłoszenia patentowego w Urzędzie Patentowym Rzeczypospolitej Polskiej: P.447498

Konferencje naukowe

Współautorstwo w komunikatach konferencyjnych o zasięgu:

Międzynarodowym 5 w formie plakatu (1) oraz referatu (4)

Krajowym 18 w formie plakatu (8) oraz referatu (10)

- Łódź, 03.06.2024, XXIII Scientific Conference – Controlled Polymerization, *Synthesis and modification of Hyperbranched Polyglycidol for aqueous formulations with enhanced clotrimazole solubility*, prezentacja posterowa
- Łódź, 03.06.2024, XXIII Scientific Conference – Controlled Polymerization, *Synthesis and modification of Hyperbranched Polyglycidol for aqueous formulations with enhanced clotrimazole solubility*, krótki komunikat ustny
- Poronin, 01-05.05.2024, Zjazd Wiosenny Sekcji Młodych Polskiego Towarzystwa Chemicznego, *Formulacje wodne na bazie amfifilowego hiperrozgałęzionego poliglicydolu jako nośniki leku hydrofobowego*, prezentacja ustna

- Poronin, 01-05.05.2024, Zjazd Wiosenny Sekcji Młodych Polskiego Towarzystwa Chemicznego, *Rola wiązania odwracalnego w projektowaniu materiałów polimerowych o właściwościach wrażliwych na działanie bodźców zewnętrznych*, prezentacja ustna
- Karpacz, 11-14.09.2023, XXVI Konferencja Naukowa Modyfikacja Polimerów, *Nieliniowe polietera jako główny składnik dynamicznych hydrożeli będących nośnikami leków hydrofobowych*, prezentacja ustna
- Łódź, 28-31.08.2023, 11th European Centre for Nanostructured Polymers Conference, *Turbidimetry studies of water solution of hyperbranched polyglycidol*, prezentacja posterowa
- Haga (Holandia), 20-25.08.2023, IUPAC CHAINS 2023, *Unimolecular micelles-based hydrogel carriers of water-insoluble drug*, prezentacja ustna
- Göteborg (Szwecja), 29.05-01.06. 2023, Frontiers in Polymer Science, *Cross-linkable unimolecular micelles for the enhancement of water-insoluble drugs bioavailability*, prezentacja ustna
- Korzecko, 03-07.05.2023, Zjazd Wiosenny Sekcji Młodych Polskiego Towarzystwa Chemicznego, *Właściwości termiczne wodnych roztworów modyfikowanego hiperrozgałęzionego poliglicydołu*, prezentacja ustna
- Paryż (Francja), 23-27.04.2023, Advanced Polymers Via Macromolecular Engineering Congress, *Hydrophobized hyperbranched polyglycidol as a potential matrix for antifungal drug delivery*, prezentacja ustna
- Opole, 10.12.2022, Zjazd Zimowy Sekcji Młodych Polskiego Towarzystwa Chemicznego, *Zastosowanie hydrofobizowanego hiperrozgałęzionego poliglicydołu jako nowy nośnik leku przeciwgrzybicznego*, prezentacja posterowa
- Lublin, 11-16.09.2022, 64. Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, *Zastosowanie hydrofobizowanego hiperrozgałęzionego poliglicydołu jako nowy nośnik leku przeciwgrzybicznego*, prezentacja ustna
- Szczecinek, 29.06-03.07.2022, Zjazd Letni Sekcji Młodych Polskiego Towarzystwa Chemicznego, *Wpływ hydrofobizacji hiperrozgałęzionego poliglicydołu na właściwości reologiczne hydrożeli z niego utworzonych*, prezentacja ustna
- Poznań, 29.01.2022, Zjazd Zimowy Sekcji Młodych Polskiego Towarzystwa Chemicznego, *Hydrofobizacja rdzenia hiperrozgałęzionego poliglicydołu – czy to ma sens?*, prezentacja posterowa

- Łódź – online, 27-28.09.2021, 7th Young Polymer Scientists Conference and Short Course, *Amphiphilic hyperbranched polyglycidol as a potential matrix for drug delivery*, krótki komunikat ustny
- Online, 27-29.05.2021, e-Zjazd Wiosenny Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego, *Amfifilowe polimery hiperrozgałęzione na bazie poliglicydolu jako potencjalne nośniki leków*, prezentacja ustna
- Online, 19.12.2020, e-Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego, *Proces hydratacji termoczułych hydrożeli polimerowych*, prezentacja posterowa
- Ustroń, 10-14.04.2019, Zjazd Wiosenny Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa, *Wpływ ilości metakrylanu 2-hydroksyetylu na wybrane właściwości hydrożeli PMEO2MA otrzymywanych metodą polimeryzacji FRP*, prezentacja ustna
- Warszawa, 08.12.2018, Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego, *Wpływ gęstości sieci PMEO2MA na właściwości sorpcyjne*, prezentacja posterowa
- Skorzęcin, 25-29.04.2018, Zjazd Wiosenny, Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego, *Synteza i charakterystyka termoczułych hydrożeli polimerowych uzyskanych metodą polimeryzacji wolnorodnikowej*, prezentacja ustna
- Bydgoszcz, 08-09.12.2017, Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego, *Sposoby regulacji temperatury objętościowego przejścia fazowego w hydrożelach poli(metakrylanu oligo(glikolu etylenowego))*, prezentacja posterowa
- Stegna, 05-09.04.2017, Zjazd Wiosenny Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego, *Wpływ stężenia monomeru w mieszaninie reakcyjnej na wybrane właściwości hydrożeli POEGMAs uzyskanych na drodze polimeryzacji radiacyjnej*, prezentacja posterowa
- Lublin, 17.12.2016, Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego, *Wpływ temperatury na procesy pęcznienia i dehydratacji termoczułych hydrożeli polimerowych*, prezentacja posterowa

Projekty badawcze

- 11.2020-10.2024 Wykonawca projektu badawczego, Badania finansowane w ramach projektu NCN SONATA BIS (UMO-2018/30/E/ST5/00576): Hydrożele zbudowane z dynamicznych węzłów sieci o kontrolowanej przepuszczalności i wzmożonej rozpuszczalności leków do potencjalnego leczenia ginekologicznego

Dodatkowa aktywność

- 2021 – 2024 Delegat Sekcji Młodych Polskiego Stowarzyszenia Chemicznego do Europejskiego Stowarzyszenia Młodych Chemików (EYCN), które jest młodym oddziałem Europejskiego Towarzystwa Chemicznego (EuChemS)
- 12.2019 - 2024 Członek Zarządu Sekcji Młodych Polskiego Towarzystwa Chemicznego – współorganizowanie 11 konferencji naukowych o zasięgu krajowym
- 11.2015 – 09.2020 Członek Studenckiego i Doktoranckiego Koła Naukowego „Nano” – Zastępca Prezesa SDKN „Nano” 2016-2017

Wyróżnienia i nagrody

- 12.2016, Wyróżnienie publiczności za przedstawiony poster pod tytułem „Wpływ temperatury na procesy pęcznienia i dehydratacji termoczułych hydrożeli polimerowych” w trakcie konferencji SSPTChem, Lublin 2016.
- Kilkukrotne wyróżnienie stypendium Rektora PŁ dla najzdolniejszych studentów w latach akademickich: 2016/2017; 2017/2018; 2018/2019.

12. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

Self-Healable, Injectable Hydrogel with Enhanced Clotrimazole Solubilization as a Potential Therapeutic Platform for Gynecology

Monika Gosecka,* Daria Jaworska-Krych, Mateusz Gosecki, Ewelina Wielgus, Monika Marcinkowska, Anna Janaszewska, and Barbara Klajnert-Maculewicz



Cite This: *Biomacromolecules* 2022, 23, 4203–4219



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

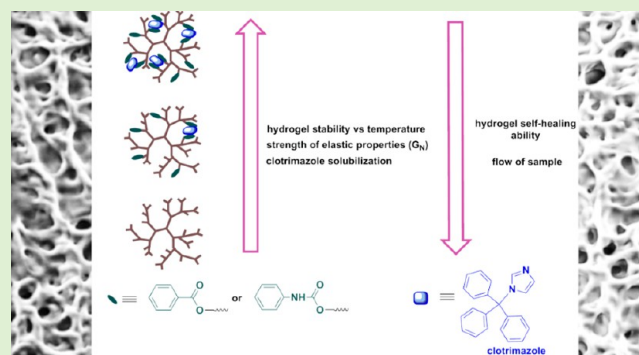


Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: Injectable, self-healing hydrogels with enhanced solubilization of hydrophobic drugs are urgently needed for antimicrobial intravaginal therapies. Here, we report the first hydrogel systems constructed of dynamic boronic esters cross-linking unimolecular micelles, which are a reservoir of antifungal hydrophobic drug molecules. The selective hydrophobization of hyperbranched polyglycidol with phenyl units in the core via ester or urethane bonds enabled the solubilization of clotrimazole, a water-insoluble drug of broad antifungal properties. The encapsulation efficiency of clotrimazole increases with the degree of the HbPGL core modification; however, the encapsulation is more favorable in the case of urethane derivatives. In addition, the rate of clotrimazole release was lower from HbPGL hydrophobized via urethane bonds than with ester linkages. In this work, we also revealed that the hydrophobization degree of HbPGL significantly influences the rheological properties of its hydrogels with poly(acrylamide-*ran*-2-acrylamidophenylboronic acid). The elastic strength of networks (G_N) and the thermal stability of hydrogels increased along with the degree of HbPGL core hydrophobization. The degradation of the hydrogel constructed of the neat HbPGL was observed at approx. 40 °C, whereas the hydrogels constructed on HbPGL, where the monohydroxyl units were modified above 30 mol %, were stable above 50 °C. Moreover, the flow and self-healing ability of hydrogels were gradually decreased due to the reduced dynamics of macromolecules in the network as an effect of increased hydrophobicity. The changes in the rheological properties of hydrogels resulted from the engagement of phenyl units into the intermolecular hydrophobic interactions, which besides boronic esters constituted additional cross-links. This study demonstrates that the HbPGL core hydrophobized with phenyl units at 30 mol % degrees via urethane linkages is optimal in respect of the drug encapsulation efficiency and rheological properties including both self-healable and injectable behavior. This work is important because of a proper selection of a building component for the construction of a therapeutic hydrogel platform dedicated to the intravaginal delivery of hydrophobic drugs.



INTRODUCTION

Vulvovaginal candidiasis is one of the most frequent gynecological infections.¹ Currently, the standard treatment of gynecological infections is the intravaginal administration of suppositories, which is very often an inefficient process, since the content of the suppository is commonly released uncontrolled and the amount of absorbed drug is limited. The lack of control over the drug delivery process may ultimately cause the disease recurrence in even more serious forms, e.g., due to drug resistance development, which consequently leads to chronic inflammation, miscarriage, and infertility. The current challenge in intravaginal therapies lies in the improvement of the drug formulations, which should extend the retention time of the carrier with the afflicted area in the vagina, assuring controlled delivery of drug molecules and increasing the drug bioavailability.

In the last decade, hydrogels, i.e., soft and porous cross-linked materials, became promising candidates for drug carriers dedicated to intravaginal therapies as an alternative to suppositories.¹ In the design of the hydrogels for gynecological applications, apart from the biocompatibility, hydrophilicity, the rheological properties facilitating its administration, and retention of the drug carrier, the possibility of the network degradation after the fulfillment of its function should be taken into account. Therefore, dynamic hydrogels, i.e., networks constructed of reversible cross-links, are the most suitable

Received: June 1, 2022

Revised: August 29, 2022

Published: September 8, 2022



systems for the construction of drug carriers. The reversible character of cross-links can assure not only the (self)-healing ability, injectability, and controlled diffusivity but also the gradual decomposition, which are of great importance in view of the intravaginal applications.^{2–4}

The significant challenge in the design of hydrogel-based drug carriers in intravaginal therapies is, however, the discrepancy between the hydrogel hydrophilicity and hydrophobic character of numerous medicines routinely applied in gynecology. It is mainly overcome by the utilization of micelles, which core solubilizes hydrophobic drugs, whereas the hydrophilic shell keeps the molecules soluble in the aqueous medium.^{5–8} In addition, this strategy can also reduce drug side effects and protect drug molecules against possible degradation.⁹ The main disadvantage of using standard micelles in view of the network construction, however, is their instability at a concentration below cmc of the amphiphilic copolymers or under the shear force,¹⁰ which leads to the degradation of micelles. Unimolecular micelles, i.e., dendrimer-type,^{11–13} star-shaped,¹⁴ or hyperbranched^{15,16} amphiphilic macromolecules, in which all chains are covalently bound, overcome the limitations of standard micelles. Among hyperbranched polymers, hyperbranched polyglycidol, HbPGL, thanks to its biocompatibility,^{15–21} low viscosity,²² high hydrophilicity,¹⁵ and numerous functional groups,²² according to us, deserves a particular interest in view of the formation of hydrogel-based carriers for gynecology applications. Diol groups present in the terminal units (approx. 30 mol % of all constitutional units) in the macromolecule corona can form reversible cross-links with boronic acid moieties, generating both self-healable and injectable dynamic hydrogel systems.^{2,16,29} A tree-like structure of HbPGL delivers nanosized pockets for low-molecular drug molecules.^{16,23,24} The efficient encapsulation of water-insoluble drug solubilization in HbPGL, however, requires the prior hydrophobization of monohydroxyl linear units (approx. 40 mol % of all constitutional units)²⁵ located in the HbPGL core.^{26–29} This synthetic strategy leads to the formation of unimolecular micelles, with the inner part being a reservoir for hydrophobic molecules, and a diol-rich shell that provides the solubility of the whole construct in water. The content of hydrophobic units incorporated into the HbPGL core, however, has to be carefully adjusted to assure the solubility of macromolecules in water. Until now, the hydrophobization of the HbPGL core was only performed with biphenyl derivatives achieving the encapsulation of nimodipine and pyrene.^{27,28} The solubility of biphenyl-enriched HbPGL derivatives in water was, however, significantly limited. Macromolecules, which over 45 mol % of all monohydroxyl units, i.e., above 18 mol % of all repeating units in the macromolecule, were modified and were insoluble in water.²⁶ To overcome this limitation and assure a uniform hydrophobic environment in the HbPGL core for effective drug encapsulation, we decided to modify the HbPGL core with a smaller aromatic system, incorporating phenyl moieties. Since most of the antimicrobial drugs applied in gynecological therapies are water-insoluble and contain an aromatic ring in the structure, we expected HbPGL with a phenyl-enriched core to be effective in encapsulating drugs according to the principle “like dissolves like”. In this study, we used clotrimazole, 1-((2-chlorophenyl)diphenylmethyl)-1*H*-imidazole, a highly hydrophobic drug that exhibits a broad spectrum of antifungal activity, to show the potential of the HbPGL with the phenyl-rich core for the encapsulation of water-insoluble drugs.

The unimolecular micelles based on the internally hydrophobized hyperbranched polyglycidol, however, have never been applied to the formation of dynamic hydrogels based on boronic ester cross-links. Thus, the influence of the hydrophobization of the HbPGL core on the rheological properties of such hydrogels is unknown. In the case of hydrogels built from linear water-soluble macromolecules with partially hydrophobized repeating units, the enhanced toughness in comparison to the hydrogels constructed of the unmodified polymer has been reported.^{30,31} The association of hydrophobic moieties in the form of micelles, apart from the intentionally applied cross-linking mechanism, played the role of additional temporary junction zones and thus influenced the network properties.³⁰ Hydrogels prepared by the micellar cross-linking copolymerization of acrylamide and *N,N'*-methylenebisacrylamide cross-linker in the presence of hydrophobic comonomers such as *N*-butyl, *N*-hexyl, *N*-octyl, and *N,N*-dihydroxyacrylamide showed fine-tuned toughness by adjusting the fraction of hydrophobic units and the length of hydrophobic chains.³¹ Moreover, the hydrogel of high mechanical stability constructed entirely on hydrophobic associations was demonstrated by Mihajlovic et al.³² The multiblock copolymer of hydrophilic poly(ethylene glycol) and hydrophobic dimer fatty acid (DFA) was arranged into the three-dimensional (3D) network thanks to the self-assembling of DFA units in water, which played the role of micellar-like cross-links.

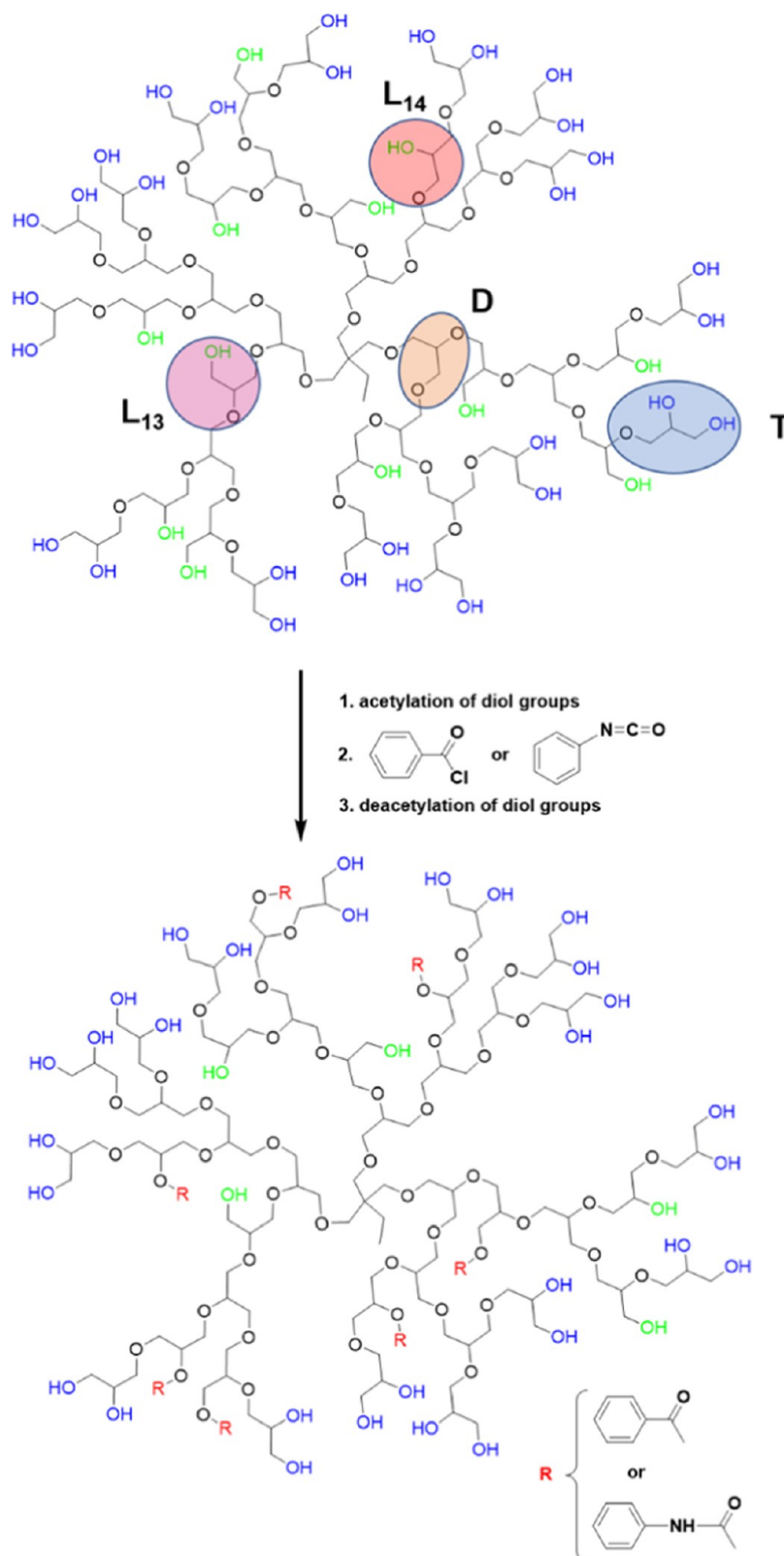
In this study, we focus on the influence of the degree of hydrophobization of the HbPGL core with phenyl groups incorporated via ester or urethane linkages on the rheological properties of hydrogels constructed with poly(acrylamide-*ran*-2-acrylamidephenylboronic acid), such as injectability, flow behavior, and self-healing properties. The optimization of a degree of HbPGL core hydrophobization is necessary to attain the hydrogel platform, displaying the ability to encapsulate clotrimazole and suitable rheological characteristics important for gynecological applications. To the best of our knowledge, it is the first report on the formation of hydrogels composed of the internally hydrophobized HbPGL dedicated as drug carriers for antimicrobial gynecological therapies. Our proposed hydrogel systems can overcome the limitations of currently accessible commercial drug formulations in gynecological therapies.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials. Glycidol and 1,1,1-tris(hydroxymethyl)propane were purchased from Sigma-Aldrich. 2,2-Dimethoxypropane, benzoyl chloride, and phenyl isocyanate were purchased from Alfa Aesar. Anhydrous pyridine was purchased from Acros Organics. PTSA (Sigma-Aldrich) was dried with benzene. Glycidol was dried with 4 Å molecular sieves and distilled under reduced pressure. Comonomer 2-acrylamidephenylboronic acid pinacol ester, 2-AAPBAE, was synthesized according to the procedure reported in ref 33. The α,α' -azobis(isobutyronitrile), AIBN (Fluka), was recrystallized from methanol. Clotrimazole (Sigma-Aldrich) was used as received. Dialysis tubes (SnakeSkin TM 3.5 K MWCO) were purchased from Thermo Fisher Scientific. Surfactant-free cellulose acetate (SFCA, 0.8 μ m) filters were purchased from Sartorius. Deionized water was prepared in SolPure XIO P (Elkar, Poland), where conductivity was equal to 0.055 μ S. Na₂HPO₄ and KH₂PO₄ were purchased from Chempur. Tween80 was purchased from Karl Roth. Acetonitrile for HPLC-super gradient was purchased from POCH.

Synthesis of Hyperbranched Polyglycidol (HbPGL). The synthesis of hyperbranched polyglycidol was carried out in a thermostated glass reactor equipped with a steel mechanical stirrer

Scheme 1. Synthetic Route Leading to the Internal Hydrophobization of HbPGL with Phenyl Units Incorporated *via* Ester or Urethane Bonds^a



^aL₁₃ and L₁₄ denote the linear constitutional units of HbPGL, whereas D and T units correspond to dendritic and terminal units, respectively.

under an argon atmosphere. Ten percent of hydroxyl groups of 1,1,1-tris(hydroxymethyl)propane (94 mg; 7×10^{-4} mol) were converted into alcoholates in tetrahydrofuran (THF) using NaH (2.1×10^{-4}

mol). Twenty-five milliliters of glycidol was dropped into the reactor at a rate of 2 mL/h, and the polymerization was conducted for 24 h at 95 °C. The product was dissolved in methanol, twice precipitated into

Table 1. Characteristics of Internally Hydrophobized HbPGL Macromolecules Synthesized in the Reaction with Benzoyl Chloride

polymer	molar fraction of hydrophobized constitutional units bearing monohydroxyl groups	molar fraction of hydrophobized constitutional units	number of hydrophobic moieties per one macromolecule	solubility in water at RT	T_g (°C) (DSC)
HbPGL_BE4	4.1	1.6	2	soluble	−24.7
HbPGL_BE15	14.8	5.9	6	soluble	−26.4
HbPGL_BE20	20.4	8.2	8	soluble	−22.3
HbPGL_BE27	27.5	11.0	12	soluble	−16.8
HbPGL_BE37	37.2	14.9	16	soluble	−18.7
HbPGL_BE49	49.4	19.8	21	soluble	−10.2
HbPGL_BE58	57.6	23.0	24	soluble	−3.6
HbPGL_BE74	74.1	29.6	31	limited solubility	1.7
HbPGL_BE81	81.1	32.4	34	limited solubility	0.4

Table 2. Characteristics of Internally Hydrophobized HbPGL Macromolecules Synthesized in the Reaction with Phenyl Isocyanate

polymer	molar fraction of hydrophobized constitutional units bearing monohydroxyl groups	molar fraction of hydrophobized constitutional units	number of hydrophobic moieties per one macromolecule	solubility in water at RT	T_g (°C) (DSC)
HbPGL_PC4	3.9	1.6	2	soluble	−20.2
HbPGL_PC16	16.3	6.5	7	soluble	−16.6
HbPGL_PC31	31.3	12.5	13	soluble	−8.2
HbPGL_PC55	55.0	22.0	24	limited solubility	8.6
HbPGL_PC82	82.2	32.9	34	insoluble	25.0

acetone, and dried. Then, the polymer was dissolved in deionized water and dialyzed using dialysis tubes.

Degree of branching (DB) of synthesized neat HbPGL was 0.56. The molar fraction of dendritic (D) and linear constitutional units L_{13} and L_{14} bearing monohydroxyl groups was 0.27 and 0.40, respectively, whereas the molar fraction of terminal units (T) containing diol moieties was 0.33. D, L_{13} , L_{14} , and T units are denoted in Scheme 1. The weight average molecular weight and the molecular weight distribution were $M_w = 7800$ and $D = 1.70$, respectively.

Synthesis of Hyperbranched Polyglycidol Acetal (AC-HbPGL). The mixture of HbPGL (24 g, 0.127 mol of diol units), 2,2-dimethoxypropane (156 mL, 1.27 mol), and PTSA (0.322 g, 1.86 mmol) was ultrasonicated for 3 h at 40 °C. Then, the crude product was diluted with chloroform and extracted three times with saturated Na_2CO_3 solution to remove PTSA. The organic phase was dried over $MgSO_4$ and dialyzed in chloroform for 24 h. The product was dried under a vacuum and analyzed with 1H and ^{13}C NMR spectroscopies in $DMSO-d_6$ to confirm that all diol groups are protected.

1H NMR (500 MHz, $MeOD-d_4$) δ (ppm): 4.28 (CH-T-Acet); 4.08 (CH_2 -T-Acet); 3.89 (CH_2 -T-Acet); 3.85–3.40 (HbPGL backbone); 1.41 (CH_3 -T-Acet); 1.36 (CH_3 -T-Acet); 0.93 (CH_3 -initiator).

^{13}C NMR (500 MHz, $MeOD-d_4$) δ (ppm): 109.10–109.02 (C-T-Acet); 80.09 (CH- L_{13}); 78.87–78.52 (CH-D); 74.95–74.75 (CH-T-Acet); 72.66 (CH_2 -2 L_{14}); 72.13 (CH_2 -T-Acet); 71.12 (CH_2 -2D); 69.51 (CH_2 - L_{13}); 69.24 (CH- L_{14}); 66.31 (CH_2 -T-Acet); 61.43 (CH_2 - L_{13}); 25.94–24.50 (CH_3 -T-Acet).

Hydrophobization of AC-HbPGL Core with Benzoate Groups (Ester Derivative). AC-HbPGL was dried with benzene by azeotropic distillation under argon before the modification. Then, the polymer was dissolved in pyridine in the argon atmosphere and the resulting solution was chilled to 0 °C. Benzoyl chloride was slowly added. After dropping the entire amount of benzoyl chloride, the solution was allowed to reach room temperature and left to stir for 24 h. The solvent was evaporated, and the product was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and dialyzed for 24 h with at least three solvent exchanges. Then, DMSO was removed by evaporation under reduced pressure. The degree of modification was calculated based on

the relation between the integration of acetal protons (in the range of the chemical shift between 1.15 and 1.35 ppm) and the integration of aromatic protons of benzoyl groups in the range from 7.30 to 8.10 ppm in 1H NMR spectra. Using different amounts of benzoyl chloride to hydrophobize the HbPGL core, the polymers of different degrees of modification were obtained. After the determination of the hydrophobization degree, the diol groups were deprotected by adding the aqueous solution of 0.1 M HCl to the polymer solution in DMSO and stirred overnight. Finally, the mixture was dialyzed against deionized water and analyzed with 1H , ^{13}C INVGATE, DEPT, and 1H DOSY NMR spectroscopy. The characteristics of HbPGL hydrophobized via ester linkages are given in Table 1.

The description of 1H and ^{13}C NMR spectra of a final product, i.e., after diol group deprotection.

1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm): 7.95–7.50 (aromatic protons); 5.25 (CH, L_{14} hydrophobized); 4.90–4.35 (OH groups); 4.23 (CH_2 , L_{14} hydrophobized); 4.00–3.00 (HbPGL backbone).

^{13}C NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm): 166.11, 165.77 (C=O, ester), 133.81 (4-C, Ar), 130.21–129.19 (1-C, 2-C, 3-C, 5-C, 6-C), 80.26 (CH- L_{13} -hydrophobized), 78.61–78.31 (CH-D), 73.29 (CH_2 -2 L_{14}), 72.10–71.23 (CH_2 -T, D), 70.94 (CH-T), 69.97 (CH_2 - L_{13} -hydrophobized), 69.31 (CH_2 - L_{13}), 69.02 (CH- L_{14} -hydrophobized), 63.53 (CH_2 -T), 61.43 (CH_2 - L_{13}).

Hydrophobization of AC-HbPGL Core with Phenyl Carbamate Groups (Urethane Derivative). AC-HbPGL was dried with benzene by its distillation under argon prior to the modification. Then, the polymer was dissolved in pyridine in the argon atmosphere and the resulting solution was stirred and heated to 50 °C. The phenyl isocyanate was slowly added to the solution, and the reaction was conducted for 24 h. Then, the mixture was dialyzed against DMSO. DMSO was removed by evaporation under reduced pressure. The degree of modification was estimated using 1H NMR spectroscopy based on the comparison of the relation of the integration of acetal protons (in the range of the chemical shift between 1.15 and 1.35 ppm) and aromatic protons in the range from 6.75 to 7.60 ppm. Using different amounts of phenyl isocyanate to modification of the HbPGL core, the polymers of different degrees of hydrophobization were obtained. After the determination of the

hydrophobization degree, the diol groups were deprotected by adding an aqueous solution of 0.1 M HCl to the polymer solution in DMSO and stirring overnight. Finally, the mixture was dialyzed against deionized water and analyzed with ^1H , ^{13}C INVGATE, DEPT, and ^1H DOSY NMR. The characteristics of hydrophobized HbPGL *via* urethane linkages are given in Table 2.

The description of ^1H and ^{13}C NMR spectra of a final product, i.e., after diol group deprotection.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 9.71 (NH); 7.45–6.97 (aromatic protons); 4.75 (CH, L_{14} -hydrophobized); 4.80–4.35 (OH groups); 4.20 (CH_2 , L_{14} -hydrophobized); 3.80–3.20 (HbPGL backbone).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD- d_4): 154.72, 154.34 (C=O, urethane), 140.36 (1-C, Ar), 130.01 (3-C, 5-C, Ar), 123.68 (4-C), 119.48 (2-C, 6-C, Ar), 81.18 (CH- $L_{1,3}$ -hydrophobized), 79.41–79.13 (CH-D), 74.12 (CH_2 -2 $L_{1,4}$), 72.91–72.10 (CH_2 -T, 2D), 71.75 (CH-T), 70.98 (CH_2 - $L_{1,3}$), 70.62 (CH_2 - $L_{1,3}$ -hydrophobized), 70.13 (CH- $L_{1,4}$ -hydrophobized), 69.84 (CH- $L_{1,4}$), 64.34 (CH_2 -T), 62.15 (CH_2 - $L_{1,3}$).

Synthesis of Poly(AM-*ran*-2-AAPBA) and Poly(acrylamide-*ran*-2-acrylamidephenylboronic Acid) with 9.0 mol % of 2-AAPBA. An acrylamide copolymer with a 9.0 mol % 2-AAPBA content has been synthesized using a conventional radical copolymerization of acrylamide (2 g; 28.10 mmol) and 2-acrylamidephenylboronic acid pinacol ester (0.613 g; 2.24 mmol) initiated with AIBN. The initial molar ratio of comonomers to AIBN was 220:1. Polymerization was carried out in 15 mL of dimethylformamide (DMF)/dioxane mixture (5:1 v/v) at 70 °C for 16 h. The polymerization mixture was diluted in water, and the copolymer was precipitated into acetone and dried. Next, the copolymer was dissolved in an alkaline solution of NaOH (1 wt %) and dialyzed against deionized water using a 1000 MW cutoff dialysis membrane, at first against the alkaline aqueous solution and then against water, which was changed several times to reach the neutral pH. Dialysis was necessary to hydrolyze pinacol boronic ester units and remove the released pinacol. ^1H NMR spectrum revealing the molar composition of the synthesized copolymer is presented in the Supporting Information (SI) in Figure S1. $M_n = 43,000$ ($D = 1.80$) was determined based on the GPC spectrum (Figure S2).

Solubilization of Clotrimazole within Unimolecular Micelles Based on the Internally Hydrophobized Polyglycidol. A stock solution of clotrimazole (9 mg/mL) in methanol was prepared. A total of 75 mg of each internal hydrophobized polyglycidol was dissolved in 1 mL of methanol. Three milliliters of clotrimazole solution was added to the copolymer solution. The mixture was stirred for 6 h. Subsequently, methanol was allowed to evaporate at 37 °C overnight. The dry polymer–drug content was suspended in 10 mL of deionized water. The suspension was filtered using a 0.8 μm SFCA filter and lyophilized. The amount of drug loaded in the HbPGL-based micelles was determined with ^1H NMR spectroscopy.

Drug Release Experiment. A sample of a hydrophobized polymer (HbPGL_BE37 or HbPGL_PC31) containing 1.3 mg of clotrimazole was dissolved in 9 mL of phosphate-buffered saline (PBS) pH = 5.6 and transferred into a regenerated cellulose dialysis membrane (MWCO = 3500) with a magnetic stirrer inside. The dialysis bag was then immersed in 250 mL of PBS pH = 5.6 with 1% of Tween80 (v/v). At given time points, 20 mL of the solution was collected and replaced with 20 mL of fresh PBS/Tween80 solution. Subsequently, 3 $\times$ 50 mL of dichloromethane was added to each of the collected samples to extract clotrimazole from the aqueous phase. The organic phases were dried over MgSO_4 for 30 min while stirring and then liberated from dichloromethane by evaporation under reduced pressure. The dry product was dissolved in 4 mL of acetonitrile and filtered using a 0.2 μm poly(tetrafluoroethylene) (PTFE) filter.

The quantification of the released clotrimazole was determined by an ACQUITY UPLC I-Class chromatography system equipped with a binary solvent pump and a photodiode array detector (Waters Corp., Milford, MA). The separation of an analyte was achieved using an ACQUITY UPLC BEH C18 column (100 $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm)

maintained at a 45 °C temperature. The mobile phase was prepared by mixing 0.1% formic acid (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B). The elution gradient was 32% B (0–1.0 min), 32–95% B (1.0–3.0 min), 95–95% B (3.0–3.5 min), 95–32% B (3.5–3.52 min), and 32–32% B (3.52–7.0 min). The flow rate was 0.45 mL/min, and the injection volume was 4 μL . The optimal absorption wavelength for clotrimazole was determined and set at 195 nm. The initial stock calibration solution of standards was created with a concentration of 1 mg/mL in acetonitrile.

The stock solution was serially diluted with acetonitrile to obtain working solutions at several concentration levels. The calibration curves were prepared at seven different concentrations of clotrimazole solutions and were linear over a concentration range from 0.78 to 50 $\mu\text{g/mL}$ with a correlation coefficient of >0.999. The system was controlled using MassLynx software (Version 4.1), and data processing (peak area integration, construction of the calibration curve) was performed by a TargetLynx program.

Cell Culture. Dermal microvascular endothelium cells (HMEC-1) were grown in an MCDB131 medium supplemented with hydrocortisone, L-glutamine, and epidermal growth factor (VEGF). Human cervical cancer endothelial (HeLa) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). Ten percent fetal bovine serum (FBS) and streptomycin (100 mg/mL) were added to all cell culture media. The cells were grown in T-75 culture flasks at 310 K in an atmosphere containing 5% CO_2 . The cells were subcultured every 2 or 3 days. Cells were harvested and used in experiments after obtaining an 80–90% confluence.

The number of viable cells was determined by the trypan blue exclusion assay with the use of a Countess Automated Cell Counter (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cells were seeded in 96-well plates at 1.5×10^4 cells/well in 100 μL of an appropriate medium. After seeding, the plates were incubated for 24 h in a humidified atmosphere containing 5.0% CO_2 at 310 K to allow cells to attach to the plates.

Determination of Cytotoxicity. The cytotoxicity study was carried out for neat HbPGL, and its hydrophobized derivatives were obtained by the phenyl moiety incorporation via ester (HbPGL_BE4, HbPGL_BE15, HbPGL_BE20, HbPGL_BE37) or urethane bonds (HbPGL_PC4, HbPGL_PC15, HbPGL_PC31) on the cell viability determined by the usage of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay.

Briefly, to the 96-well plates containing cells at a density of 1.5×10^4 cells/well in medium, different concentrations (0.1, 1, 10, 50, 100 μM) of all compounds were added. Cells were incubated with the polymers for 24 and 48 h in a 310 K humidified atmosphere containing 5% CO_2 . After the incubation period, cells were washed with 50 μL of phosphate-buffered saline (PBS). Next, 50 μL of a 0.5 mg/mL solution of MTT in PBS was added to each well and cells were further incubated under normal culture conditions for 3 h. After incubation, the residue MTT solution was removed and the obtained formazan precipitate was dissolved in DMSO (100 μL /well). The conversion of the tetrazolium salt (MTT) to a colored formazan by mitochondrial and cytosolic dehydrogenases is a marker of cell viability. Before the absorbance measurement plates were shaken for 1 min and the absorbance at 570 nm was measured on the PowerWave HT Microplate Spectrophotometer (BioTek).

Statistical Analysis. For statistical significance testing, one-way analysis of variance (ANOVA) for concentration series and post hoc Tukey's test for pairwise difference testing were used. In all tests, p -values <0.05 were considered to be statistically significant. Data are presented as arithmetic mean $\pm$ standard deviation (SD). The cytotoxicity values were related to the untreated control (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005, **** p < 0.0001) as well as between unmodified hyperbranched polyglycidol and modified ones at the same compound concentration ($^{\#}p$ < 0.05, $^{\#\#}p$ < 0.01, $^{\#\#\#}p$ < 0.005, $^{\#\#\#\#}p$ < 0.0001).

Hydrogel Formation. Hydrogels were prepared by mixing 0.25 mL of an aqueous solution containing 0.05 g of poly(AM-*ran*-2-AAPBA) with 0.15 mL of an aqueous solution containing 0.055 g of each HbPGL-based sample.

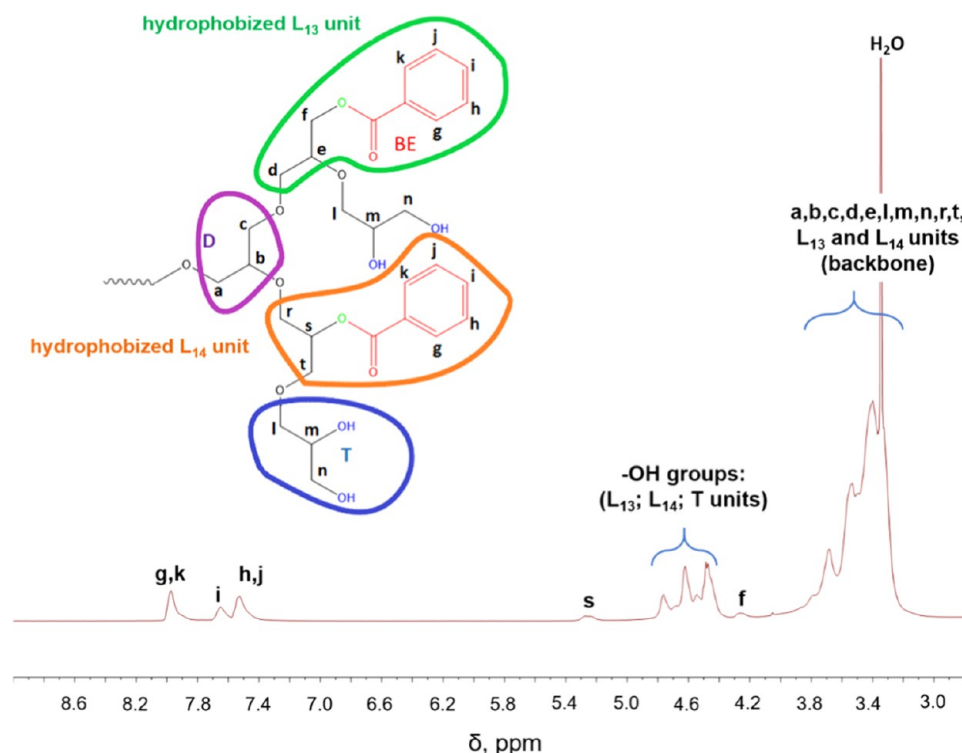


Figure 1. Exemplary ^1H NMR spectrum of the internally hydrophobized HbPGL with phenyl moieties incorporated *via* ester bonds (HbPGL_BE26) recorded in $\text{DMSO}-d_6$.

NMR Spectroscopy. ^1H and ^{13}C INVGATED NMR spectra were recorded using a Bruker Avance NEO AV 400 MHz. ^1H DOSY measurements were carried out at 295 K on a Bruker Avance III 500 spectrometer equipped with a 5 mm BBI probe head with a z-gradient coil and a GAB/2 gradient unit capable of producing B0 gradients with a maximum strength of 50 G/cm. The BCU-05 cooling unit, managed by the BVT3300 variable temperature unit, was used for temperature control and stabilization. The spectrometer was controlled with a PC computer running under Windows 7 (64 bit) OS with the TopSpin 3.1 program.

For measurements, each sample was stabilized at 295 K for at least 10 min before data accumulation, and the ^1H $\pi/2$ pulse length was checked and adjusted carefully for each sample. The standard Bruker pulse program `dstebpgp3s` was selected for measurements using double stimulated echo for convection compensation and LED (Longitudinal Eddy Current Delay) using bipolar gradient pulses for diffusion and three spoil gradients. The shape of all gradient pulses was sinusoidal, the gradient spoil pulse was 0.6 ms, the delay for gradient recovery was set at 0.2 ms, and the LED was set at 5 ms and held constant in all experiments. The gradient pulse (small delta; $\delta/p30$) was kept constant throughout the whole series of temperature measurements, and the diffusion time (big delta; $\Delta/D20$) was changed to achieve the desired signal attenuation at the maximum gradient strength. The DOSY experiments were run in pseudo-2D mode with gradients varied exponentially from 5% up to 95%, typically in 16 steps, with 16 scans per step. Spectra were processed by TopSpin 3.1 software supplied by the spectrometer manufacturer. The 1 Hz line broadening Lorentzian function was applied, and each row was phased and baseline-corrected before executing the Fourier transformation in the F2 dimension. Diffusion coefficient values, for resolved ^1H signals, were extracted from the T1/T2 analysis module of the TopSpin 3.1 program.

NMR spectra of polymer solutions were recorded at deuterated solvents ($\text{DMSO}-d_6$, $\text{MeOD}-d_1$).

Gel Permeation Chromatography (GPC). The average molecular weight of HbPGL was determined with gel permeation chromatography (GPC) using a Shimadzu Pump LC-20AD and a Shimadzu SIL-20A HT Autosampler. A refractometer RI-Optilab-T-

rex-Wyatt and a laser photometer DAWN 8+ (Wyatt Technology) were used as detectors. N,N' -Dimethylformamide was used as an eluent at a flow rate of 0.8 mL/min at 25 $^\circ\text{C}$. $M_w = 7800$, $M_w/M_n = 1.70$.

Differential Scanning Calorimetry (DSC). DSC analysis of polymers was performed on a 2920 modulated DSC (TA Instruments) at a heating and cooling rate of 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$. Samples were annealed at 100 $^\circ\text{C}$ before the cooling/heating loop was applied.

Rheology. Gel formation was confirmed with oscillation frequency sweep tests carried out in the linear viscoelastic regime using a parallel plate–plate geometry of 8 mm diameter with a 0.3 mm gap on a Thermoscientific HAAKE MARS 40 rheometer. A strain sweep measurements for the hydrogel samples were performed at a frequency of 1 Hz in the range of strain from 0.02 to 2000%. Frequency sweep tests were carried out at 10, 25, and 40 $^\circ\text{C}$ in the linear viscoelastic regime. Temperature sweep tests in the range from 10 to 50 $^\circ\text{C}$ were performed at a frequency of 1 Hz and 1% of strain using the continuous heating program with a heating rate of 5 $^\circ\text{C}/\text{min}$.

RESULTS AND DISCUSSION

Hydrophobization of Hyperbranched Polyglycidol.

For the study focused on the influence of hydrophobization of the hyperbranched polyglycidol core on the properties of synthesized macromolecules and their hydrogels, we applied a polymer where the molecular weight determined based on GPC was 7800 ($\text{DP}_n = 105$). HbPGL polymers of such molecular weight are routinely obtained *via* anionic polymerization of glycidol conducted in bulk.²⁵ The total molar fraction of linear units (L_{13} and L_{14}) in the interior of HbPGL (Scheme 1) bearing monohydroxyl moieties, which can be hydrophobized, was 0.40. The process of HbPGL core hydrophobization required the protection of 1,2-diol moieties of terminal units (33 mol % of all repeating units) to avoid the modification of the macromolecular corona. It was achieved by the protection of diol groups in the form of acetals in the

reaction with solketal catalyzed with PTSA. We synthesized a set of HbPGLs differing in a number of phenyl moieties incorporated *via* ester or urethane bonds in the macromolecular core, applying benzoyl chloride or phenyl isocyanate (Scheme 1), respectively. The characteristics of hydrophobized HbPGLs with carboxyphenyl and phenyl carbamate groups, respectively, are given in Tables 1 and 2, respectively.

The covalent immobilization of phenyl units within the HbPGL core was confirmed based on ^1H , ^{13}C INVGATED NMR, and ^1H DOSY NMR spectroscopy in DMSO- d_6 (Figures S3–S70). The degree of hydrophobization of monohydroxylated repeating units was determined for HbPGL acetals based on the comparison of the integration of dimethylacetal groups of terminal units (in the range between 1.15 and 1.35 ppm) with the integration of phenyl protons at the chemical shift in the region from 7.30 to 8.10 ppm for ester (Figures S3–S11) and from 6.75 to 7.60 ppm in the case of urethane derivatives (Figures S39–S46). In the case of HbPGL hydrophobized via urethane bonds, the conversion was also confirmed by signals at 9.65 ppm coming from NH protons of urethane bonds in the ^1H NMR spectrum (Figures S39–S46). Deprotection of diol groups in the terminal units for both ester and urethane derivatives was confirmed based on ^1H and ^{13}C NMR spectra (Figures 1, S12–S29, and S47–S62). In addition, the ^1H DOSY NMR analysis of deprotected HbPGL derivatives showed that the values of the diffusion coefficients of protons corresponding to the aromatic protons (in the region 6.80–7.80 ppm for urethane derivatives and 7.20–8.10 ppm for ester derivative) and protons of HbPGL backbone (3.20–4.00 ppm) were the same, which confirmed that all phenyl moieties are covalently immobilized via ester/urethane linkages with HbPGL and that all modified polymers were free of unreacted compounds (Figures S30–S38 and S63–S70). The detailed analysis of ^{13}C INVGATED NMR spectra of hydrophobized HbPGLs revealed the reduction of the integration of signals corresponding to carbon atoms of linear units, i.e., L_{13} and L_{14} in comparison to neat HbPGL, along with the appearance of signals of carbonyl groups that reacted with both primary and secondary alcohols in L_{13} and L_{14} units, respectively, in the case of functionalization with benzoyl chloride and phenyl isocyanate.

The degree of HbPGL's internal OH group hydrophobization with phenyl units *via* ester or urethane bonds ranged from 4 to 82 mol %. Generally, the hydrophobized HbPGLs with phenyl moieties incorporated via urethane linkages turned out to be less soluble in water. For example, HbPGL_PC66 was completely insoluble in water, whereas HbPGL_BE81 was partially soluble.

DSC analysis of all hydrophobized HbPGLs with phenyl carbamate and phenyl ester groups revealed significant changes in the glass transition values, T_g , in comparison to the neat polymer ($T_g = -29.9\text{ }^\circ\text{C}$). T_g increased with the increase of the hydrophobization degree of HbPGL; however, these changes were more significant for urethane derivatives. For instance, T_g for HbPGL_BE15 was equal to $-26.4\text{ }^\circ\text{C}$, whereas for HbPGL_PC16, it was approximately $10\text{ }^\circ\text{C}$ higher. A higher degree of HbPGL hydrophobization with the phenyl carbamate groups led to a further increase in the T_g of synthesized polymers, reaching positive Centidegrees values. This behavior can be ascribed to the fact that urethane linkages are prone to form hydrogen bonds, which is especially favorable in low-temperature range^{34,35} and thus leads to the

restriction of segmental motions in wider temperature range and thus stiffening of HbPGL_PC macromolecules.

Clotrimazole Encapsulation and *In Vitro* Release Study. Clotrimazole, which has three unconjugated phenyl rings and an imidazole moiety in the structure and is routinely used in the treatment of candidiasis caused by *Candida albicans* and other *Candida* species, was used to assess the ability of HbPGL with varying contents of phenyl groups to solubilize hydrophobic drugs. Its poor solubility in water ($0.49\text{ }\mu\text{g/mL}$)³⁶ requires the development of polymer components that enhance its solubility and thus increase its bioavailability and, as a result, boost the therapy efficiency.

The process of clotrimazole solubilization was performed according to the ultrasound-assisted solvent evaporation method. The encapsulation efficiency (EE) was estimated using ^1H NMR spectroscopy.

To assess the effect of the hydrophobization of the HbPGL core on the solubilization of clotrimazole into unimolecular micelles based on HbPGL, we applied unmodified HbPGL as a reference, in which no clotrimazole molecules could have been encapsulated. HbPGLs with a low degree of hydrophobization (4 and 15 mol % of modified monohydroxyl constitutional units) via both ester and urethane linkages were virtually unable to encapsulate the drug (Table 3). The encapsulation

Table 3. Results of Clotrimazole Solubilization, i.e., Drug Loading and Encapsulation Efficiency, EE, within HbPGL, Where the Core Was Internally Hydrophobized with Phenyl Moieties Incorporated via Ester or Urethane Linkages, Respectively

polymer	drug loading (mg/g)	EE (%)
HbPGL_BE4	2.10	0.3
HbPGL_BE15	2.95	0.5
HbPGL_BE27	10.4	2.6
HbPGL_BE37	210	55.0
HbPGL_BE49	259	71.4
HbPGL_BE58	473	88.8
HbPGL_BE74	nonfiltrated structures	
HbPGL_BE81	nonfiltrated structures	
HbPGL_PC4	0.48	0.1
HbPGL_PC16	3.50	0.8
HbPGL_PC31	386	67.2
HbPGL_PC55	nonfiltrated structures	

efficiency, EE, was below 1%. Upon suspending the polymer/drug mixture in water, clotrimazole precipitated and was removed in the filtration process. This behavior can result from the fact that a low number of phenyl units randomly distributed in the HbPGL core does not provide enough hydrophobic environment to capture the highly hydrophobic clotrimazole.

A substantial amount of encapsulated drugs have been observed for HbPGLs, in which at least 30 mol % of monohydroxyl units were hydrophobized. In the case of ester derivatives upon the increase of the degree of hydrophobization in the range from 37 to 58 mol %, the drug loading increased gradually from 210 to 473 mg per gram of polymer, with the encapsulation efficiency between 55 and 90%. Among all of the synthesized urethane derivatives, only in the case of HbPGL_PC31, the process of encapsulation was effective (EE = 67.2%) with drug loading equal to 386 mg/g. The hydrophobization of the HbPGL core in the range of 74–

81 mol % in the case of ester derivatives and for urethane derivatives at the degree of modification equal to 55 mol % turned out to be excessive as the encapsulation process led to the formation of aggregates, where filtration was impossible. Based on the drug encapsulation experiments, we can conclude that HbPGLs hydrophobized via urethane bonds displayed a higher ability of clotrimazole solubilization as the drug loading achieved for HbPGL_PC31 was higher in comparison to the ester analog. This behavior can be explained by the possibly formed hydrogen bonds between urethane bonds present in the polymer and the imidazole of clotrimazole.

To evaluate the effect of a chemical bond by which a phenyl moiety was immobilized within the HbPGL structure, we investigated clotrimazole release from benzoate (HbPGL_BE37) and phenyl carbamate (HbPGL_PC31) derivatives (Figure 2). These systems displayed a comparable

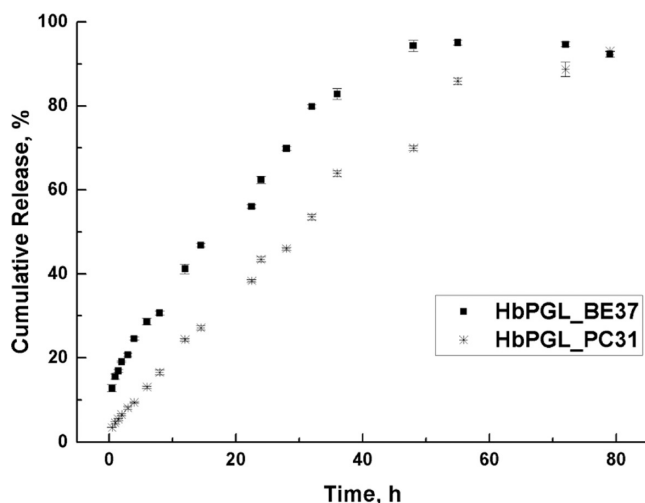


Figure 2. Clotrimazole release profile from HbPGLs hydrophobized with phenyl moieties immobilized via ester (HbPGL_BE37) or urethane (HbPGL_PC31) bonds.

degree of hydrophobization and significant drug loading. Generally, both systems displayed gradual drug release; however, a rapid initial burst release (approx. 15% after 0.5 h) was only observed in the case of the ester derivative. Moreover, a slower release rate of clotrimazole was observed for the urethane derivative. For instance, 50% of cumulative drug release was observed after 28 h for the urethane HbPGL derivative, while in the case of the ester derivative, this release level was attained after 18 h. These data indicate a higher affinity of clotrimazole toward the phenyl carbamate HbPGL matrix.

Cytotoxicity Measurements. The cytotoxicity assay was carried out for neat HbPGL and its phenyl-enriched derivatives using the MTT test on non-neoplastic (dermal microvascular endothelium cells, HMEC-1) and neoplastic (human cervical cancer endothelial, HeLa) line cells. The viability of both HMEC-1 and HeLa cells was evaluated after 24 and 48 h of incubation at 37 °C (Figures S71 and 3, respectively). As shown in Figure 3, even at the highest concentration of each polymer used of 100 μ M, no significant decrease in HMEC-1 and HeLa cell viability was observed even after 48 h of incubation. The lack of cytotoxicity of such high concentrations of polymer samples is important due to hydrogel

formulations, which makes these polymers prospective from the point of view of biomedical applications.

Influence of Temperature on the Rheological Properties of Hydrogels Constructed of Internally Hydrophobized Hyperbranched Polyglycidol and Acrylamide Copolymer Equipped with 2-Acrylamidephenylboronic Acid, Poly(AM-ran-2-AAPBA). The hydrogel constructed of neat hyperbranched polyglycidol cross-linked with acrylamide copolymer equipped with 2-acrylamidephenylboronic acid moieties, poly(AM-ran-2-AAPBA), is a reversible network thanks to the dynamic equilibrium between boronic acids, diols, and formed boronic ester species. It is known that the networks constructed of boronic ester cross-links are thermoresponsive.^{2,15,16} It results from the fact that the formation of boronic esters is an exothermic process,^{16,37} and thus the increase in temperature is not favorable for the network tie-points that assure the network integrity. The gradual heating of the neat HbPGL-based hydrogel from 10 to 50 °C was accompanied by a consecutive decrease of storage modulus G' and then dropped below G'' at approximately 40 °C (Figure S72), which corresponds to the transition of the hydrogel to the liquid state as a result of the equilibrium shift to substrates, i.e., boronic acids and diols (Scheme 2).

The incorporation of aromatic groups in the HbPGL's core resulted in significant changes in the thermal behavior of constructed hydrogels with poly(AM-ran-2-AAPBA) (Figure 4). The higher the degree of hydrophobization of HbPGL used for the construction of hydrogel, the higher gel–liquid transition temperature was observed ($G' < G''$) (Figure 4). Regardless of whether phenyl rings were incorporated via ester or urethane linkages, the comparable thermal behavior of hydrogels constructed of macromolecules at a certain hydrophobization degree was observed. For hydrogels composed of HbPGL, where approx. 30 mol % of monohydroxyl groups were hydrophobized via ester linkages (HbPGL_BE27), and HbPGLs, where less than 30 mol % of monohydroxyl groups were modified via urethane bonds, the crossover of storage and loss moduli ($G' = G''$) was observed above 50 °C. In the case of hydrogels built of HbPGL with a higher degree of hydrophobization, i.e., starting from HbPGL_PC31 and HbPGL_BE37, G' was higher than G'' in the whole investigated temperature range from 10 to 50 °C. Moreover, the difference between G' and G'' values at the low-temperature range increased along with the increase of the hydrophobization degree of applied HbPGL for the gel construction. For example, at 15 °C, $\tan \delta$ for the hydrogel systems constructed of HbPGL hydrophobized at 15 mol % was approximately 0.25, whereas for HbPGL_PC55, $\tan \delta$ was equal to 0.10. This behavior inputs about the higher contribution of solid-like behavior in the case of hydrogels made of hydrophobized HbPGL in comparison to the hydrogel based on the neat HbPGL.

Viscoelastic Properties of Hydrogels Constructed of Internally Hydrophobized Hyperbranched Polyglycidol and Poly(AM-ran-2-AAPBA). All hydrogel systems composed of both neat and hydrophobized HbPGLs are viscoelastic networks, which were revealed based on the frequency sweep experiments (Figures 5 and S73–S76). The study was carried out at 10, 25, and 40 °C. In the higher frequency range, i.e., shorter time scales, the storage modulus exceeded the value of the loss modulus ($G' > G''$). It results from the fact that the lifetime of boronic ester cross-links was longer in comparison to the applied strain. The decrease of

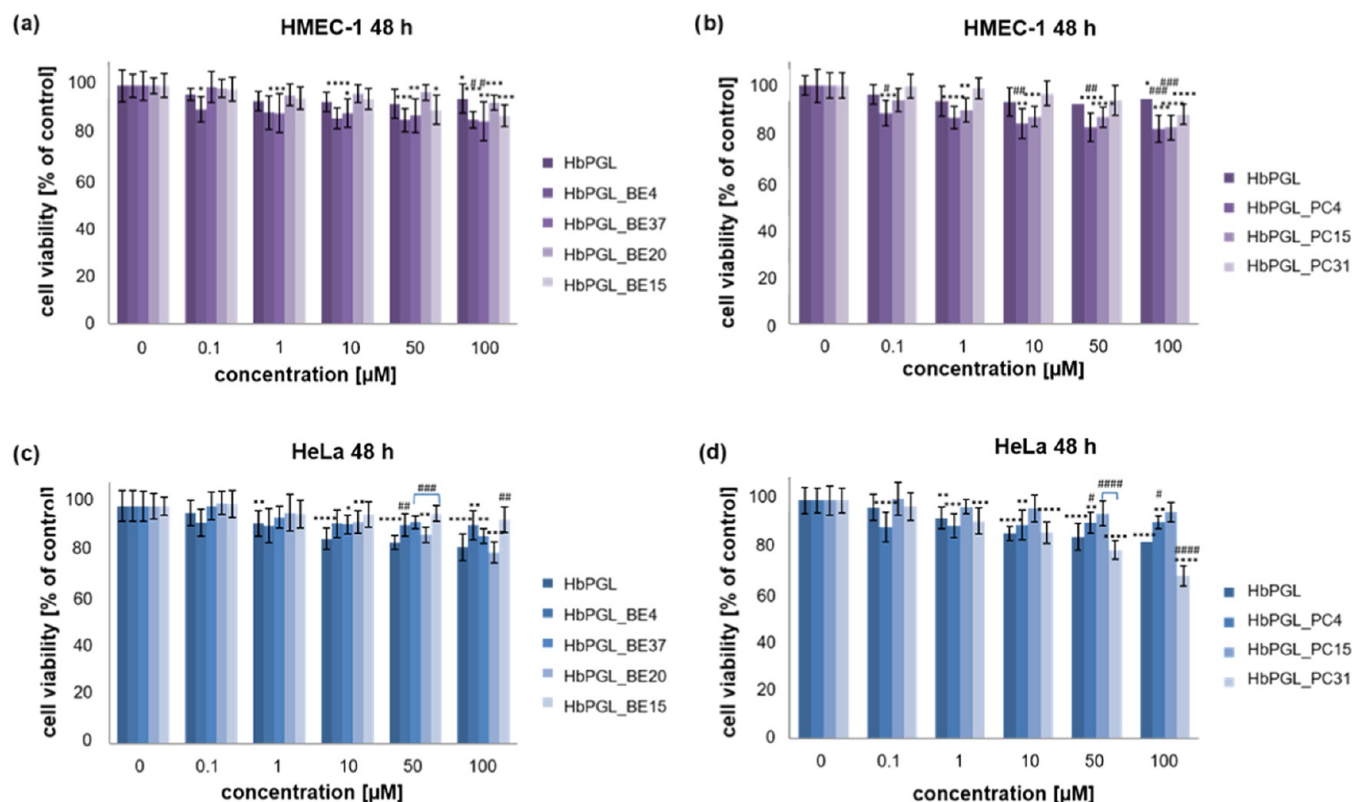
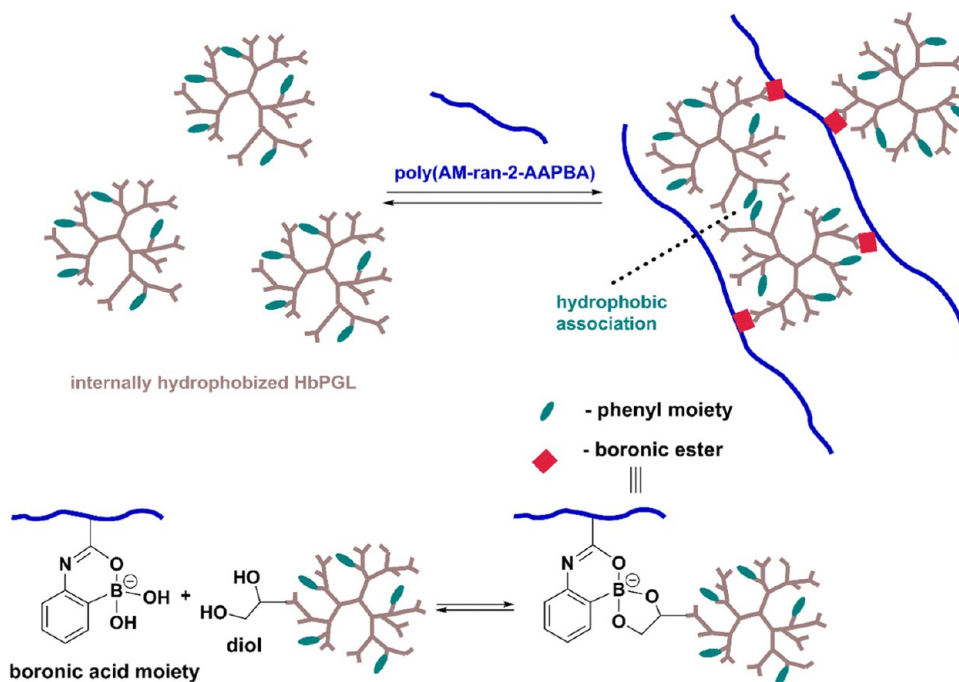


Figure 3. Influence of the molar concentration of the neat hyperbranched polyglycidol and its hydrophobized derivatives on the cell viability of HMEC-1 (a, b) and HeLa (c, d) after 48 h of incubation at 37 °C. Data are presented as a percentage of control (untreated cells) standard deviation (SD). The cytotoxicity values compared to the untreated control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$) as well as between unmodified hyperbranched polyglycidol and modified ones at the same compound concentration ($^{\#}p < 0.05$, $^{\# \#}p < 0.01$, $^{\# \# \#}p < 0.005$, $^{\# \# \# \#}p < 0.0001$).

Scheme 2. Illustration Depicting the Mechanisms of the Hydrogel Formation Based on the Internally Hydrophobized HbPGL and Poly(AM-ran-2-AAPBA)



frequency resulted in the inversion of G' and G'' at the crossover frequency (ω_c), which corresponds to the gelation point (gel–liquid transition) as an effect of the cross-link

dissociation. ω_c denotes the onset of macroscopic chain displacement, while at frequencies below ω_c (longer time scales), the material begins to flow ($G' < G''$) due to the

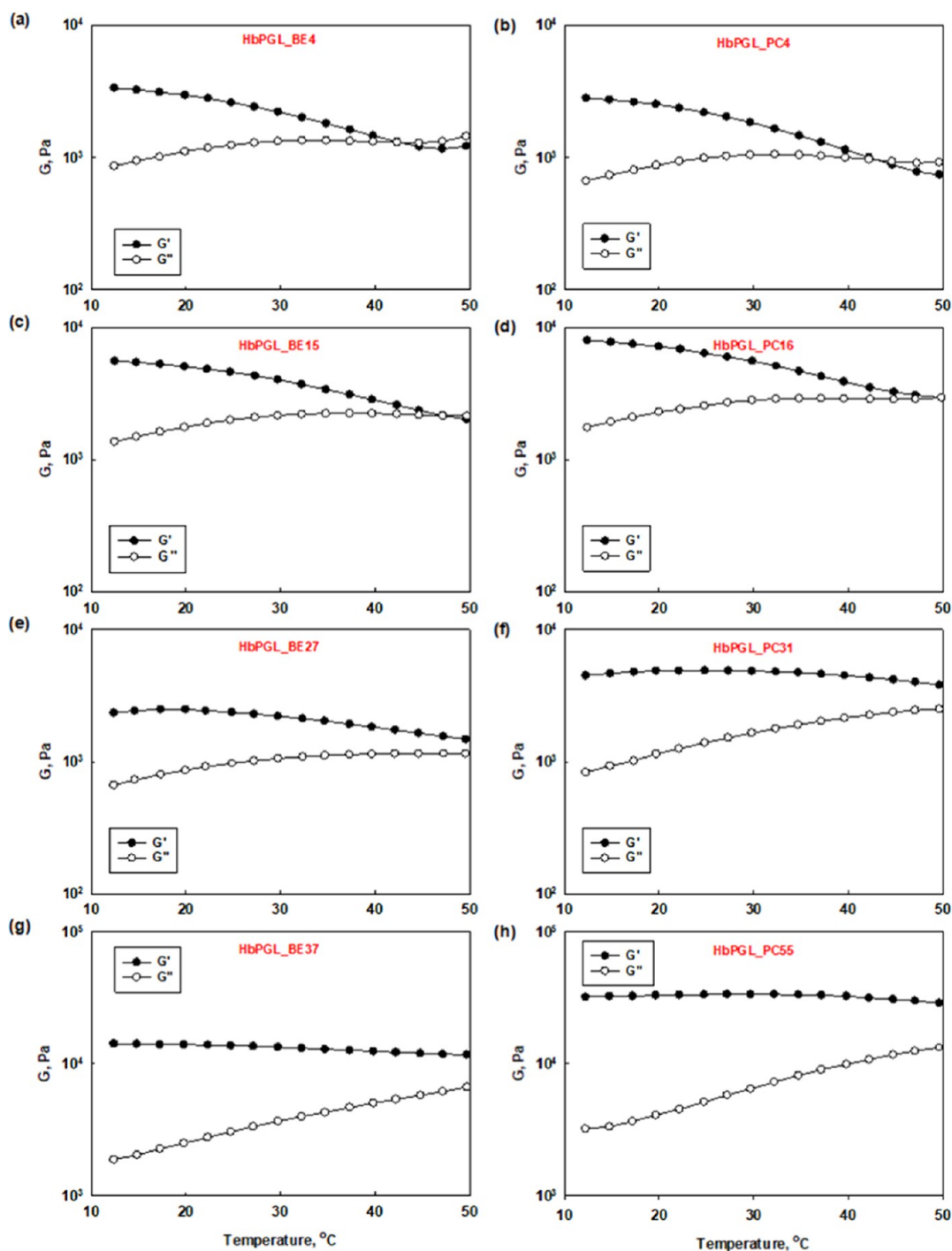


Figure 4. Dependence of G moduli on temperature for hydrogels constructed of hydrophobized HbPGL by the incorporation of phenyl moieties via ester or urethane bonds.

dominant contribution of liquid-like behavior. The crossover frequency, ω_c , for hydrogels constructed with hydrophobized HbPGL was lower at each investigated temperature in comparison to the hydrogel based on the neat HbPGL. For example, ω_c for neat HbPGL-based hydrogel at 10 °C was equal to 0.78 rad/s, whereas for hydrogels constructed of HbPGL_BE37 and HbPGL_PC55, it was reduced to 0.10 and 0.14 rad/s, respectively. At 40 °C, the crossover frequency for neat HbPGL-based hydrogel was 5.30 rad/s, whereas for HbPGL_BE37- and HbPGL_PC55-based networks, ω_c was significantly shifted to 0.85 and 0.55 rad/s, respectively. The

slope of ω_c dependence on temperature for the hydrogel constructed of neat HbPGL was 0.151 (Figure S73d), whereas the slope for this dependence for the hydrogels composed of HbPGL_BE37 and HbPGL_PC55 was 0.025 and 0.014 (Figure S77), respectively. The decrease of crossover frequency observed for hydrogels composed of hydrophobized HbPGL (Figures 5 and S73–S76) was directly related to the longer relaxation times of macromolecules engaged in the network formation according to the following relationship: $\omega_c = 1/2\pi\tau_R$, where τ_R is a relaxation time of macromolecules.³⁸ This behavior can be attributed to the presence of an

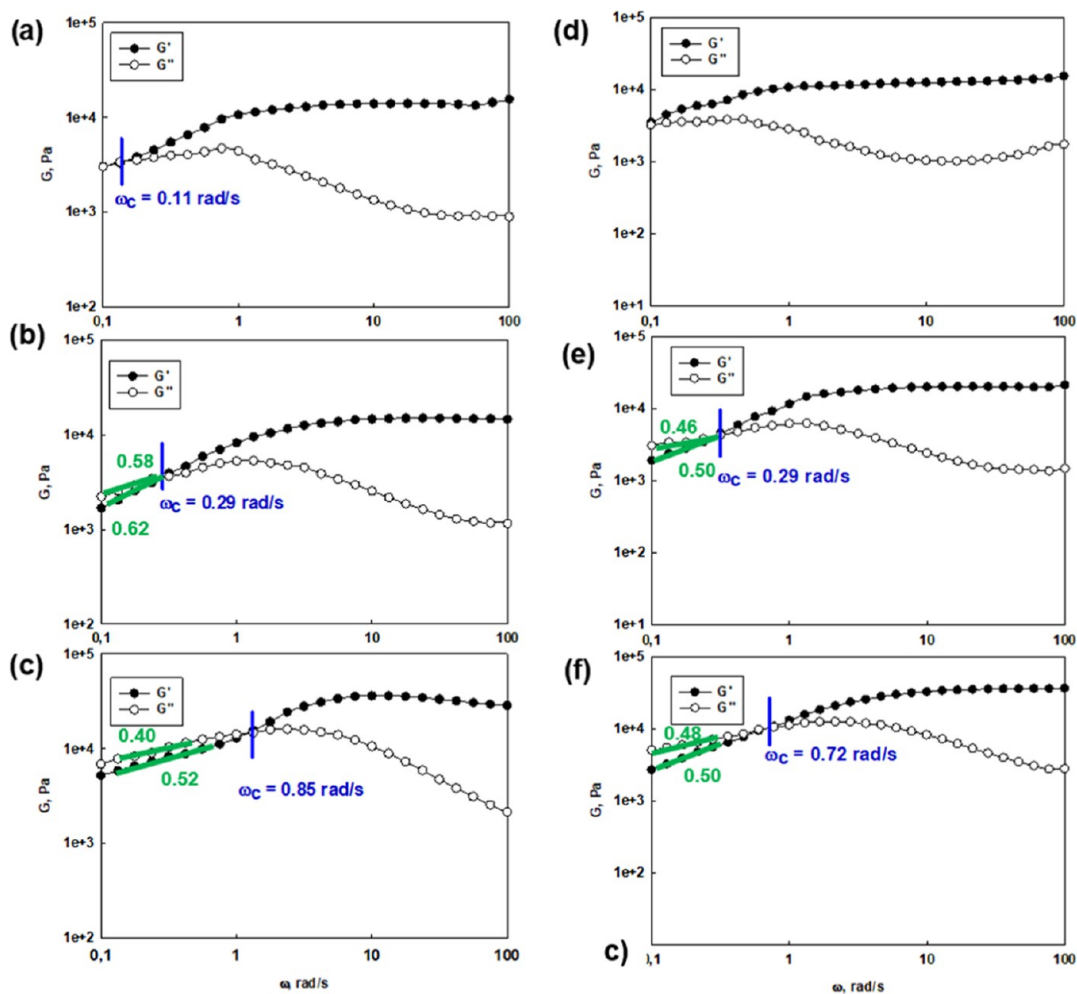


Figure 5. Frequency sweep tests performed for hydrogel constructed of poly(AM-*ran*-2-AAPBA) cross-linked with HbPGL_BE37 recorded at 10 °C (a), 25 °C (b), and 40 °C (c) and HbPGL_PC55 at 10 °C (d), 25 °C (e), and 40 °C (f).

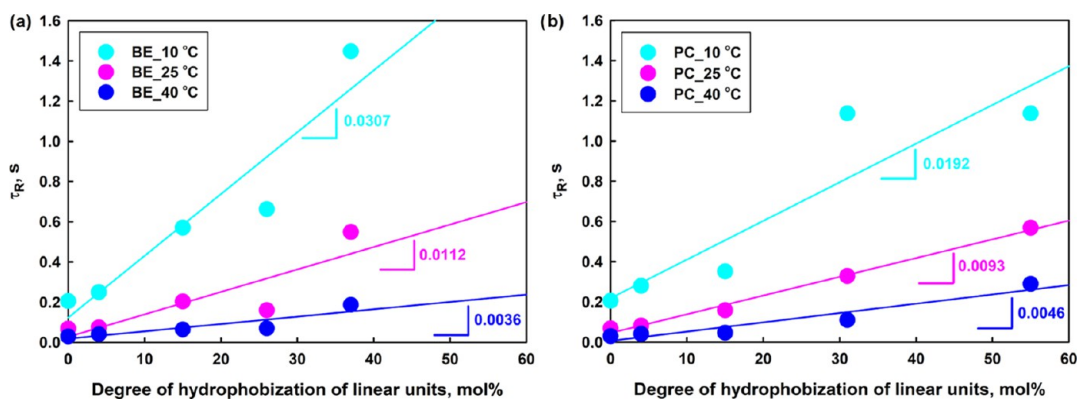


Figure 6. Dependence of the relaxation time of macromolecules in the networks, τ_R , on the degree of hydrophobization using ester (a) and urethane (b) linkages.

additional cross-linking mechanism, beside boronic esters, in the network. As comparable values of ω_c were obtained for hydrogels constructed of both urethane and ester derivatives at the same modification degree, we rejected a contribution of H-bonding of urethane bonds as a dominant effect in the network formation. Thus, we concluded that hydrophobic interactions generated by phenyl moieties are responsible for prolonging the relaxation time of macromolecules (Figure 6a,b), and besides boronic ester cross-links are engaged in the network

formation (Scheme 2). It is noteworthy that the slope of ω_c dependence vs temperature decreased with the increase of the degree of hydrophobization of HbPGL macromolecules applied for the gel construction (Figure S77). These data input, however, that cross-links based on hydrophobic associations are less sensitive to temperature, which is consistent with literature data.³¹

Activation energy, E_a , determined for all hydrogels based on the Arrhenius equation (Figure S78) revealed that higher

energy is needed to activate the relaxation processes of macromolecules in the networks composed of hydrophobized HbPGL than that constructed of neat HbPGL (Table 4).

Table 4. Activation Energy, E_a , Values of the Macromolecular Relaxation in the Network Determined for Hydrogels Constructed of Neat and Hydrophobized HbPGL

hydrogel sample	E_a (kJ/mol)
neat HbPGL	47.2
BE4	44.6
BE15	53.2
BE26	55.2
BE37	50.0
PC4	47.2
PC15	66.4
PC31	57.2
PC55	

The presence of an additional mechanism of cross-linking was also confirmed based on the increased value of the frequency-independent plateau of $G' = f(\omega)$, (G_N) in the higher frequency range above ω_c , i.e., in the region of shorter time scales. The increasing G_N modulus of hydrogels based on the hydrophobized HbPGL is ascribed to the increasing

number density of elastically effective network chains, N_{Exp} , describing the following dependence: $G_N = N_{\text{Exp}} kT$,³⁹ and thus the increase of the strength of the hydrogel. G_N was the lowest for the hydrogel composed of neat HbPGL and gradually increased with the increase of hydrophobization degree of HbPGL applied for the hydrogel formation (Figure S79). These data input that the enrichment of HbPGL with a low fraction of phenyl groups can lead to the formation of a single-sticker-type of intermolecular interactions thanks to the high probability of homogeneous distribution of hydrophobic rings within sphere-shaped HbPGL. The significant increase of G_N for hydrogels constructed of substantially hydrophobized HbPGL probably results from the formation of phenyl group clusters (aggregates).^{40,41} Moreover, along with the increase of the hydrophobization degree of HbPGL applied for the hydrogel formation, the hydrogels were more opaque, although initial polymer solutions applied for the hydrogel formation were transparent.

The formation of hydrophobic associations in water is an effect of the dehydration of parts of macromolecules, which is associated with a dominant entropic contribution to the self-assembly in the pure aqueous environment.^{42–45} The probability of hydrophobic interactions between individual macromolecules increases with the increase of the hydrophobization degree of HbPGL. The gradual increase of G_N of the hydrogels along with the hydrophobization degree of

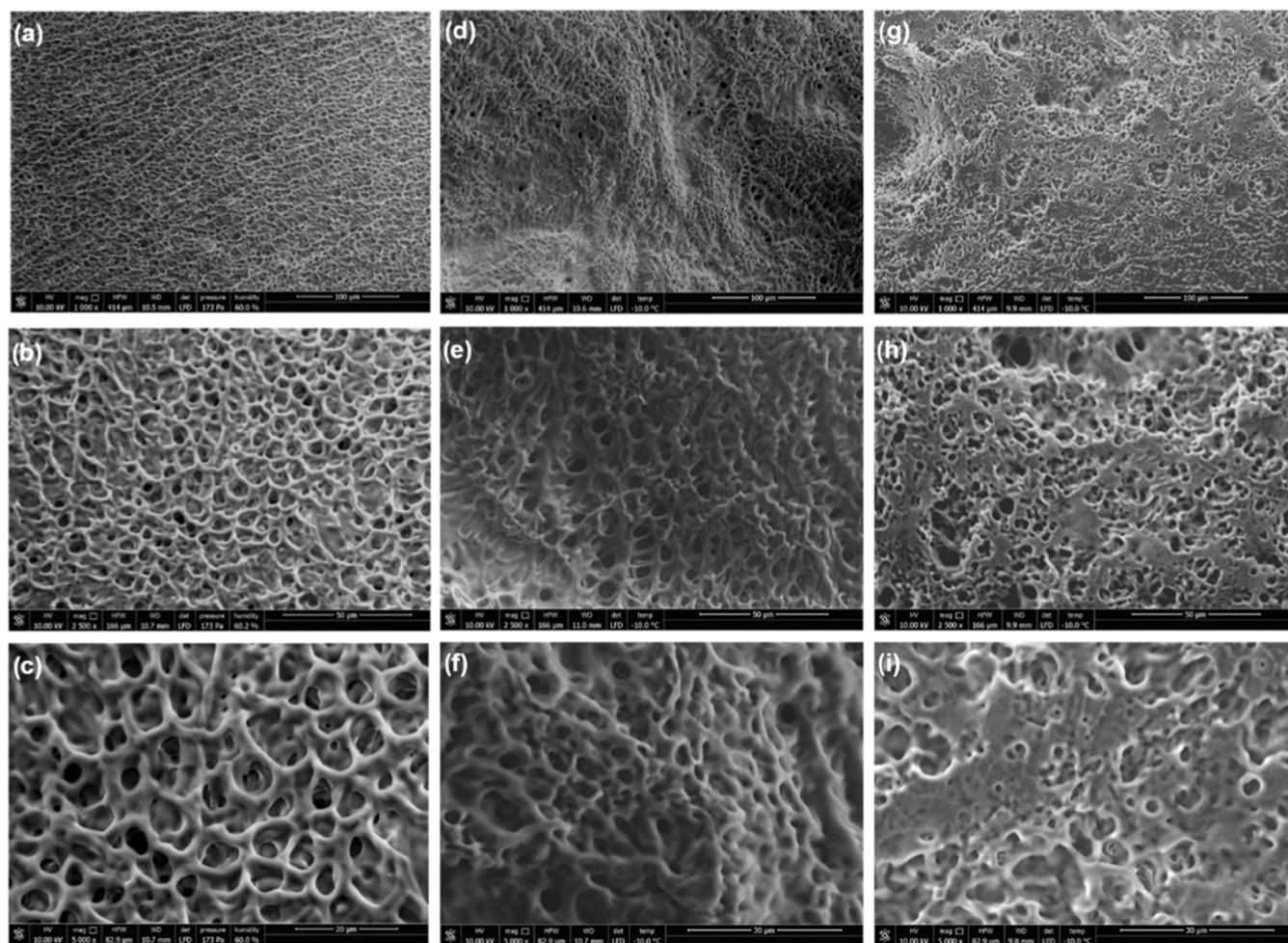


Figure 7. ESEM images of hydrogel systems constructed of neat HbPGL (a–c), HbPGL_BE26 (d–f), and HbPGL_PC55 (g–i).

applied HbPGL can be ascribed to the homogeneous distribution of phenyl units within the hyperbranched macromolecules, which consecutively are engaged in the network formation. Moreover, these data indicate that hydrophilic HbPGL corona swollen with water does not constitute efficient protection against intermolecular hydrophobic interactions in the polymer network.

The ESEM images recorded for hydrogels constructed of the neat HbPGL and hydrophobized HbPGL differing in the number of phenyl groups (Figure 7) revealed the significant changes in their morphology. In the case of neat HbPGL-based hydrogel, the structure of the network was homogeneous and highly porous. A slightly reduced porosity was observed for the network of the moderately hydrophobized HbPGL (HbPGL_BE26); however, the network porosity was still uniformly porous. On the contrary, in the morphology of the hydrogel constructed of HbPGL_PC55, the unporous patches were distinguished, which can be ascribed to the unhydrated areas of the material. The decreasing porosity of hydrogels along with the increasing molar fraction of hydrophobic units in applied HbPGLs results from the diminishing mesh size (ξ) of the network according to the relationship: $\xi = (N_{E_{exp}})^{-1/3}$.⁴⁶

The contribution of both cross-linking mechanisms, i.e., boronic esters and hydrophobic associations, should vary with temperature. It is well known that the equilibrium of reaction leading to boronic ester formation upon heating from 10 to 40 °C is shifted to the substrate direction, as the process of their formation is exothermic. Since G_N did not decrease upon heating (Figures 5 and S73–S76) and even increased at 40 °C, it can be concluded that the contribution of hydrophobic interactions increases along with temperature in the studied range.⁴⁷

It is noteworthy that frequency sweep experiments revealed that G' does not cross G'' in its maximum value, which was even more evident for hydrogels composed of HbPGL, where the core was highly enriched with hydrophobic units. Such behavior indicates that more than one mechanism of cross-linking is responsible for the network formation.¹⁵ In the case of hydrogel composed of neat HbPGL, this effect was observed, however, to a lower extent and can be ascribed to boronic ester cross-links and physical entanglements of high-molecular-weight macromolecules of acrylamide copolymer. For hydrogels built of hydrophobized HbPGLs, the formation of hydrophobic clusters contributed to the network formation, apart from these abovementioned cross-linking factors. In the case of HbPGL macromolecules cross-linked via boronate linkages using low-molecular boronic acids, the maximum of G'' was crossed by G' , which was ascribed to only one mechanism governing the network formation, as the used HbPGL was lack of physical entanglements.^{16,48}

Predominant values of G'' over G' in the region of low frequencies (longer time scales) below the crossover frequency indicate the onset of a structural change in the network, which can be ascribed to viscous flow. The difference between G' and G'' values for the hydrogels built of the hydrophobized HbPGL, however, was lower in comparison to the hydrogel composed of neat HbPGL and decreased upon the gradual enrichment of HbPGL with phenyl units (Figures 5 and S73–S76). $\tan \delta$ determined at 10 °C for hydrogels based on hydrophobized HbPGLs at the degree from 4 to 55 mol % ranged from 0.30 to 1.00, respectively, whereas for the neat-based HbPGL hydrogel, $\tan \delta$ was equal to 0.27. Moreover, in

the case of hydrophobized hydrogels, the slope of G' and $G''(\omega)$ in the region of low frequency, below ω_c , was flattened at each investigated temperature (Figures 5 and S73–S76). This behavior can be explained by the still present transient cross-links, which prolong the relaxation of macromolecules.^{49–51} Therefore, the deviation of the relaxation process from a single-exponential Maxwell model ($G' \sim \omega^2$ and $G'' \sim \omega^1$) for hydrophobized HbPGL-based hydrogels was observed. In the case of the hydrogel constructed of the neat HbPGL, the relaxation process that follows the Maxwell model was merely observed at 40 °C (Figure S73c), whereas at lower temperatures the slope of moduli was decreased (Figure S73a,b) as an effect of the increased stability of boronic ester cross-links at lower temperatures. In addition, the polydispersity of applied polymer components can cause multi-exponential decay that leads to the broadening of the relaxation time spectrum.⁴⁹ The incorporation of phenyl units into HbPGL, however, more evidently influenced the flow of the samples as the deviation from the Maxwell model was more significant along with the increase of the hydrophobization degree of HbPGL applied for the hydrogel formation (Figures 5 and S73–S76). In the case of the hydrogel composed of HbPGL_PC55, below ω_c , the values of both G' and G'' moduli were comparable, and the relaxation process significantly deviated from the Maxwell model. The detailed analysis of the behavior of moduli in the low-frequency region revealed that hydrogels constructed of the hydrophobized HbPGL do not flow as easily as the systems based on the neat HbPGL. The gradual reduction of the slope of G' and G'' in the low-frequency region along with the increase of the network hydrophobization can result from the formation of larger sticker aggregates of hydrophobic domains, referred to as clusters with a higher energy barrier for the dissociation of such complex sticker.⁵² As a result, the relaxation time spectrum was broadened, and thus the flow behavior, typical for the liquid-like behavior, is diminished.

Strain sweep tests carried out for the prepared hydrogels revealed that the degree of hydrophobization of used HbPGL significantly influences the stability of the network against the applied strain (Figures S80 and S81). At the low amplitude range, both storage and loss moduli exhibited a plateau, characteristic for the linear viscoelastic region, which was followed by a decrease of both moduli at amplitude characteristic for each hydrogel. Generally, the value of strain, at which the integrity of the network was disrupted, decreased with the increase of the hydrophobization degree of HbPGL applied for the hydrogel formation. It evidently indicates that phenyl rings incorporated into the HbPGL core influence the mechanical properties of the constructed hydrogels. After exceeding the strain value, at which the network is disrupted, the inversion of G' and G'' was observed, and G'' became larger than G' . The crossover of both moduli corresponds to a transition from a solid (hydrogel) to a liquid state and the material exhibits a viscous flow. In the case of the hydrogel systems built of HbPGL_BE37 or HbPGL_PC31, as low as 10% of strain was needed to trigger the gel to sol transition. In the case of hydrogels composed of HbPGL where less than 30 mol % of all monohydroxyl groups were hydrophobized via either ester or urethane bonds, the strain required for the disruption of the network was close to 100%. Hydrogels composed of neat HbPGL or low-hydrophobized macromolecules (HbPGL_BE4 or HbPGL_PC4) were disrupted at strain above 100%. These data evidently demonstrate that the

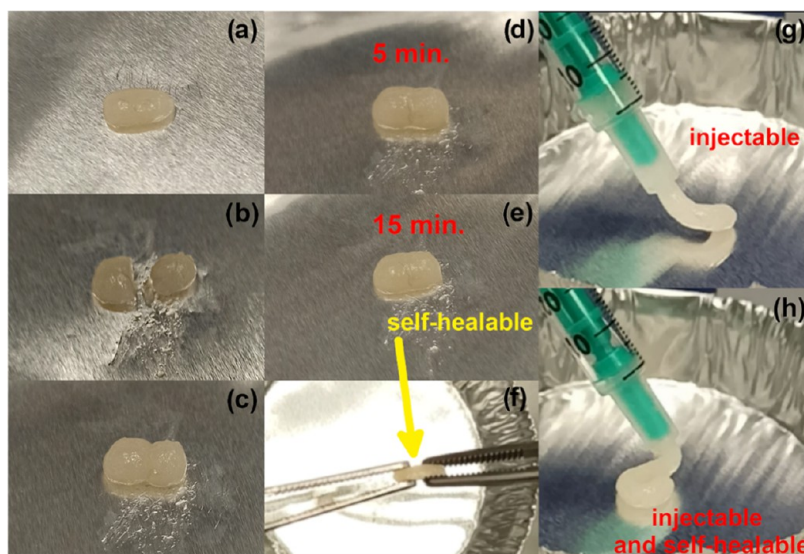


Figure 8. Illustration of the experiment demonstrating the self-healable behavior of HbPGL_BE26-based hydrogel. The hydrogel sample (a) was ruptured into two pieces (b) and placed in close contact (c). The sample was gradually repaired after 5 min (d) and 15 min (e), respectively, and then the sample was increased with a couple of tweezers (e), which revealed that the sample was self-healable under ambient conditions (f). The hydrogel was injected via a syringe (g). The hydrogel after extrusion from the syringe preserves its integrity (h). In addition, a video file presenting an experiment of the hydrogel injection via a needle was attached.

reorganization of hydrophobic cross-links generated between individual macromolecules is restricted. The significant contribution of hydrophobic interactions in the case of hydrogels built of highly hydrophobized HbPGLs shaded the effect of rapid and continuous reorganization of dynamic boronic ester cross-links.

In addition, although the concentration of applied polymer components in all investigated hydrogel systems was the same, for samples prepared from HbPGL_BE37, HbPGL_PC31, and HbPGLPC55 macromolecules, the phenomenon of water-repelling was observed with a naked eye. This behavior can be ascribed to the significant hydrophobization of the HbPGL core, which causes the increase in the probability of hydrophobic interactions between individual macromolecules. The formation of local hydrophobic domains is assisted by an entropy gain as a result of the subsequent release of unfavorably organized water molecules from the intramolecular spaces.^{42–45}

The participation of hydrophobic moieties in the network formation significantly influences the self-healing ability of the prepared hydrogels. The self-healing properties of the hydrogel are mainly determined by two factors. From one side, the recombination rate of the binding sites is crucial, whereas, from the other side, the sufficient chain dynamics of the individual macromolecules is indispensable to enable mobility of the interacting sites to ensure the cross-link reformation.³⁸ The reforming ability of boronic ester cross-links in the neat HbPGL-based network is assured not only by a sufficient rate of exchange between the product (boronic ester) and substrates, i.e., boronic acid and 1,2-diol (Scheme 2), but also by the high mobility of HbPGL macromolecules in the network, which assures that binding sites can meet once again.^{2,15} The relaxation time (τ_R) of macromolecules engaged in the network formation gradually decreased with the increase of the hydrophobization degree of the applied HbPGL. These data input that the highly hydrophobized HbPGL macromolecules are significantly constrained in the network, and in spite of the presence of dynamic boronic ester-based cross-

links, the self-healable properties of hydrogels are reduced. This behavior can be explained by the restricted ability of hydrophobic associations to reorganize. The increasing contribution of hydrophobic interactions diminishes the significance of the dynamic boron cross-links in the network, and thus self-healing properties are gradually reduced. For example, the hydrogel constructed of HbPGL_BE26 and HbPGL_PC31 still retained the self-healing properties (Figure 8); however, the time needed to vanish the fracture between two portions of the gel was slightly longer in comparison to the behavior of the hydrogel based on the neat HbPGL (Figure S82). The hydrogels constructed on HbPGLs with the highly hydrophobized interior, i.e., HbPGL_BE37 and HbPGL_PC55, did not display self-healable properties. The exemplary self-healing test performed for the hydrogel based on HbPGL_PC55 (Figure S83) revealed that two hydrogel pieces placed at a close distance were not able to reform one piece of the hydrogel despite a long time.

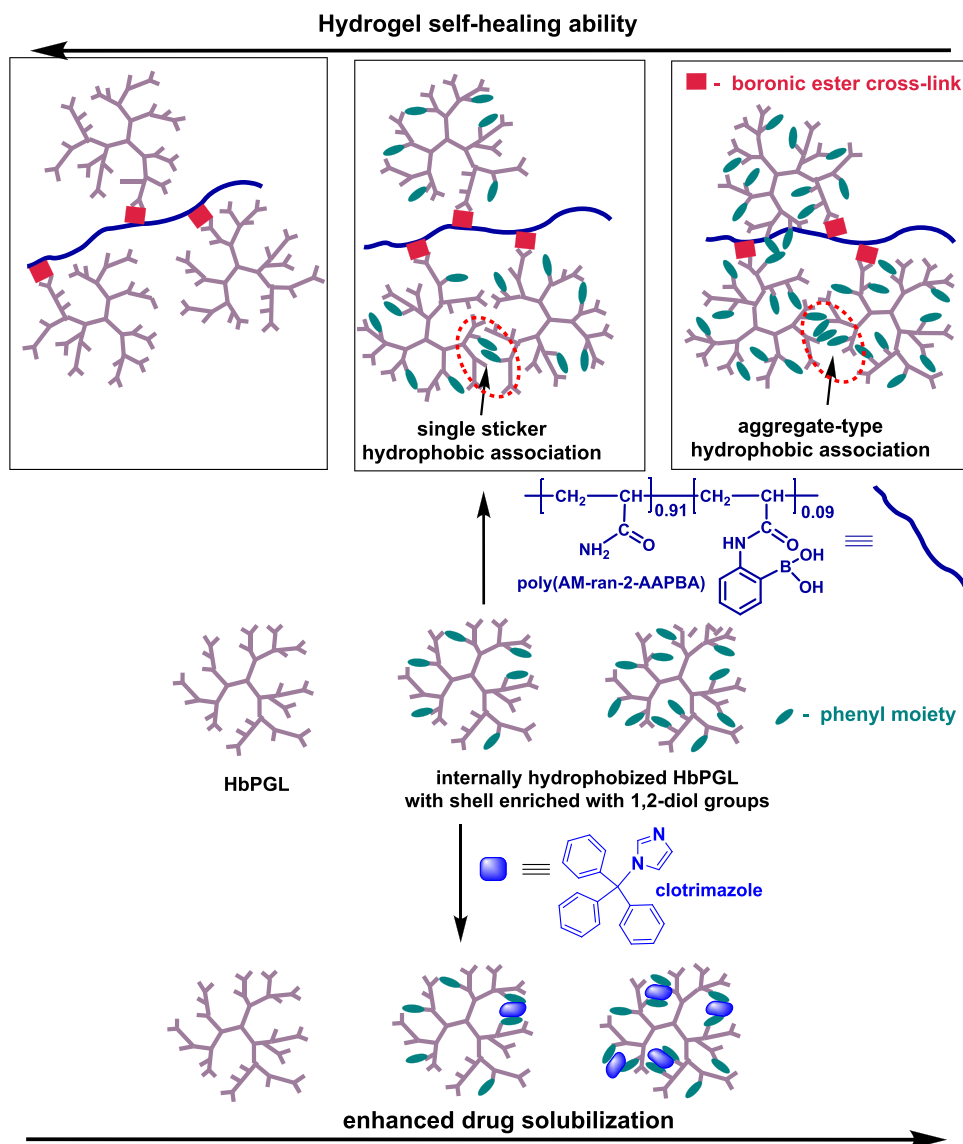
The self-healing properties of hydrogels are important in biomedical applications, for example, in topical therapies. Both the reduced self-healing ability and the flow behavior of the hydrogel result in the limited ability of the formation of continuous coverage with the hydrogel-based drug carrier on the afflicted area, which can influence their potential in biomedical applications. The formation of a uniform layer is of great importance to assure effective tissue coverage to attain controlled drug delivery.

The scope of the article is summarized in Scheme 3.

CONCLUSIONS

We have successfully demonstrated the construction of injectable hydrogels composed of unimolecular micelles based on hyperbranched polymers cross-linked via dynamic boronic ester linkages, suitable for the intravaginal therapies of vulvovaginitis. For hyperbranched polyglycidol with phenyl-enriched core, we achieved the improved solubilization of clotrimazole, a water-insoluble drug where the structure consists of four nonconjugated aromatic rings. The drug

Scheme 3. Illustration Showing the Influence of the HbPGL Hydrophobization with Phenyl Moieties on the Solubilization Ability of Clotrimazole and the Rheological Properties of Hydrogel Platforms



solubilization within the HbPGL-based unimolecular micelles increased gradually along with the degree of hydrophobization of the core.

Our study revealed a significant influence of HbPGL core hydrophobization with phenyl rings incorporated *via* ester or urethane linkages on the rheological properties of hydrogels constructed of core-modified HbPGL cross-linked with poly(acrylamide-*ran*-2-acrylamidephenylboronic acid). The thermal stability of hydrogels composed of hydrophobized HbPGL was higher, i.e., even above 50 °C in comparison to the neat HbPGL-based system (39.8 °C). These data input that hydrogel platforms will be stable at the temperature conditions of the vagina, and thus the degradation of the network can be triggered with glucose molecules present in the vaginal fluid. Furthermore, the elastic strength of the networks, determined based on G_N values, increased with the gradual enrichment of HbPGL core with phenyl moieties. At 40 °C, G_N was over 20 times higher for hydrogel constructed of HbPGL, where the monohydroxyl groups were hydrophobized at 55 mol % in comparison to neat HbPGL-based hydrogel.

Moreover, the activation energy of the relaxation of hydrophobized macromolecules in the dynamic network was higher in comparison to that determined for the system composed of neat HbPGL macromolecules. These changes in the rheological properties of hydrogel systems can be ascribed to the intermolecular hydrophobic associations between phenyl groups, which besides boronic esters played the role of the additional cross-links in the network. The increasing contribution of hydrophobic interactions in the network resulted in the gradual reduction of the flow behavior and self-healing ability of the network as an effect of the change of the cross-linking mechanism based on the hydrophobic interactions from a single-sticker to aggregate-type model. These results input that to obtain the hydrogel of the efficient drug loading and beneficial rheological behavior such as injectability and self-healing properties, the HbPGL of a proper degree of hydrophobization has to be applied.

In the face of numerous side effects of orally administered drugs, especially in the case of women suffering from gastrointestinal tract disorders, there is a necessity to develop

formulations of hydrophobic drugs for gynecology. Unimolecular micelle-based hydrogel platforms presented here can be used as carriers of various aromatic-equipped drugs in the treatment of infections evoked by other microorganisms (bacteria, protozoan, i.e., *Trichomonas vaginalis*) or in anticancer therapies. Each system, however, requires optimization such as the choice of proper groups adjusted to the chemical nature of an encapsulated drug, the degree of hydrophobization along with the rheological properties of a hydrogel platform to attain the therapeutic effect.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biomac.2c00691>.

Administration of hydrogel systems with a syringe (Video S1) (MP4)

Administration of hydrogel systems with a syringe (Video S2) (MP4)

Administration of hydrogel systems with a syringe (Video S3) (MP4)

^1H , ^{13}C , and ^1H DOSY NMR spectra of hydrophobized HbPGLs, GPC spectrum of acrylamide-2-acrylamide-phenylboronic acid copolymer, cytotoxicity tests on HMEC and HeLa lines after 24 h, and rheology characteristics of hydrogels (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Monika Gosecka – Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, 90-363 Lodz, Poland; orcid.org/0000-0002-4358-0987; Email: mdybko@cbmm.lodz.pl

Authors

Daria Jaworska-Krych – Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, 90-363 Lodz, Poland

Mateusz Gosecki – Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, 90-363 Lodz, Poland; orcid.org/0000-0002-4901-4687

Ewelina Wielgus – Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, 90-363 Lodz, Poland

Monika Marcinkowska – Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 90-236 Lodz, Poland

Anna Janaszewska – Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 90-236 Lodz, Poland

Barbara Klajnert-Maculewicz – Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 90-236 Lodz, Poland; orcid.org/0000-0003-3459-8947

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biomac.2c00691>

Funding

This work was supported by the National Science Centre, Poland (Project Number: UMO-2018/30/E/ST5/00576).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This article has been completed while Daria Jaworska-Krych (orcid.org/0000-0003-4864-9928) was the Doctoral Candidate in the Interdisciplinary Doctoral School at the Lodz University of Technology, Poland.

■ REFERENCES

- (1) Gosecka, M.; Gosecki, M. Antimicrobial Polymer-Based Hydrogels for the Intravaginal Therapies-Engineering Considerations. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, No. 1393.
- (2) Gosecka, M.; Gosecki, M.; Urbaniak, M. Composite Dynamic Hydrogels Constructed on Boronic Ester Cross-Links with NIR-Enhanced Diffusivity. *Biomacromolecules* **2022**, *23*, 948–959.
- (3) Ziemczonek, P.; Gosecka, M.; Gosecki, M.; Marcinkowska, M.; Janaszewska, A.; Klajnert-Maculewicz, B. Star-Shaped Poly(furfuryl glycidyl ether)-Block-Poly(glycerol glycerol ether) as an Efficient Agent for the Enhancement of Nifuratel Solubility and for the Formation of Injectable and Self-Healable Hydrogel Platforms for the Gynaecological Therapies. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, No. 8386.
- (4) Narayanaswamy, R.; Torchilin, V. P. Hydrogels and Their Applications in Targeted Drug Delivery. *Molecules* **2019**, *24*, No. 603.
- (5) McKenzie, M.; Betts, D.; Suh, A.; Bui, K.; Kim, L. D.; Cho, H. Hydrogel-Based Drug Delivery Systems for Poorly Water-Soluble Drugs. *Molecules* **2015**, *20*, 20397–20408.
- (6) Sosa, L.; Calpena, A. C.; Silva-Abreu, M.; Espinoza, L. C.; Rincon, M.; Bozal, N.; Domenech, O.; Rodriguez-Lagunas, M. J.; Clares, B. Thermoreversible Gel-Loaded Amphotericin B for the Treatment of Dermal and Vaginal Candidiasis. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, No. 312.
- (7) Rossi, S.; Ferrari, F.; Bonferoni, M. C.; Sandri, G.; Faccendini, A.; Puccio, A.; Caramella, C. Comparison of poloxamer- and chitosan-based thermally sensitive gels for the treatment of vaginal mucositis. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2014**, *40*, 352–360.
- (8) Cabana, A.; AitKadi, A.; Juhasz, J. Study of the gelation process of polyethylene oxide(a) polypropylene oxide(b) polyethylene oxide(a) copolymer (Poloxamer 407) aqueous solutions. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *190*, 307–312.
- (9) Hussein, Y. H. A.; Youssry, M. Polymeric Micelles of Biodegradable Diblock Copolymers: Enhanced Encapsulation of Hydrophobic Drugs. *Materials* **2018**, *11*, No. 688.
- (10) Jones, M. C.; Ranger, M.; Leroux, J. C. pH-sensitive unimolecular polymeric micelles: Synthesis of a novel drug carrier. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 774–781.
- (11) Ambade, A. V.; Savariar, E. N.; Thayumanavan, S. Dendritic micelles for controlled drug release and targeted delivery. *Mol. Pharmaceutics* **2005**, *2*, 264–272.
- (12) Gupta, U.; Agashe, H. B.; Asthana, A.; Jain, N. K. Dendrimers: Novel polymeric nanoarchitectures for solubility enhancement. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 649–658.
- (13) Jose, J.; Charyulu, R. N. PAMAM Dendrimers: novel polymeric nanoarchitectures for solubility enhancement of Ketoconazole. *Optoelectron. Adv. Mater., Rapid Commun.* **2016**, *10*, 604–608.
- (14) Jin, X.; Sun, P.; Tong, G. S.; Zhu, X. Y. Star polymer-based unimolecular micelles and their application in bio-imaging and diagnosis. *Biomaterials* **2018**, *178*, 738–750.
- (15) Gosecki, M.; Kazmierski, S.; Gosecka, M. Diffusion-Controlled Biomaterialization Conducted In Situ in Hydrogels Based on Reversibly Cross-Linked Hyperbranched Polyglycidol. *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 3418–3431.
- (16) Gosecki, M.; Zgardzinska, B.; Gosecka, M. Temperature-Induced Changes in the Nanostructure of Hydrogels Based on Reversibly Cross-Linked Hyperbranched Polyglycidol with B(OH)(4)(circle minus) Ions. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 18323–18332.
- (17) Jafari, M.; Abolmaali, S. S.; Najafi, H.; Tamaddon, A. M. Hyperbranched polyglycerol nanostructures for anti-biofouling, multi-functional drug delivery, bioimaging and theranostic applications. *Int. J. Pharm.* **2020**, *576*, No. 118959.

- (18) Ying, H.; He, G. J.; Zhang, L. F.; Lei, Q. F.; Guo, Y. S.; Fang, W. J. Hyperbranched polyglycerol/poly(acrylic acid) hydrogel for the efficient removal of methyl violet from aqueous solutions. *J. Appl. Polym. Sci.* **2016**, *133*, No. 42951.
- (19) Wu, C. Z.; Strehmel, C.; Achazi, K.; Chiapisi, L.; Dervede, J.; Lensen, M. C.; Gradziński, M.; Ansorge-Schumacher, M. B.; Haag, R. Enzymatically Cross-Linked Hyperbranched Polyglycerol Hydrogels as Scaffolds for Living Cells. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 3881–3890.
- (20) Postnova, I.; Silant'ev, V.; Kim, M. H.; Song, G. Y.; Kim, I.; Ha, C. S.; Shchipunov, Y. Hyperbranched polyglycerol hydrogels prepared through biomimetic mineralization. *Colloid Surf., B* **2013**, *103*, 31–37.
- (21) Haryanto; Singh, D.; Huh, P. H.; Kim, S. C. Hyperbranched poly(glycidol)/poly(ethylene oxide) crosslinked hydrogel for tissue engineering scaffold using e-beams. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2016**, *104*, 48–56.
- (22) Schömer, M.; Schull, C.; Frey, H. Hyperbranched aliphatic polyether polyols. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Phys.* **2013**, *51*, 995–1019.
- (23) Kurniasih, I. N.; Keilitz, J.; Haag, R. Dendritic nanocarriers based on hyperbranched polymers. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4145–4164.
- (24) Wilms, D.; Stiriba, S. E.; Frey, H. Hyperbranched Polyglycerols: From the Controlled Synthesis of Biocompatible Polyether Polyols to Multipurpose Applications. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 129–141.
- (25) Sunder, A.; Hanselmann, R.; Frey, H.; Mulhaupt, R. Controlled synthesis of hyperbranched polyglycerols by ring-opening multi-branching polymerization. *Macromolecules* **1999**, *32*, 4240–4246.
- (26) Türk, H.; Shukla, A.; Rodrigues, P. C. A.; Rehage, H.; Haag, R. Water-soluble dendritic core-shell-type architectures based on polyglycerol for solubilization of hydrophobic drugs. *Chem. - Eur. J.* **2007**, *13*, 4187–4196.
- (27) Kurniasih, I. N.; Liang, H.; Rabe, J. P.; Haag, R. Supramolecular Aggregates of Water Soluble Dendritic Polyglycerol Architectures for the Solubilization of Hydrophobic Compounds. *Macromol. Rapid Commun.* **2010**, *31*, 1516–1520.
- (28) Kurniasih, I. N.; Liang, H.; Moschwitz, V. D.; Quadir, M. A.; Radowski, M.; Rabe, J. P.; Haag, R. Synthesis and transport properties of new dendritic core-shell architectures based on hyperbranched polyglycerol with biphenyl-PEG shells. *New J. Chem.* **2012**, *36*, 371–379.
- (29) Kurniasih, I. N.; Liang, H.; Kumar, S.; Mohr, A.; Sharma, S. K.; Rabe, J. P.; Haag, R. A bifunctional nanocarrier based on amphiphilic hyperbranched polyglycerol derivatives. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 3569–3577.
- (30) Miquelard-Garnier, G.; Demoures, S.; Creton, C.; Hourdet, D. Synthesis and rheological behavior of new hydrophobically modified hydrogels with tunable properties. *Macromolecules* **2006**, *39*, 8128–8139.
- (31) Abdurrahmanoglu, S.; Can, V.; Okay, O. Design of high-toughness polyacrylamide hydrogels by hydrophobic modification. *Polymer* **2009**, *50*, 5449–5455.
- (32) Mihajlovic, M.; Staropoli, M.; Appavou, M. S.; Wyss, H. M.; Pyckhout-Hintzen, W.; Sijbesma, R. P. Tough Supramolecular Hydrogel Based on Strong Hydrophobic Interactions in a Multiblock Segmented Copolymer. *Macromolecules* **2017**, *50*, 3333–3346.
- (33) Deng, C. C.; Brooks, W. L. A.; Abboud, K. A.; Sumerlin, B. S. Boronic Acid-Based Hydrogels Undergo Self-Healing at Neutral and Acidic pH. *ACS Macro Lett.* **2015**, *4*, 220–224.
- (34) Gosecki, M.; Urbaniak, M.; Gosecka, M. Glycoluril Clips for the Construction of Chemoresponsive Supramolecular Polymer Networks through Homodimer Cross-Links. *ChemPlusChem* **2019**, *84*, 981–988.
- (35) Gosecki, M.; Urbaniak, M.; Gostynski, B.; Gosecka, M. Influence of Glycoluril Molecular Clip Isomerization on the Mechanisms of Resorcinol Molecule Complexation. *J. Phys. Chem. C* **2020**, *124*, 8401–8410.
- (36) Saadatfar, F.; Shayanfar, A.; Rahimpour, E.; Barzegar-Jalali, M.; Martinez, F.; Bolourtchian, M.; Jouyban, A. Measurement and correlation of clotrimazole solubility in ethanol plus water mixtures at T = (293.2 to 313.2) K. *J. Mol. Liq.* **2018**, *256*, 527–532.
- (37) Robb, I. D.; Smeulders, J. B. A. F. The rheological properties of weak gels of poly(vinyl alcohol) and sodium borate. *Polymer* **1997**, *38*, 2165–2169.
- (38) Herbst, F.; Dohler, D.; Michael, P.; Binder, W. H. Self-Healing Polymers via Supramolecular Forces. *Macromol. Rapid Commun.* **2013**, *34*, 203–220.
- (39) Green, M. S.; Tobolsky, A. V. A New Approach to the Theory of Relaxing Polymeric Media. *J. Chem. Phys.* **1946**, *14*, 80–92.
- (40) Tian, J.; Seery, T. A. P.; Ho, D. L.; Weiss, R. A. Physically cross-linked alkylacrylamide hydrogels: A SANS analysis of the microstructure. *Macromolecules* **2004**, *37*, 10001–10008.
- (41) Hao, J. K.; Weiss, R. A. Viscoelastic and Mechanical Behavior of Hydrophobically Modified Hydrogels. *Macromolecules* **2011**, *44*, 9390–9398.
- (42) Young, T.; Abel, R.; Kim, B.; Berne, B. J.; Friesner, R. A. Motifs for molecular recognition exploiting hydrophobic enclosure in protein-ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 808–813.
- (43) Vaitheeswaran, S.; Yin, H.; Rasaiah, J. C.; Hummer, G. Water clusters in nonpolar cavities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 17002–17005.
- (44) Rasaiah, J. C.; Garde, S.; Hummer, G. Water in nonpolar confinement: From nanotubes to proteins and beyond. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2008**, *59*, 713–740.
- (45) Syamala, P. P. N.; Soberats, B.; Gori, D.; Gekle, S.; Wurthner, F. Thermodynamic insights into the entropically driven self-assembly of amphiphilic dyes in water. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 9358–9366.
- (46) Tsuji, Y.; Li, X.; Shibayama, M. Evaluation of Mesh Size in Model Polymer Networks Consisting of Tetra-Arm and Linear Poly(ethylene glycol)s. *Gels* **2018**, *4*, No. 50.
- (47) Murali, D. M.; Shanmugam, G. The aromaticity of the phenyl ring imparts thermal stability to a supramolecular hydrogel obtained from low molecular mass compound. *New J. Chem.* **2019**, *43*, 12396–12409.
- (48) Gosecka, M.; Gosecki, M.; Kazmierski, S. DOSY NMR as a tool for predicting optimal conditions for hydrogel formation: The case of a hyperbranched polyglycidol cross-linked with boronic acids. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **2016**, *54*, 2171–2178.
- (49) Hackelbusch, S.; Rossow, T.; van Assenbergh, P.; Seiffert, S. Chain Dynamics in Supramolecular Polymer Networks. *Macromolecules* **2013**, *46*, 6273–6286.
- (50) Xu, D. H.; Hawk, L. L.; Loveless, D. M.; Jeon, S. L.; Craig, S. L. Mechanism of Shear Thickening in Reversibly Cross-Linked Supramolecular Polymer Networks. *Macromolecules* **2010**, *43*, 3556–3565.
- (51) Feldman, K. E.; Kade, M. J.; Meijer, E. W.; Hawker, C. J.; Kramer, E. J. Model Transient Networks from Strongly Hydrogen-Bonded Polymers. *Macromolecules* **2009**, *42*, 9072–9081.
- (52) Breul, K.; Kissel, S.; Seiffert, S. Sticker Multivalency in Metallo-supramolecular Polymer Networks. *Macromolecules* **2021**, *54*, 8407–8422.

Self-healable, injectable hydrogel with enhanced clotrimazole solubilization as a potential therapeutic platform for gynecology

Monika Gosecka*[‡], Daria Jaworska-Krych[‡], Mateusz Gosecki[‡], Ewelina Wielgus[‡], Monika Marcinkowska[‡], Anna Janaszewska[‡], Barbara Klajnert-Maculewicz[‡]

[‡]Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences

Sienkiewicza 112, 90-363 Lodz, Poland

[‡]Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 141/143 Pomorska Street, 90-236 Lodz, Poland

* Correspondence: mdybko@cbmm.lodz.pl

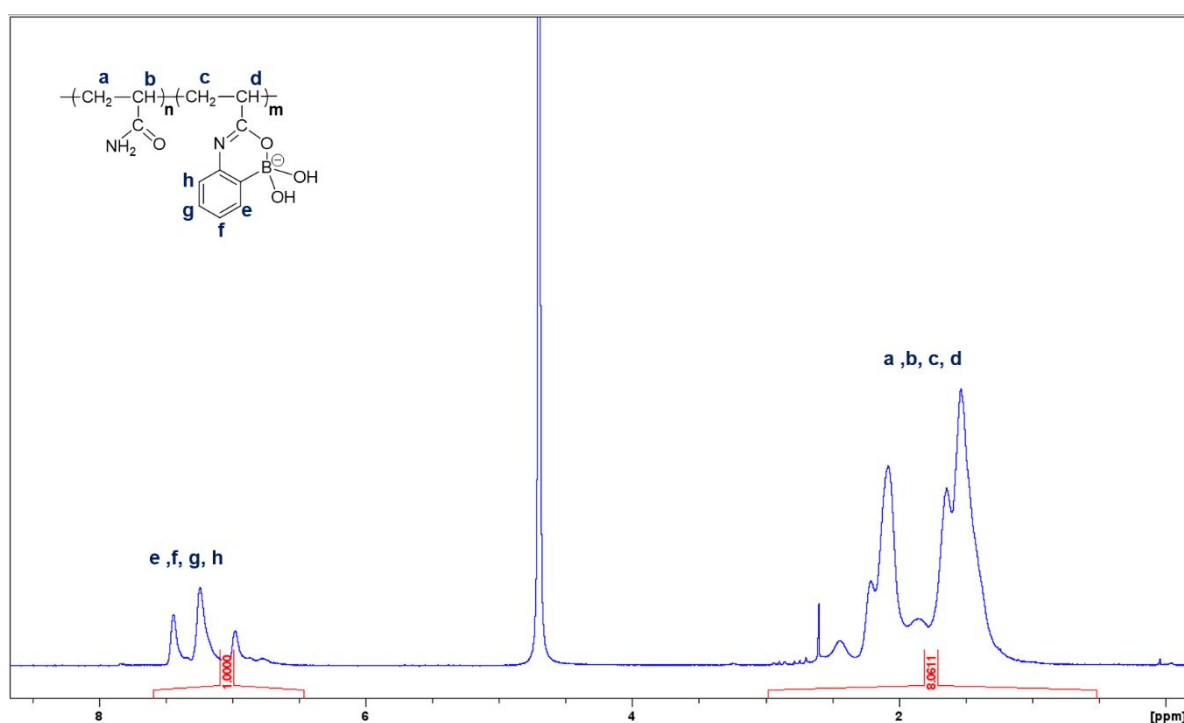


Figure S1. ¹H NMR spectrum of poly(AM-ran-2-AAPBA), M_n=43000 recorded in D₂O.

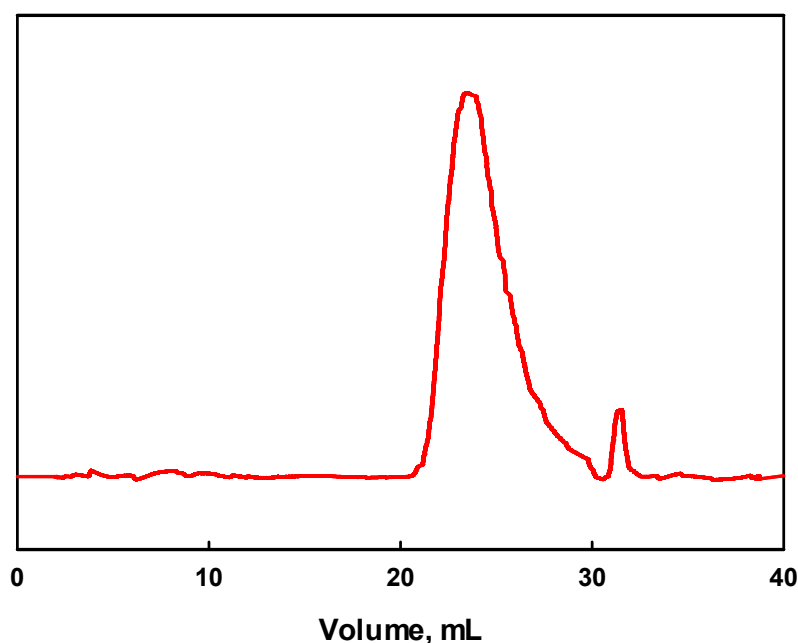


Figure S2. GPC chromatogram of poly(AM-*ran*-2-AAPBA) performed in an aqueous solution of NaN₃ (0.1 wt %) at a flow rate of 1.0 mL min using a chromatograph (Knauer K-501 HPLC pump) equipped with a degasser (4-Channel Degasser; K-5004, Knauer), three TSK-GEL columns: G5000 PW XL 1 3000 PW XL 1 2500 PW XL (7.8 3 300 mm; Tosho; 26 8C), an LDC RI detector.

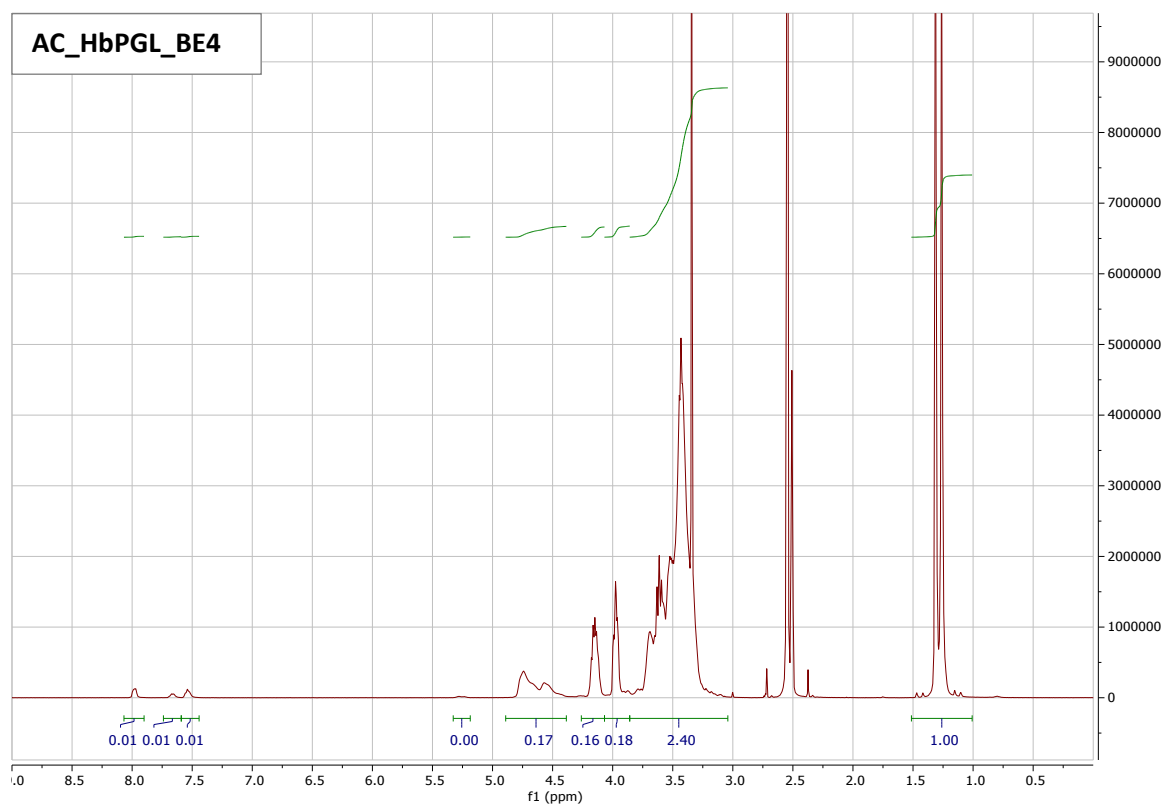


Figure S3. ¹H NMR spectrum of AC_HbPGL_BE4 recorded in DMSO-d₆.

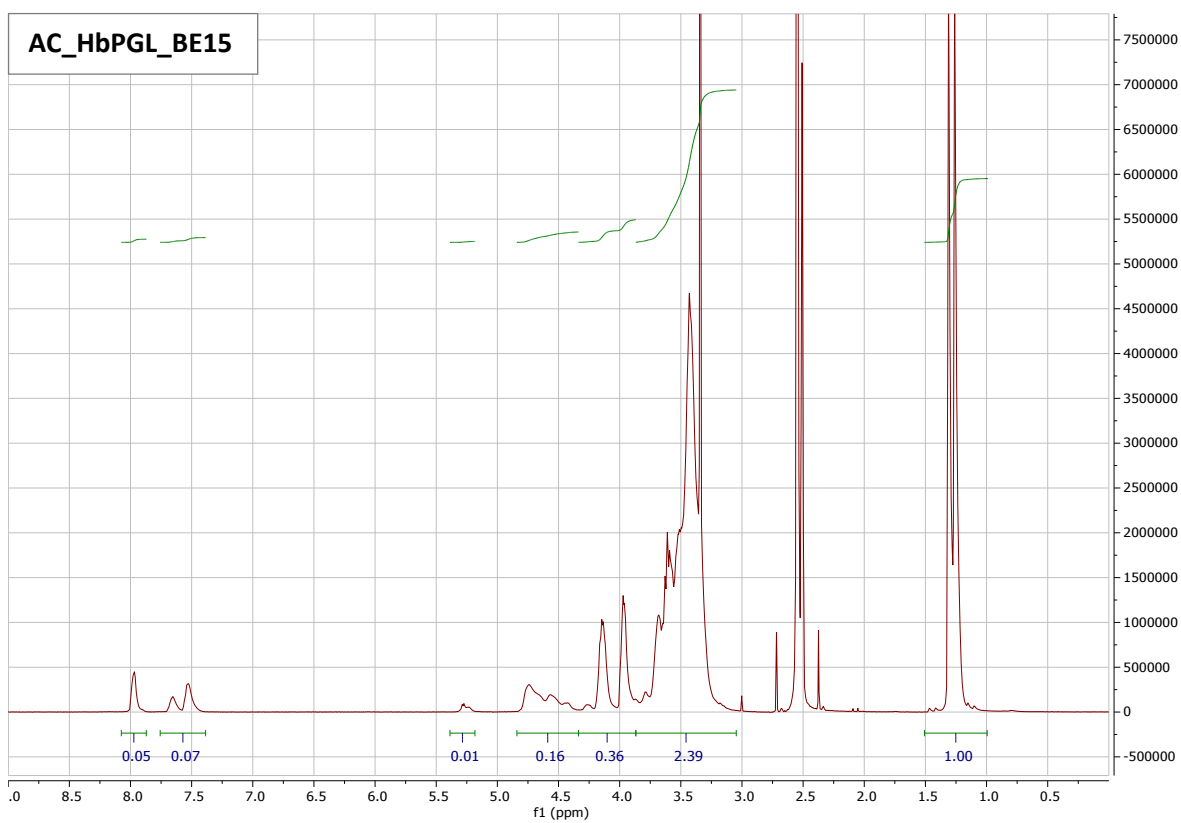


Figure S4. ^1H NMR spectrum of AC_HbPGL_BE15 recorded in DMSO- d_6 .

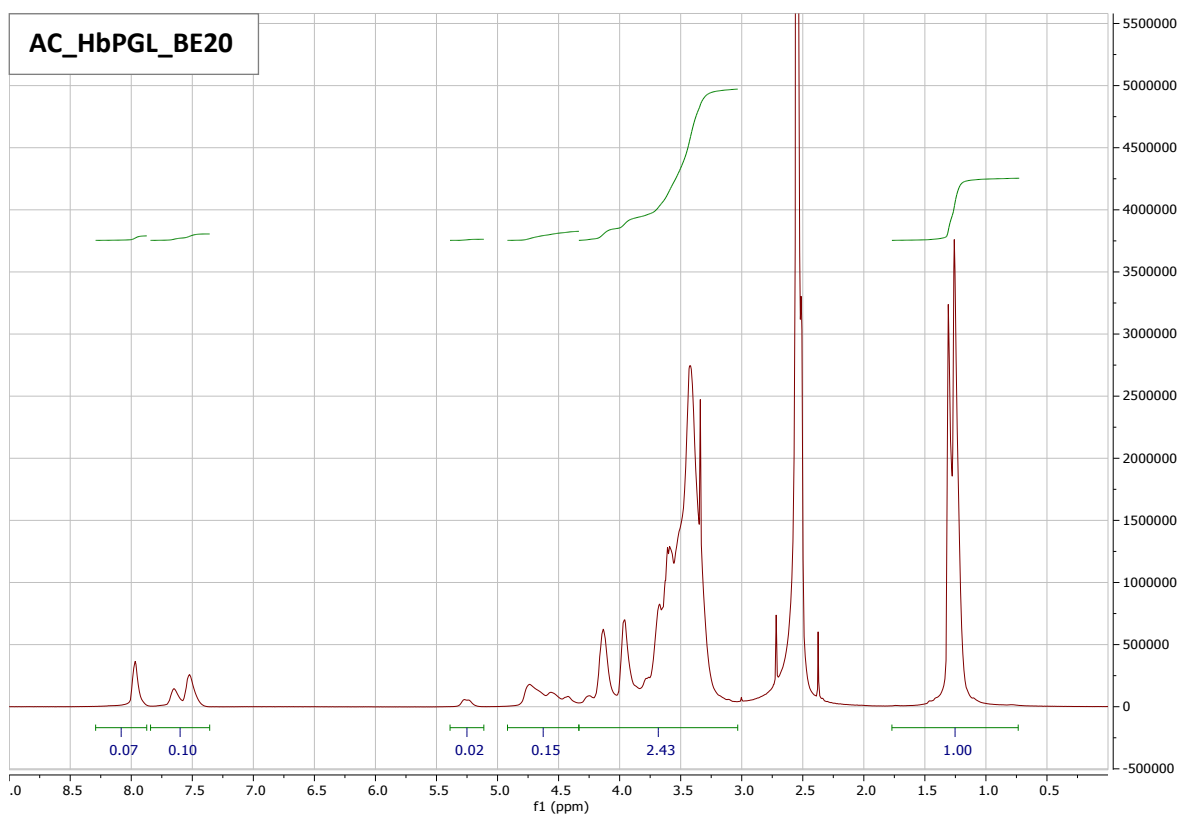


Figure S5. ^1H NMR spectrum of AC_HbPGL_BE20 recorded in DMSO- d_6 .

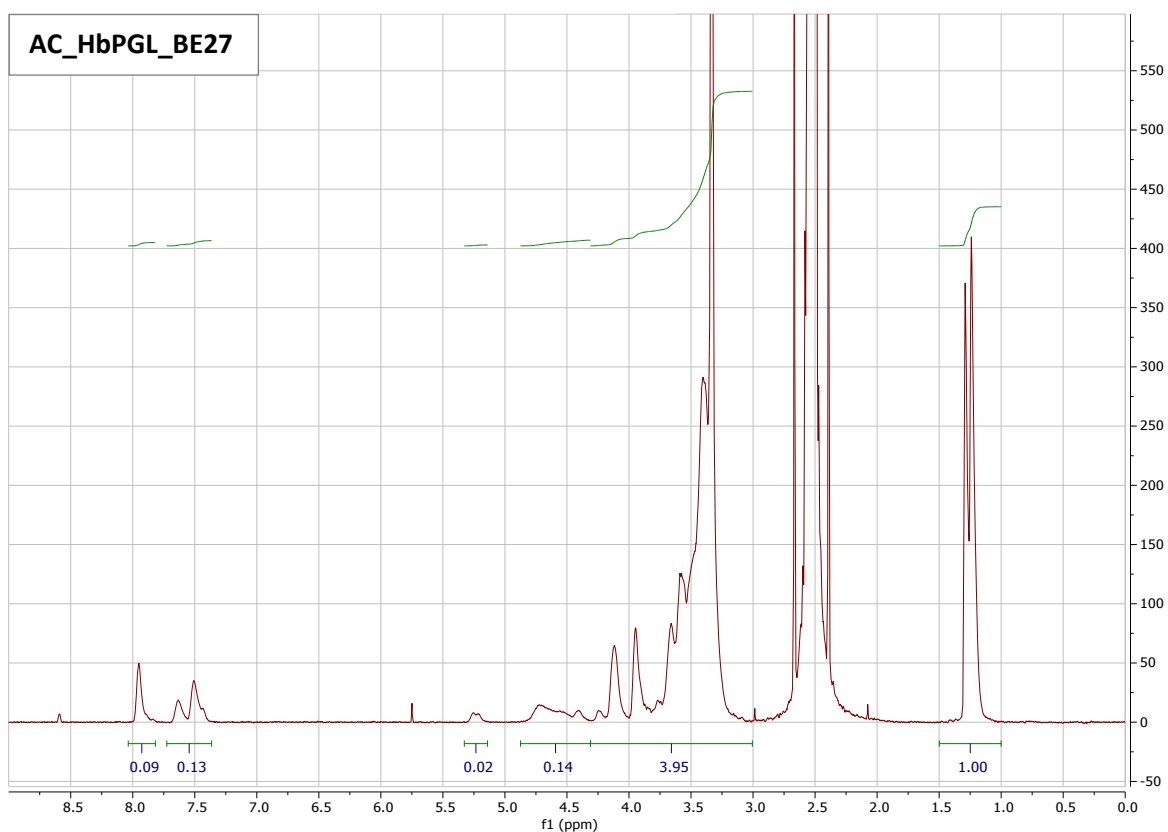


Figure S6. ^1H NMR spectrum of AC_HbPGL_BE27 recorded in DMSO-d_6 .

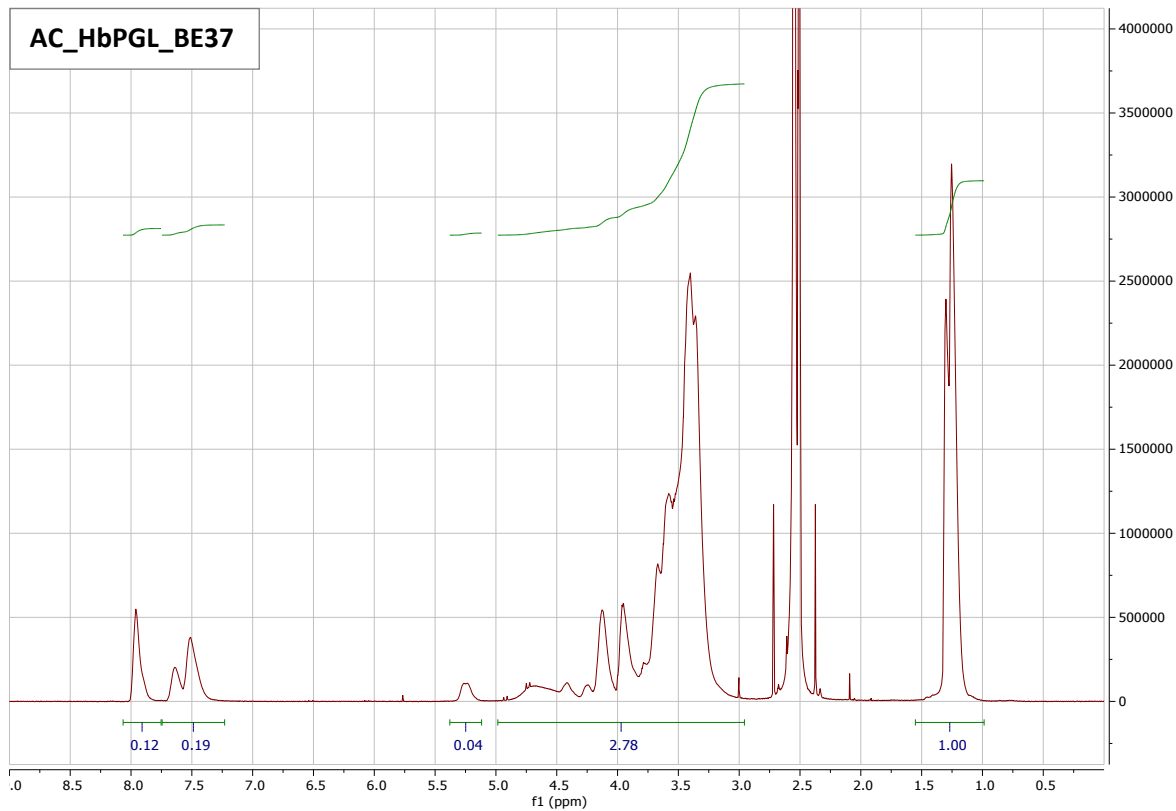


Figure S7. ^1H NMR spectrum of AC_HbPGL_BE37 recorded in DMSO-d_6 .

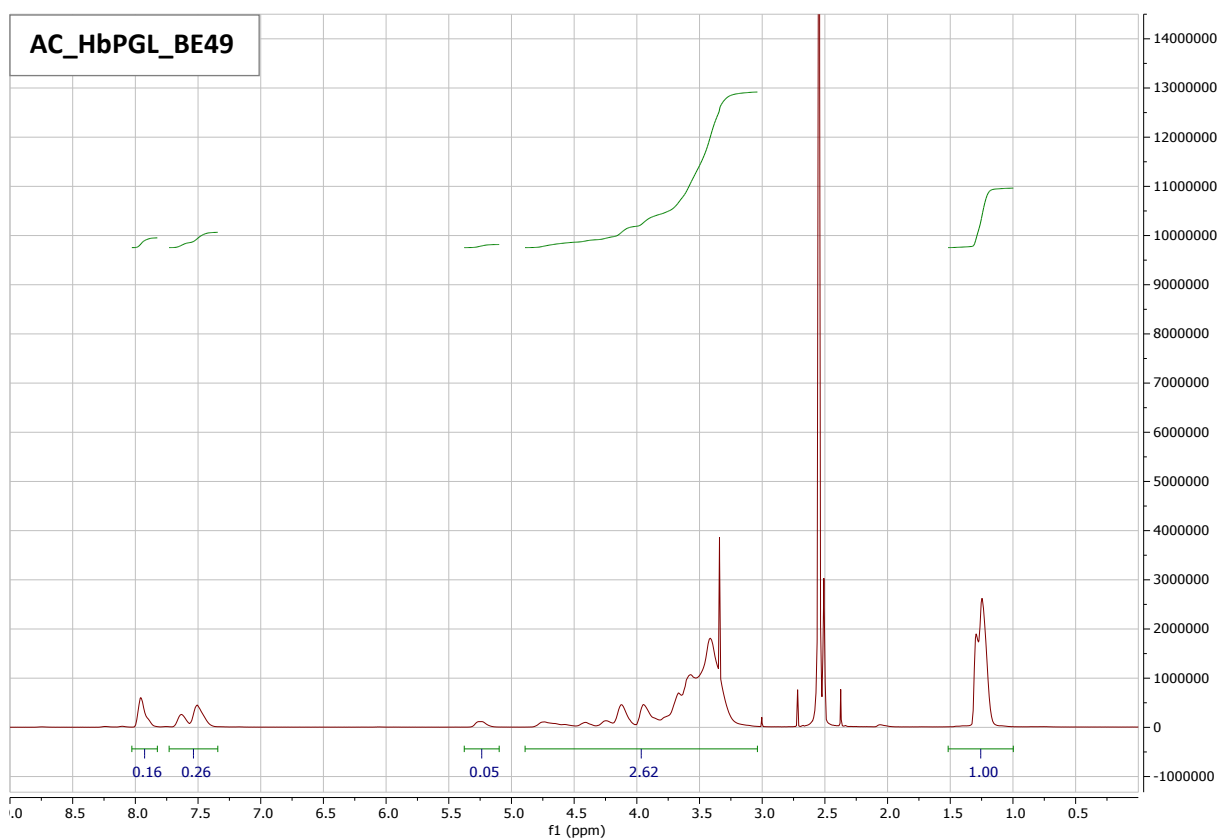


Figure S8. ^1H NMR spectrum of AC_HbPGL_BE49 recorded in DMSO- d_6 .

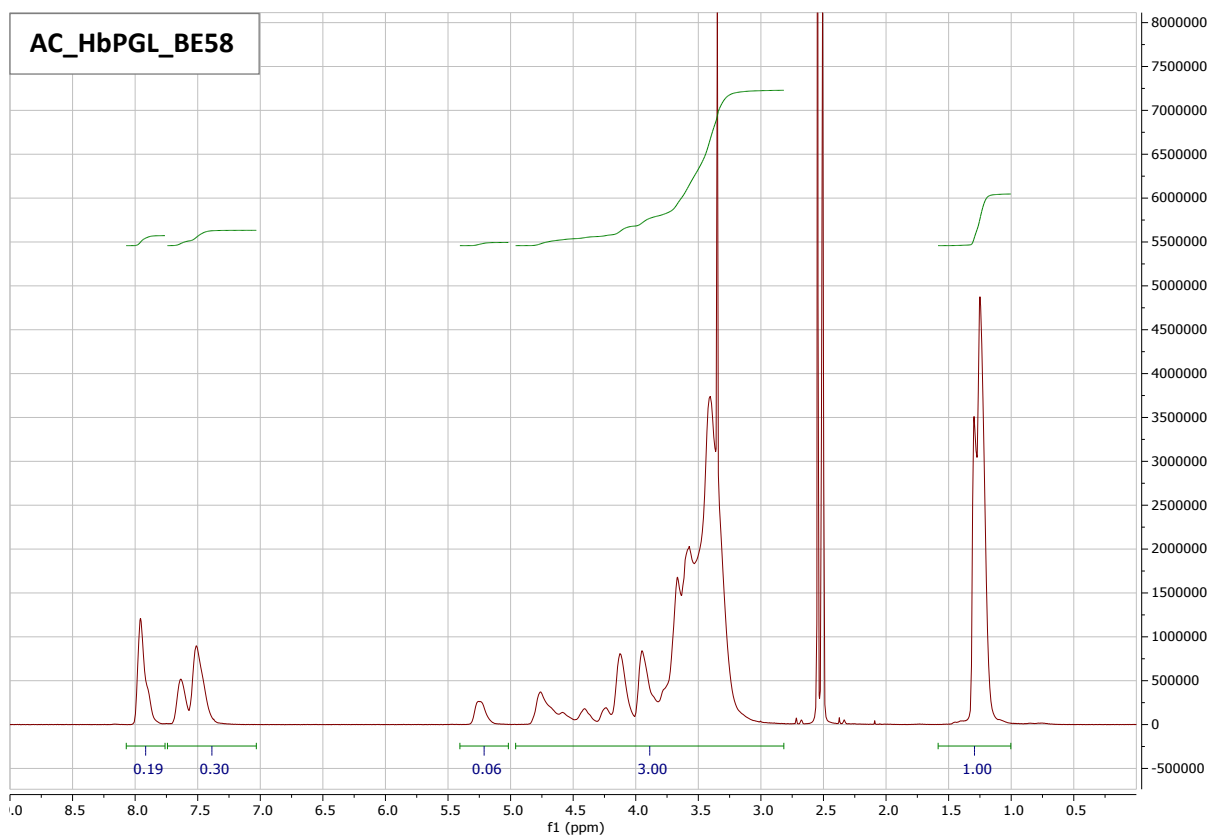


Figure S9. ^1H NMR spectrum of AC_HbPGL_BE58 recorded in DMSO- d_6 .

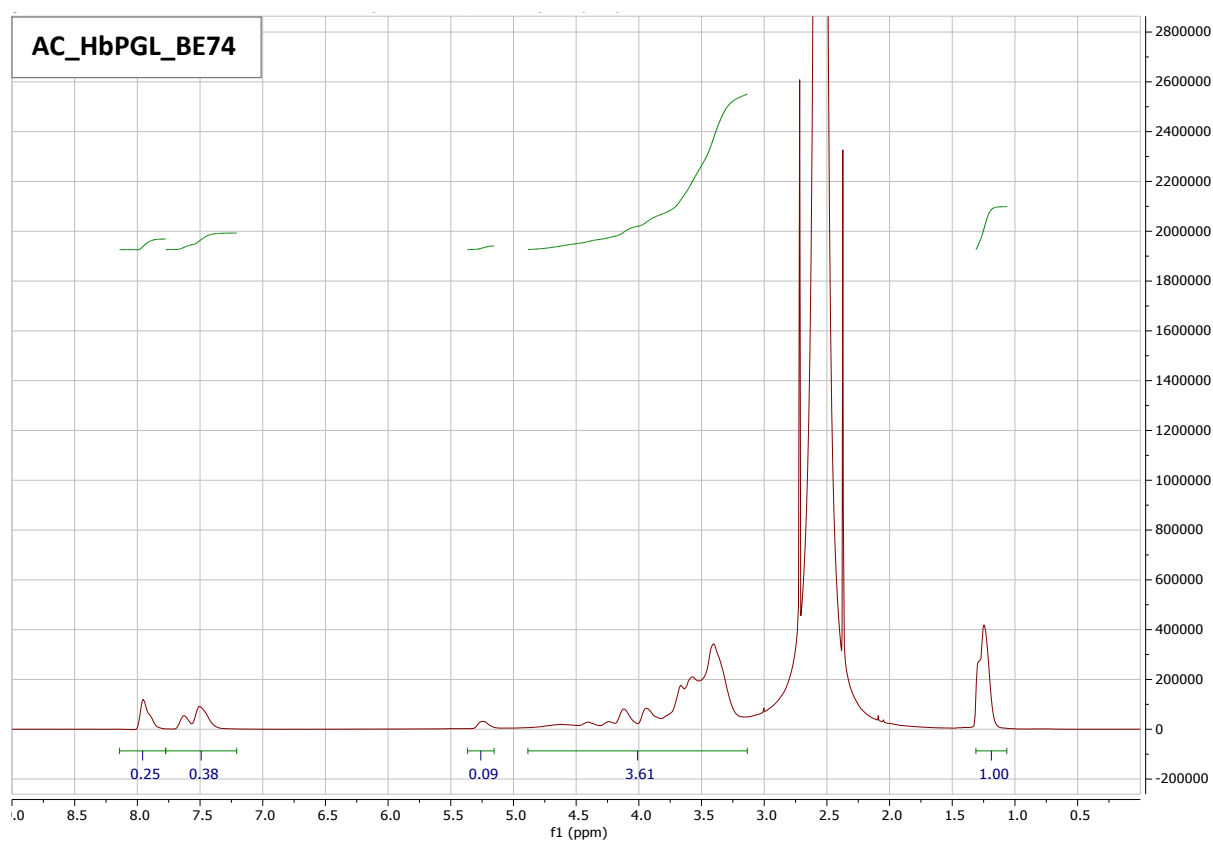


Figure S10. ^1H NMR spectrum of AC_HbPGL_BE74 recorded in DMSO- d_6 .

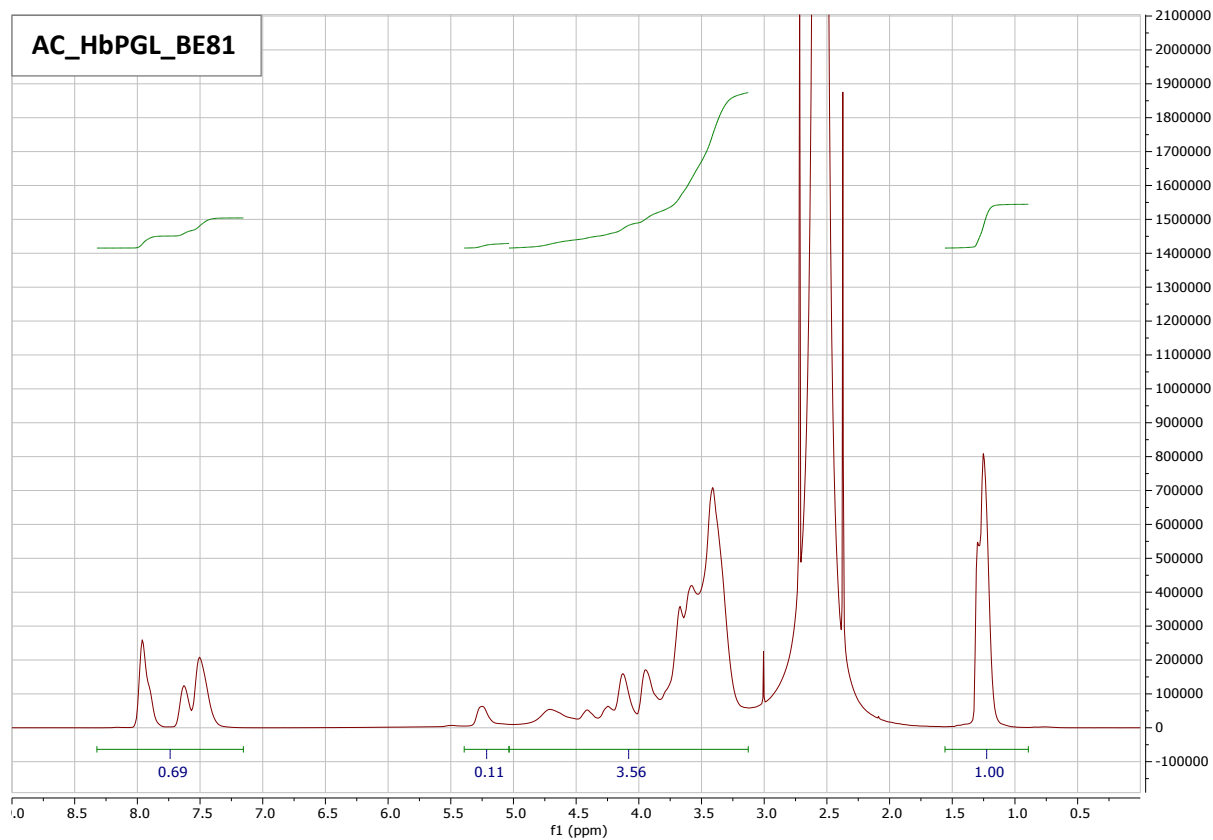


Figure S11. ^1H NMR spectrum of AC_HbPGL_BE81 recorded in DMSO- d_6 .

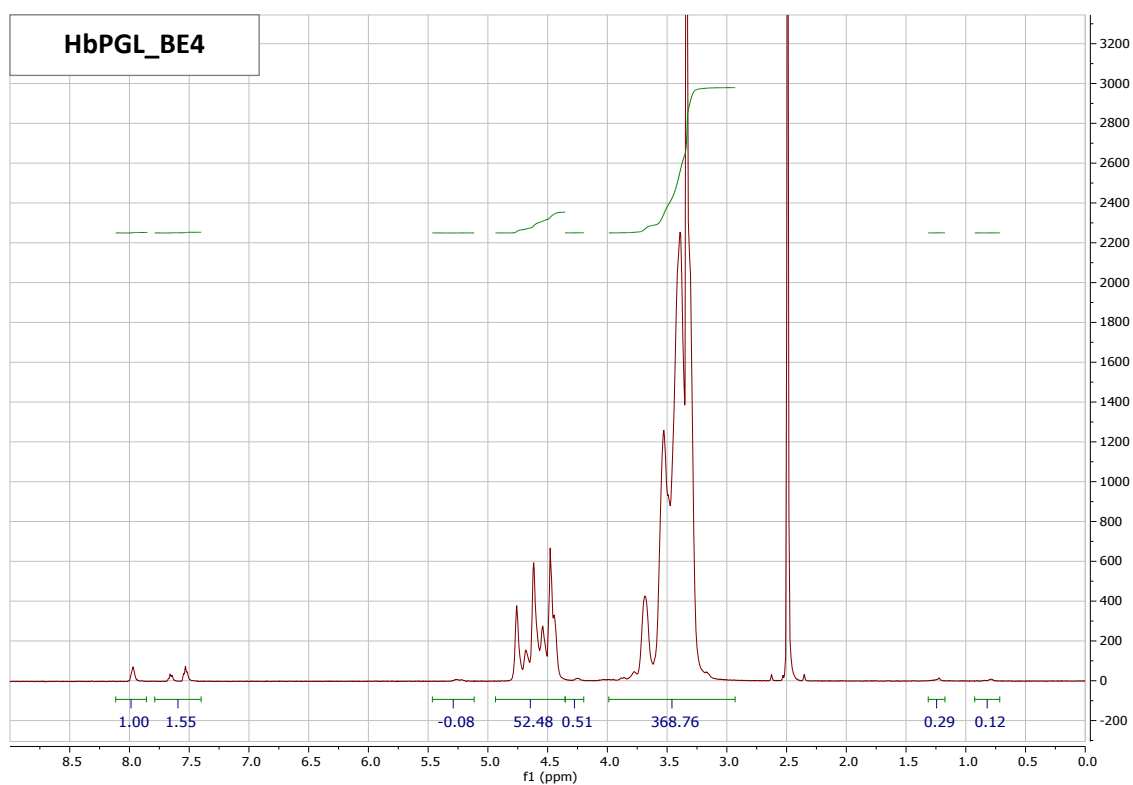


Figure S12. ^1H NMR spectrum of HbPGL_BE4 recorded in DMSO-d_6 .

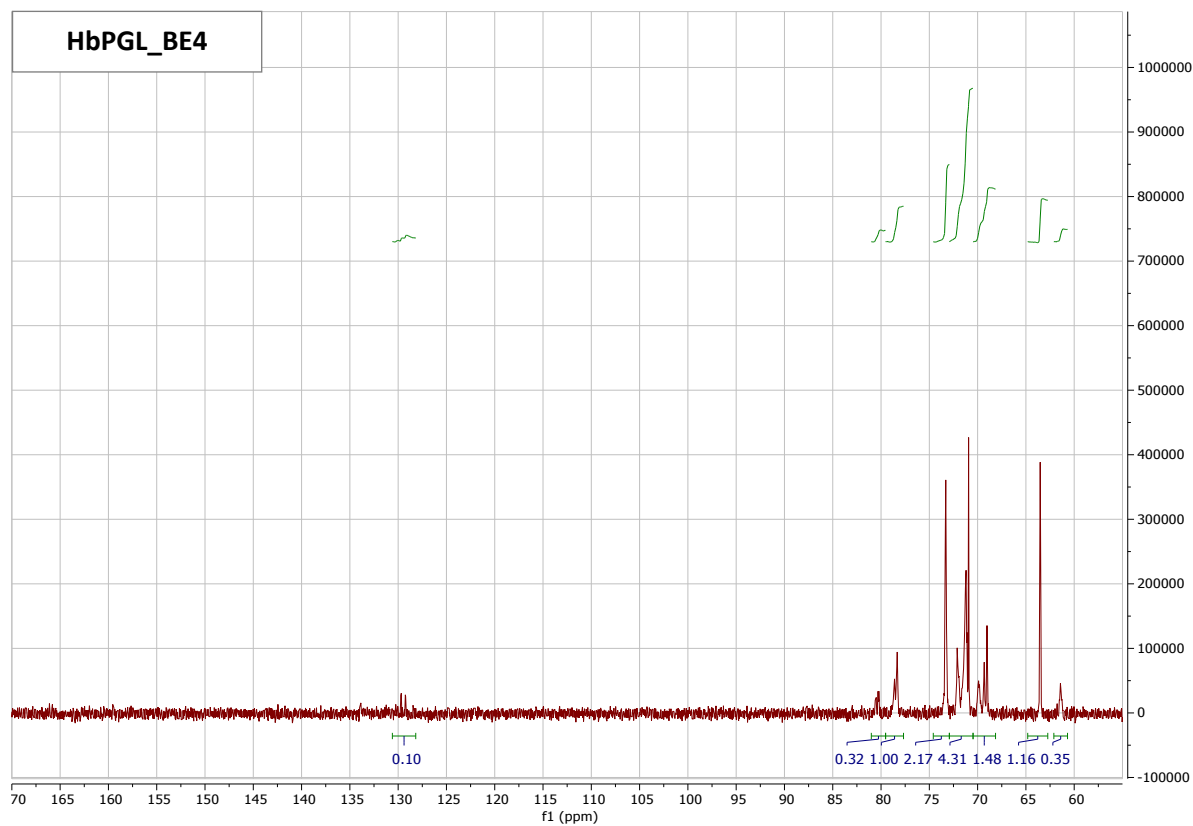


Figure S13. ^{13}C INVGATED NMR spectrum of HbPGL_BE4 recorded in DMSO-d_6 .

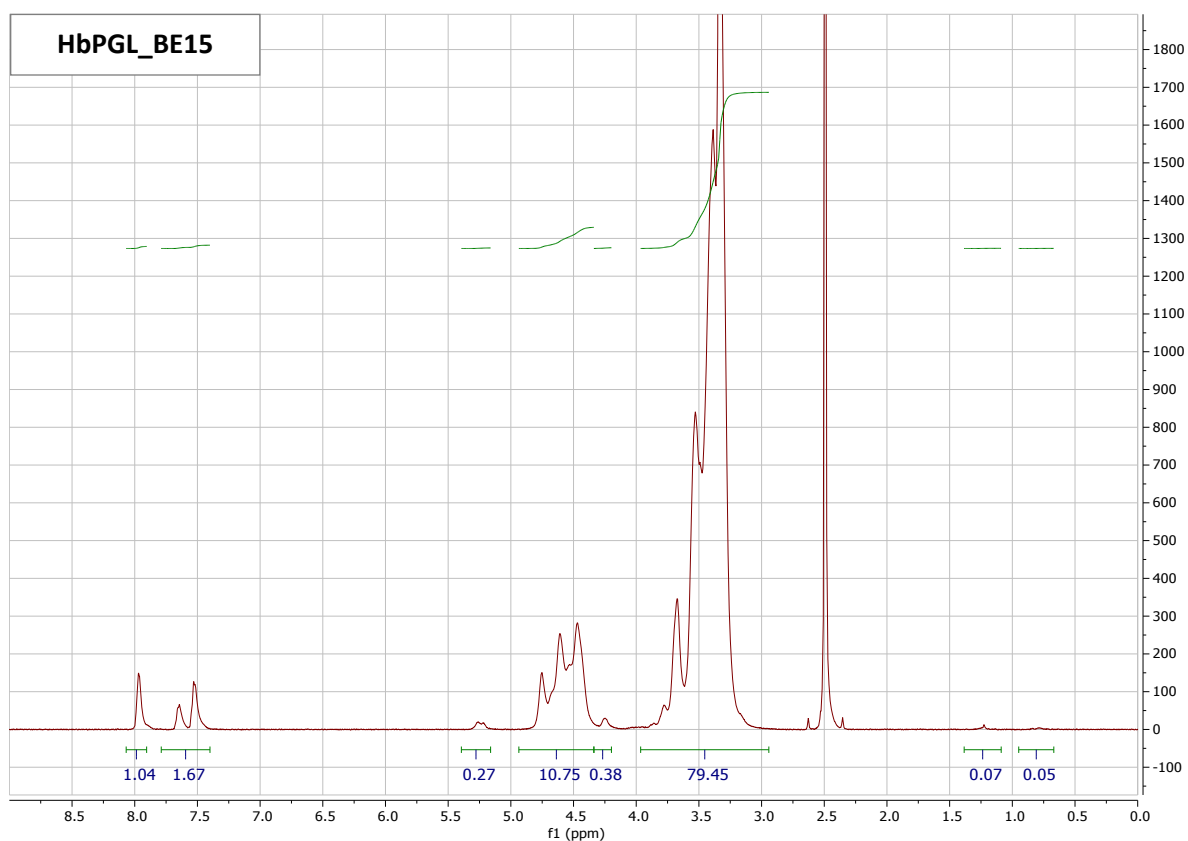


Figure S14. ^1H NMR spectrum of HbPGL_BE15 recorded in DMSO-d_6 .

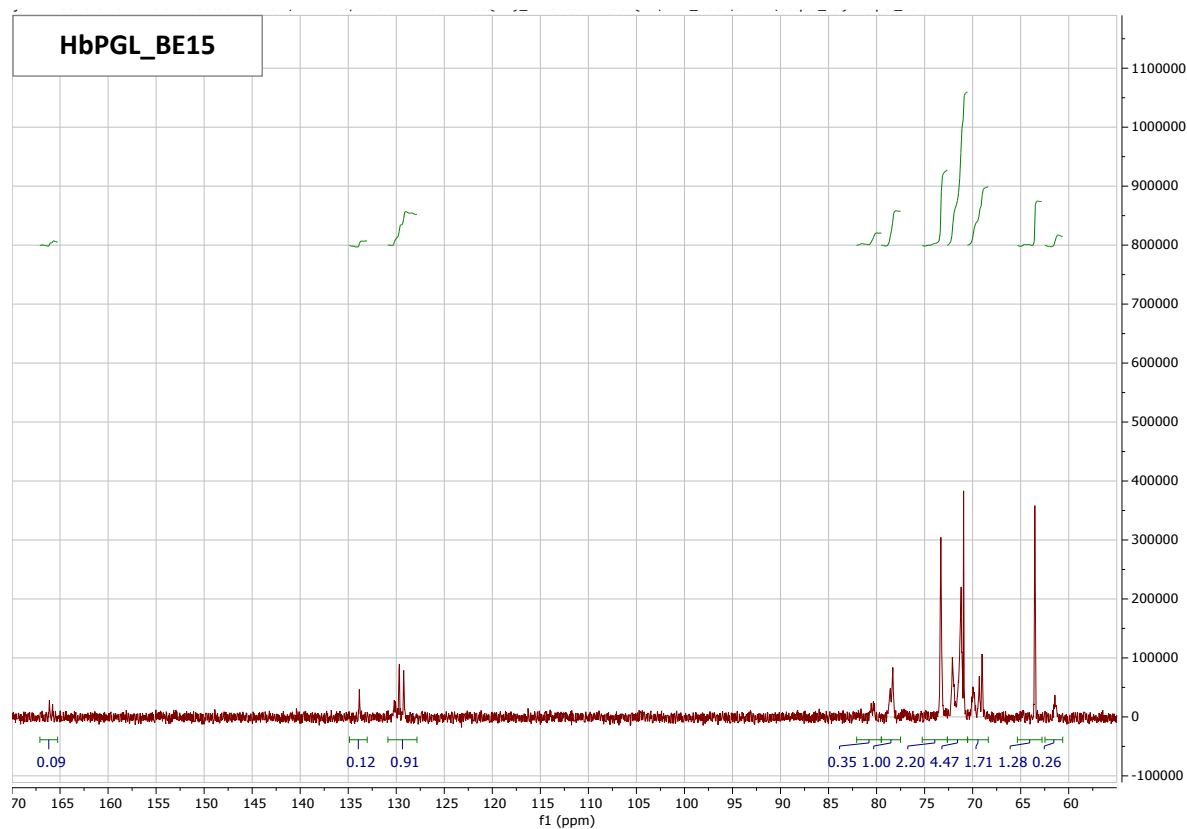


Figure S15. ^{13}C INVGATED NMR spectrum of HbPGL_BE15 recorded in DMSO-d_6 .

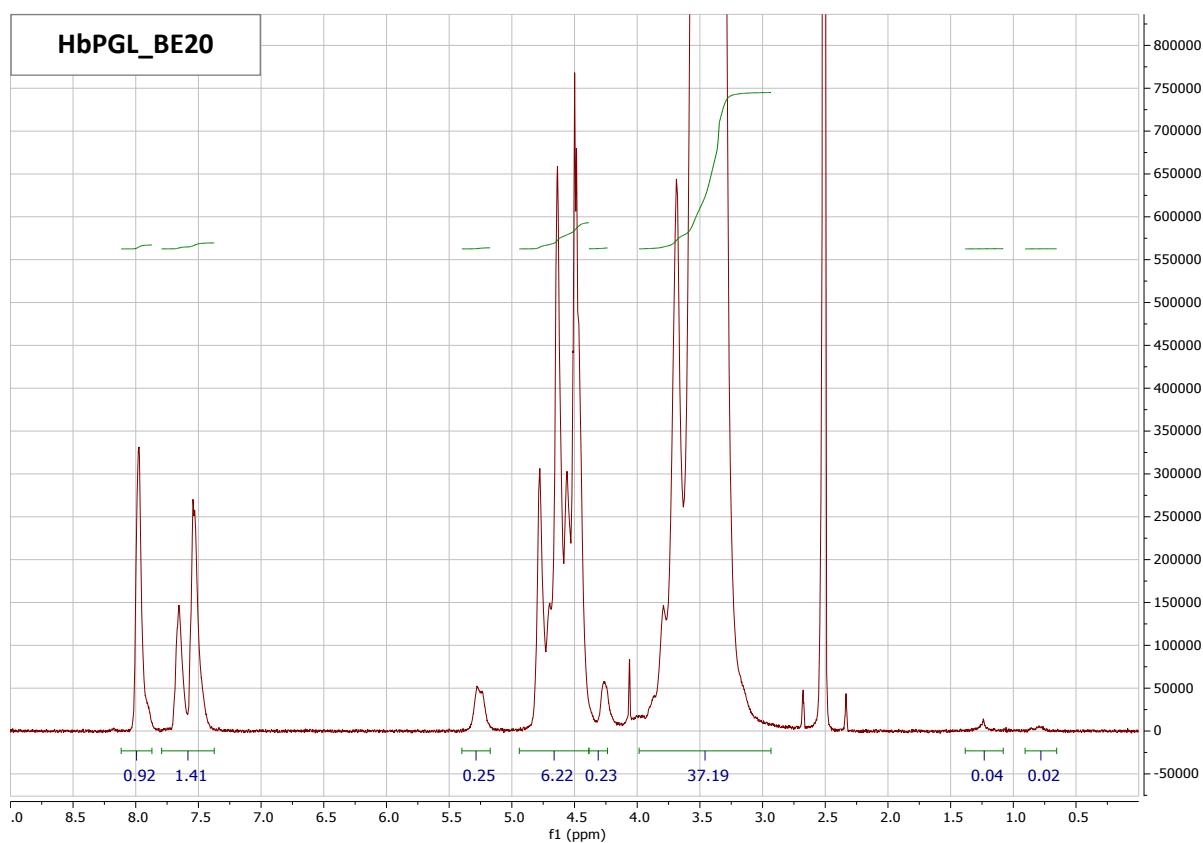


Figure S16. ^1H NMR spectrum of HbPGL_BE20 recorded in DMSO-d_6 .

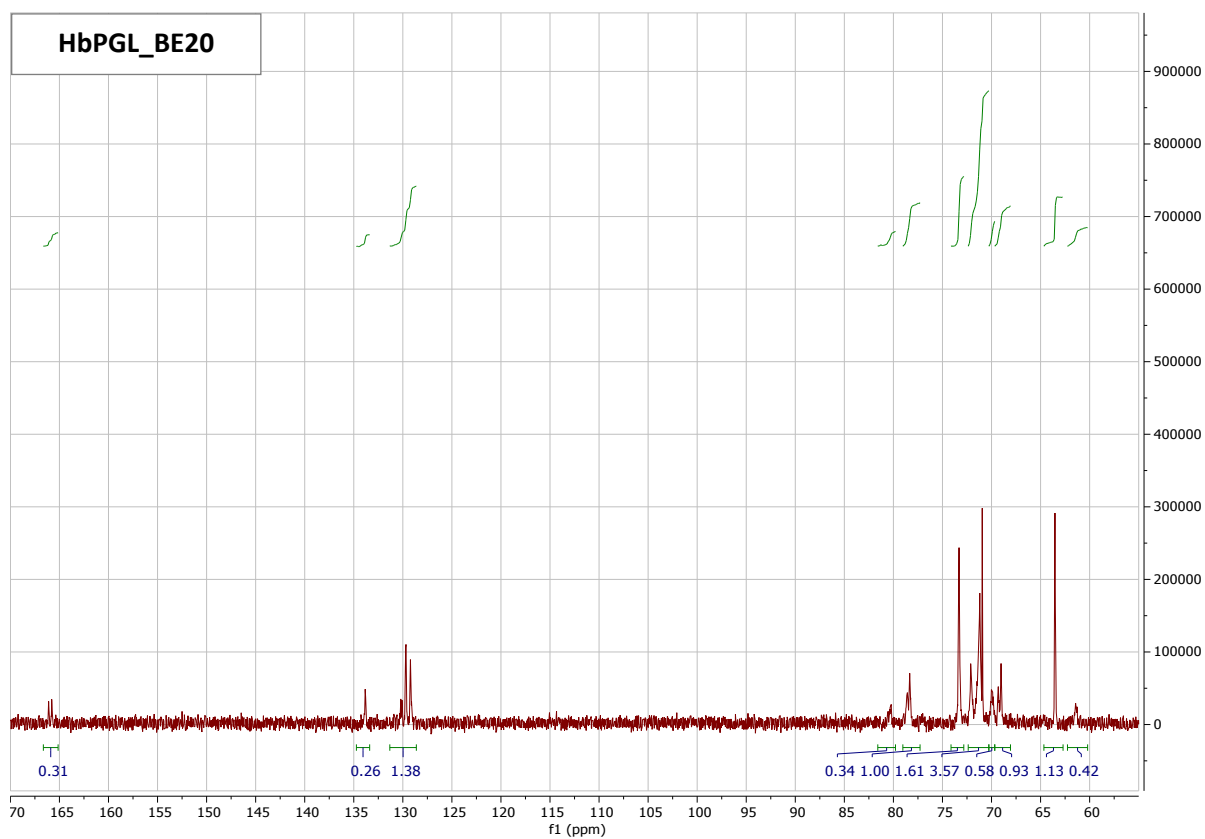


Figure S17. ^{13}C INVGATED NMR spectrum of HbPGL_BE20 recorded in DMSO-d_6 .

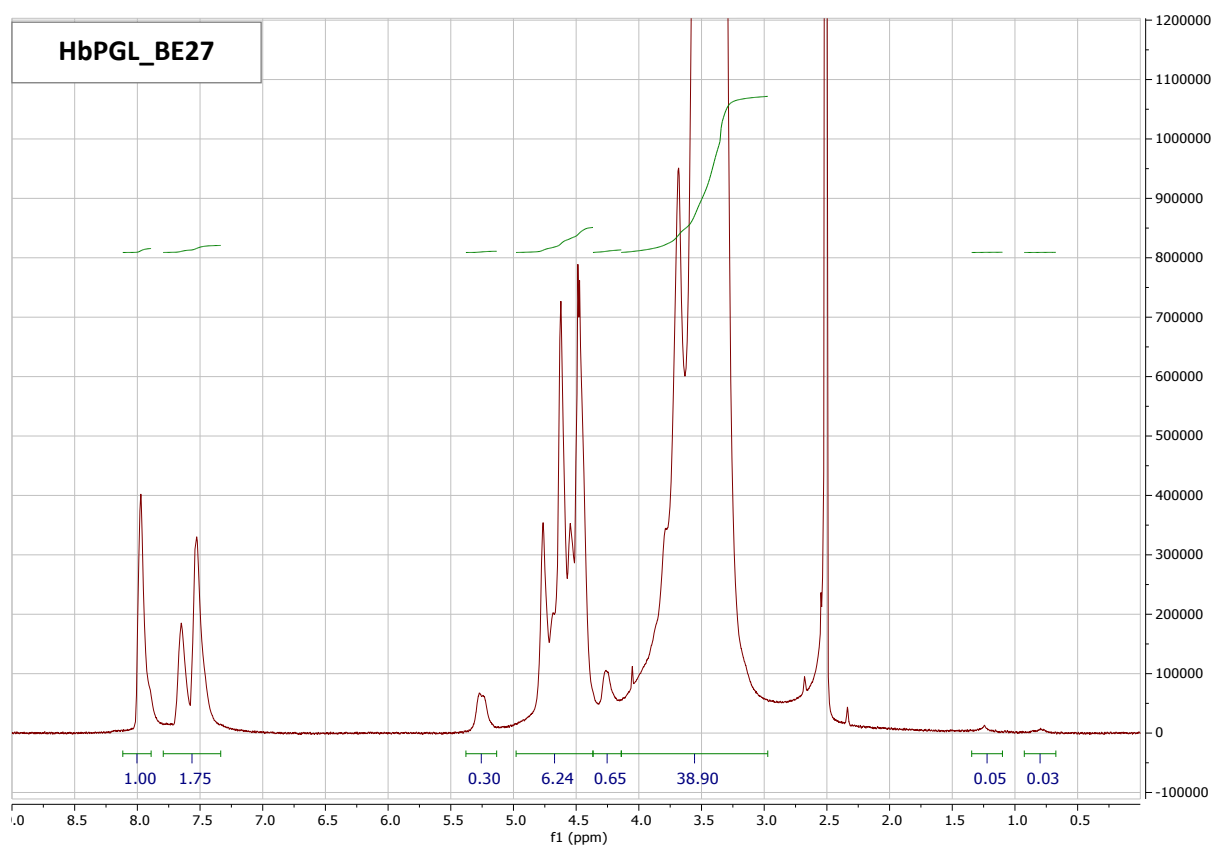


Figure S18. ^1H NMR spectrum of HbPGL_BE27 recorded in DMSO- d_6 .

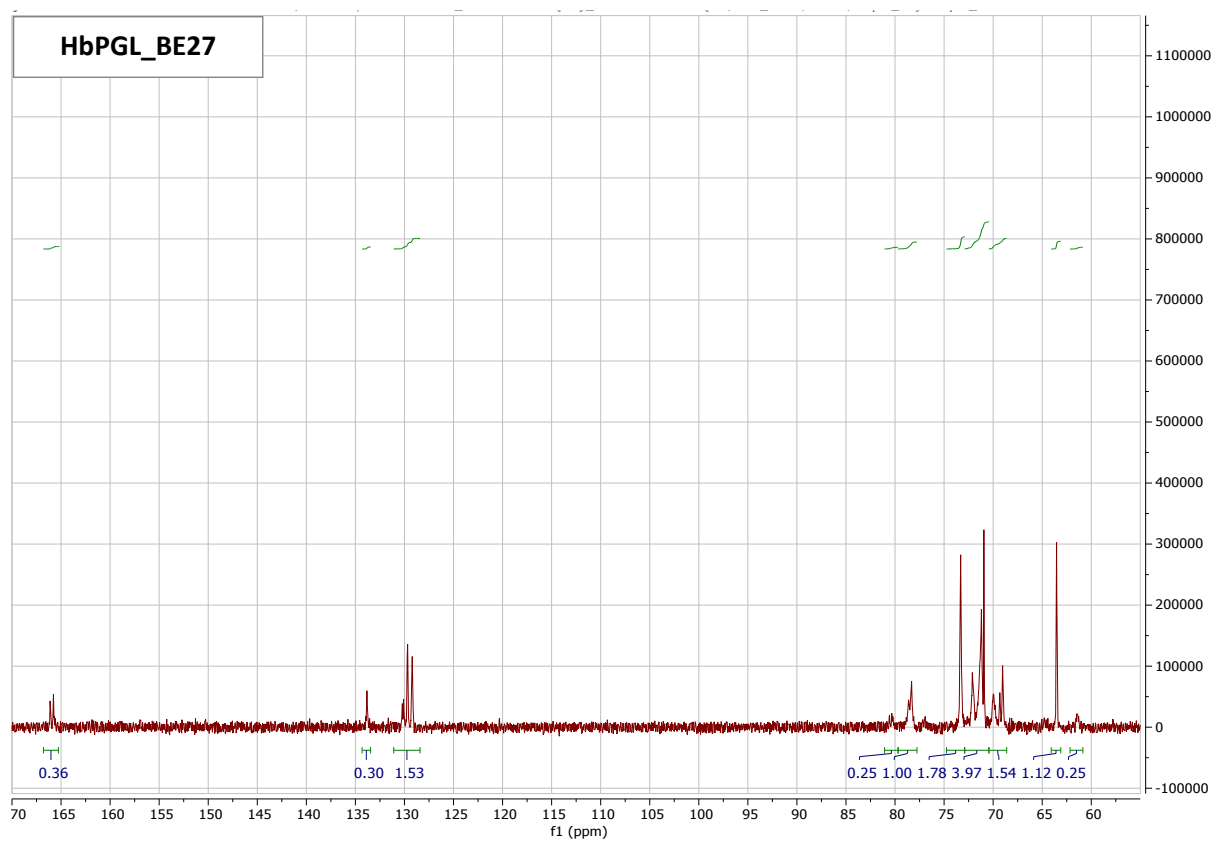


Figure S19. ^{13}C INVGATED NMR spectrum of HbPGL_BE27 recorded in DMSO- d_6 .

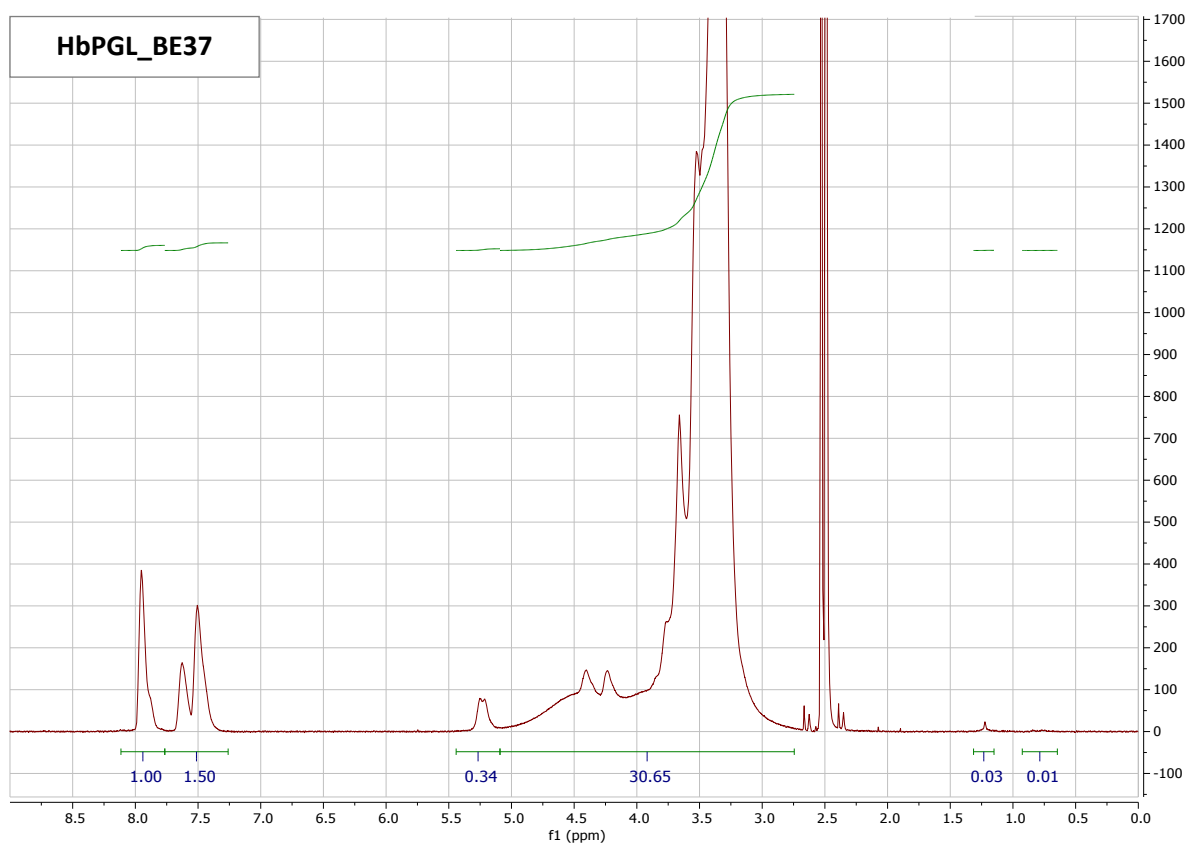


Figure S20. ^1H NMR spectrum of HbPGL_BE37 recorded in DMSO-d_6 .

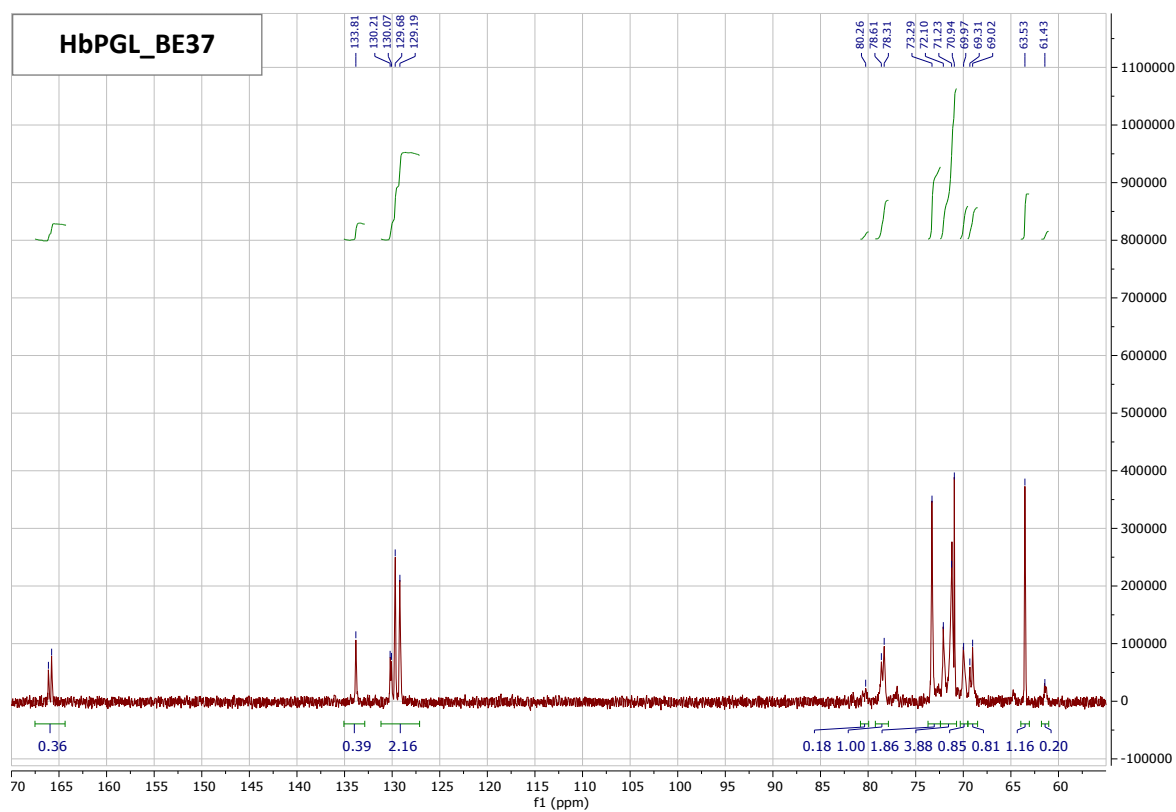


Figure S21. ^{13}C INV GATED NMR spectrum of HbPGL_BE37 recorded in DMSO-d_6 .

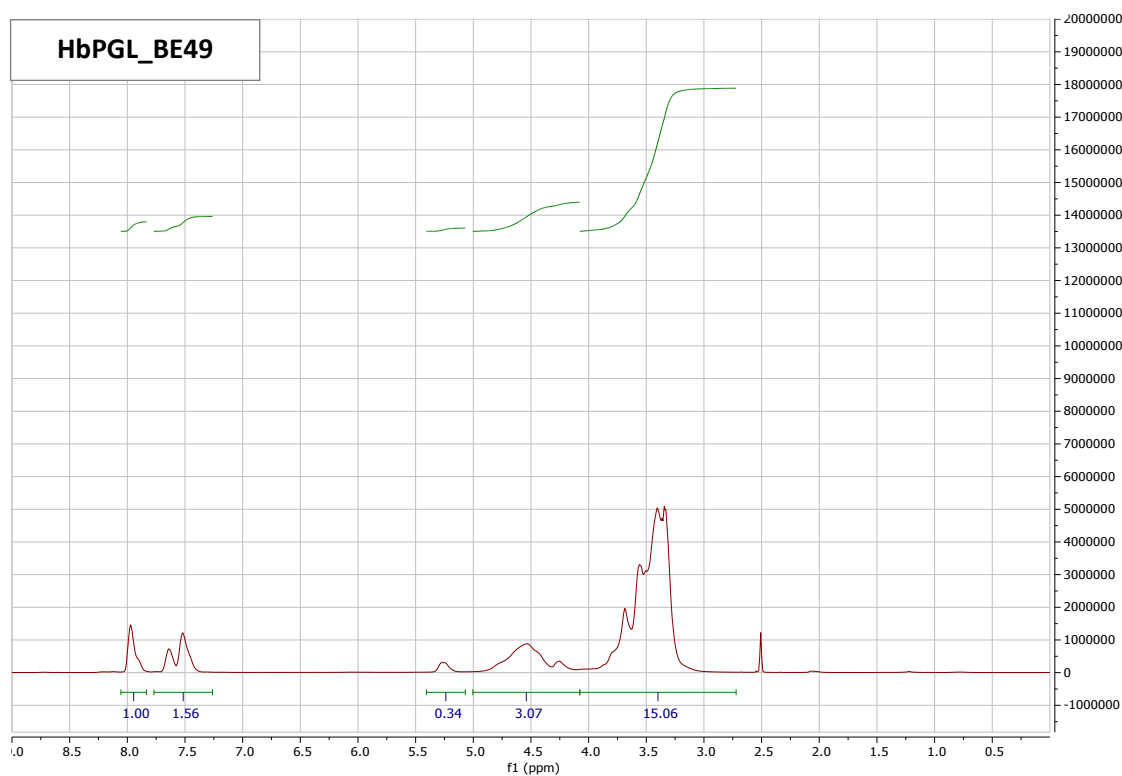


Figure S22. ^1H NMR spectrum of HbPGL_BE49 recorded in DMSO-d_6 .

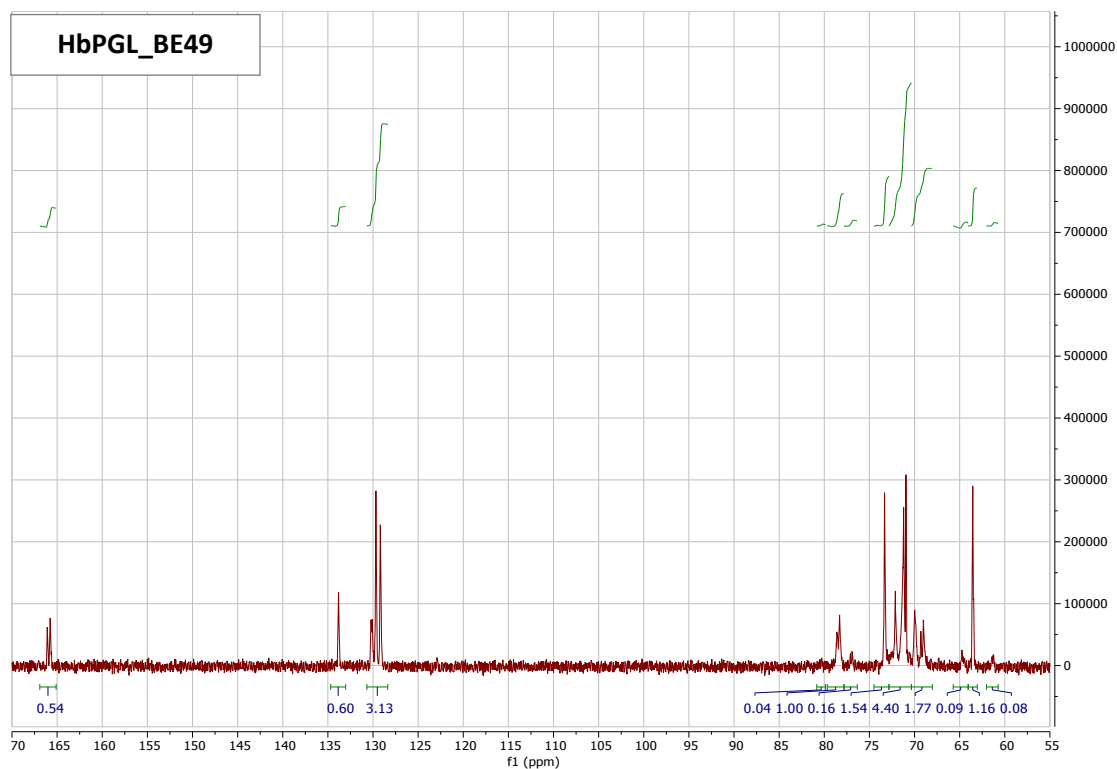


Figure S23. ^{13}C INVGATED NMR spectrum of HbPGL_BE49 recorded in DMSO-d_6 .

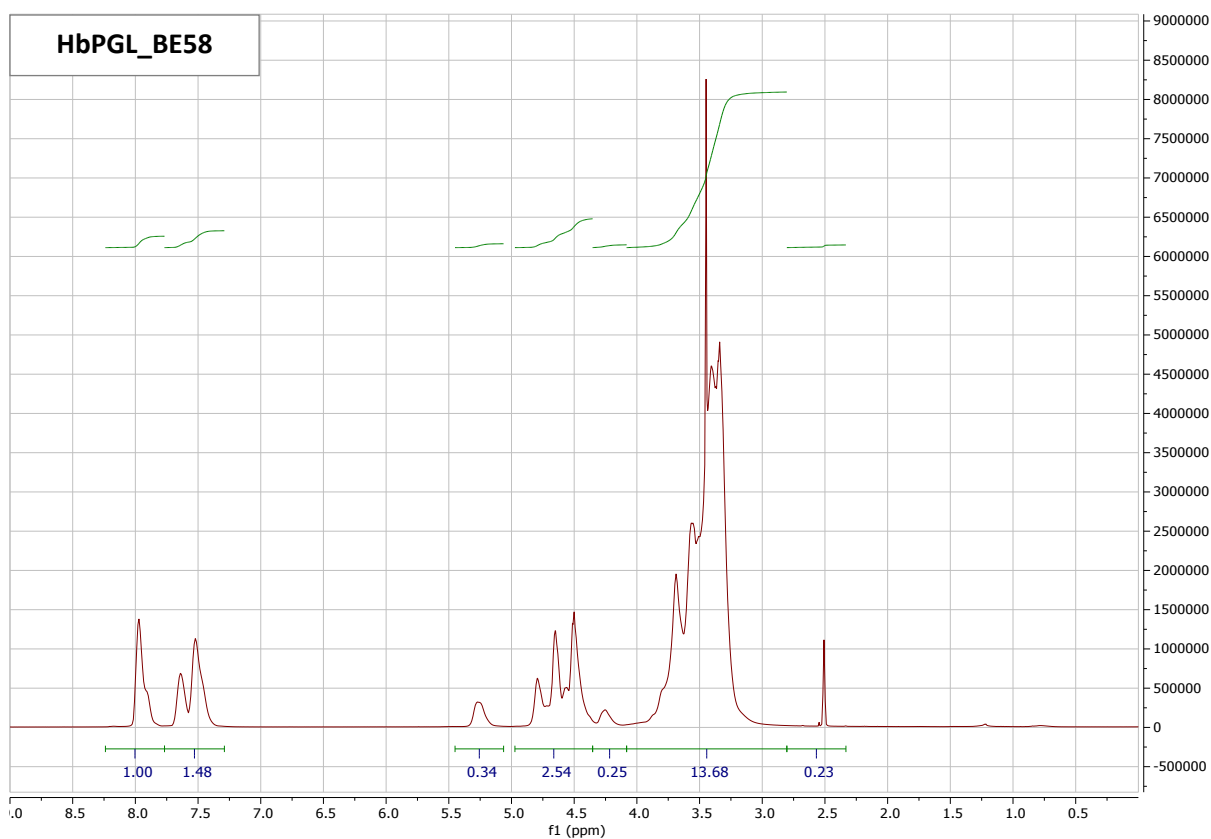


Figure S24. ^1H NMR spectrum of HbPGL_BE58 recorded in DMSO-d_6 .

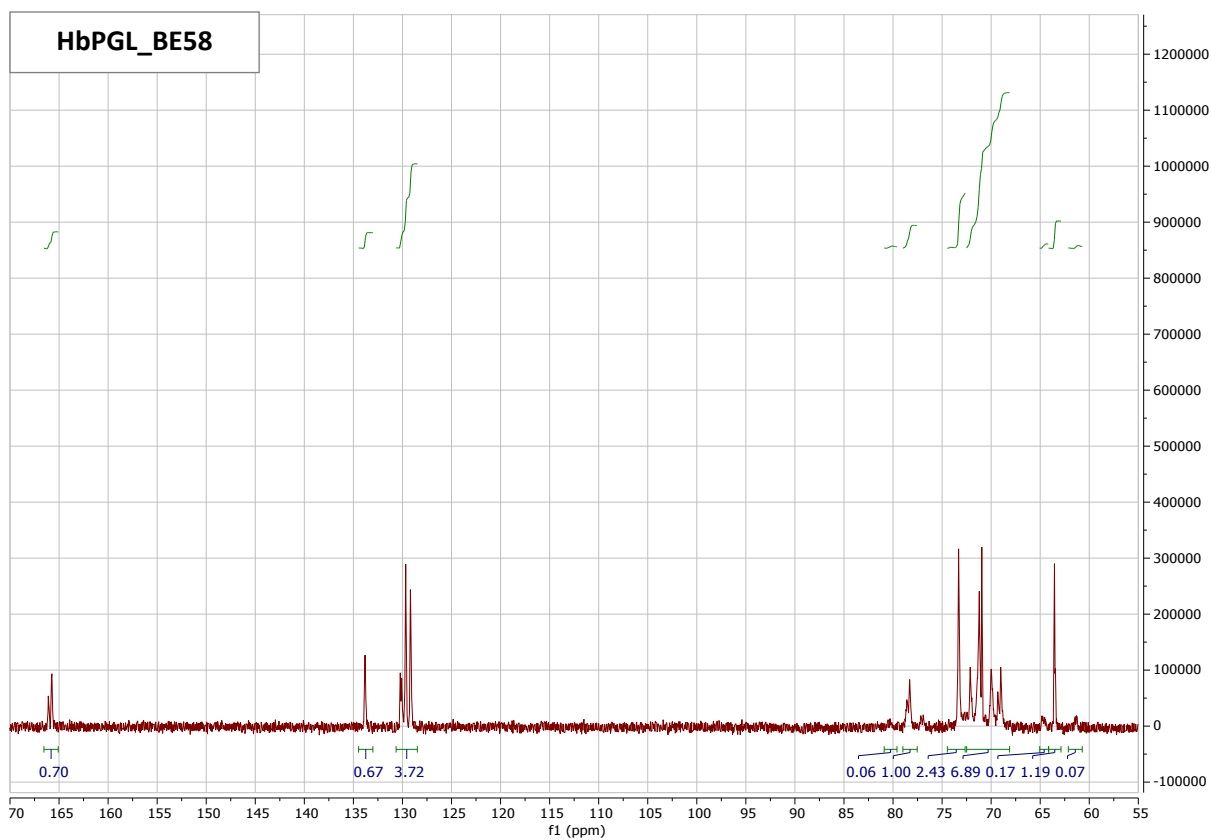


Figure S25. ^{13}C INV GATED NMR spectrum of HbPGL_BE58 recorded in DMSO-d_6 .

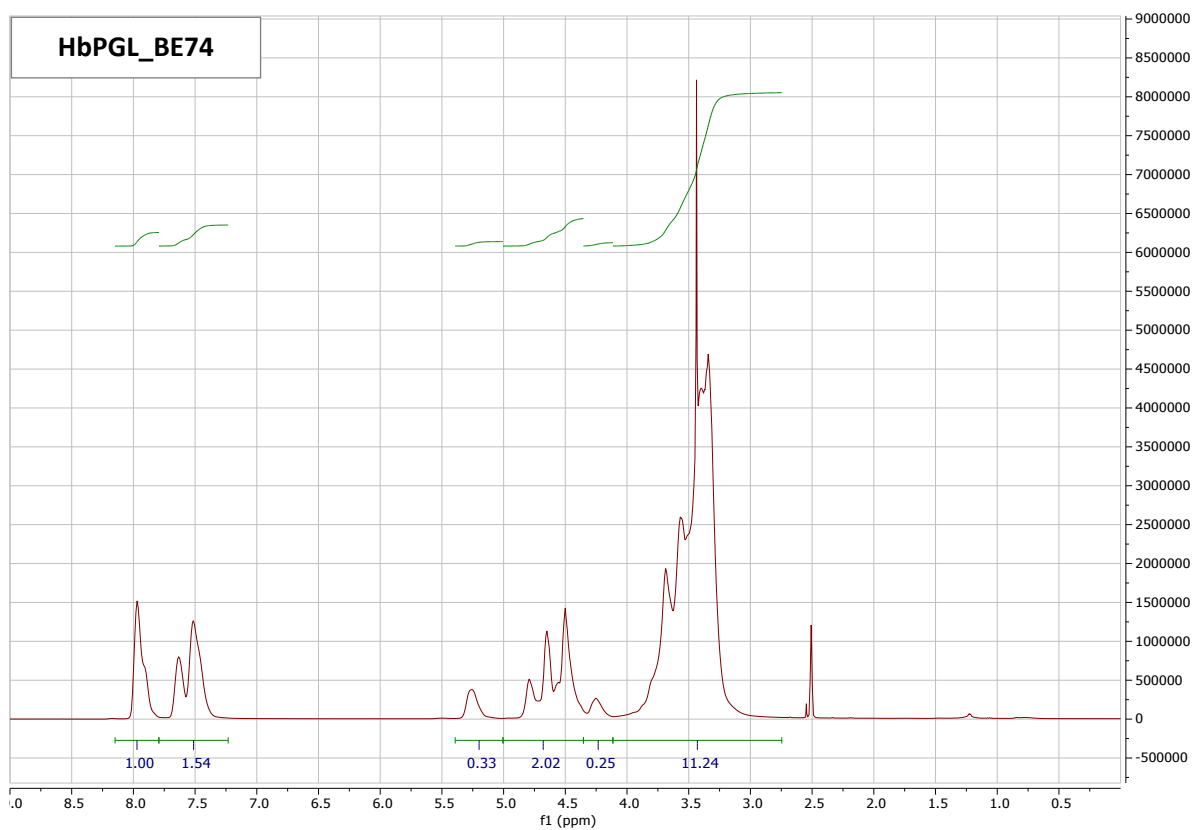


Figure S26. ^1H NMR spectrum of HbPGL_BE74 recorded in DMSO-d_6 .

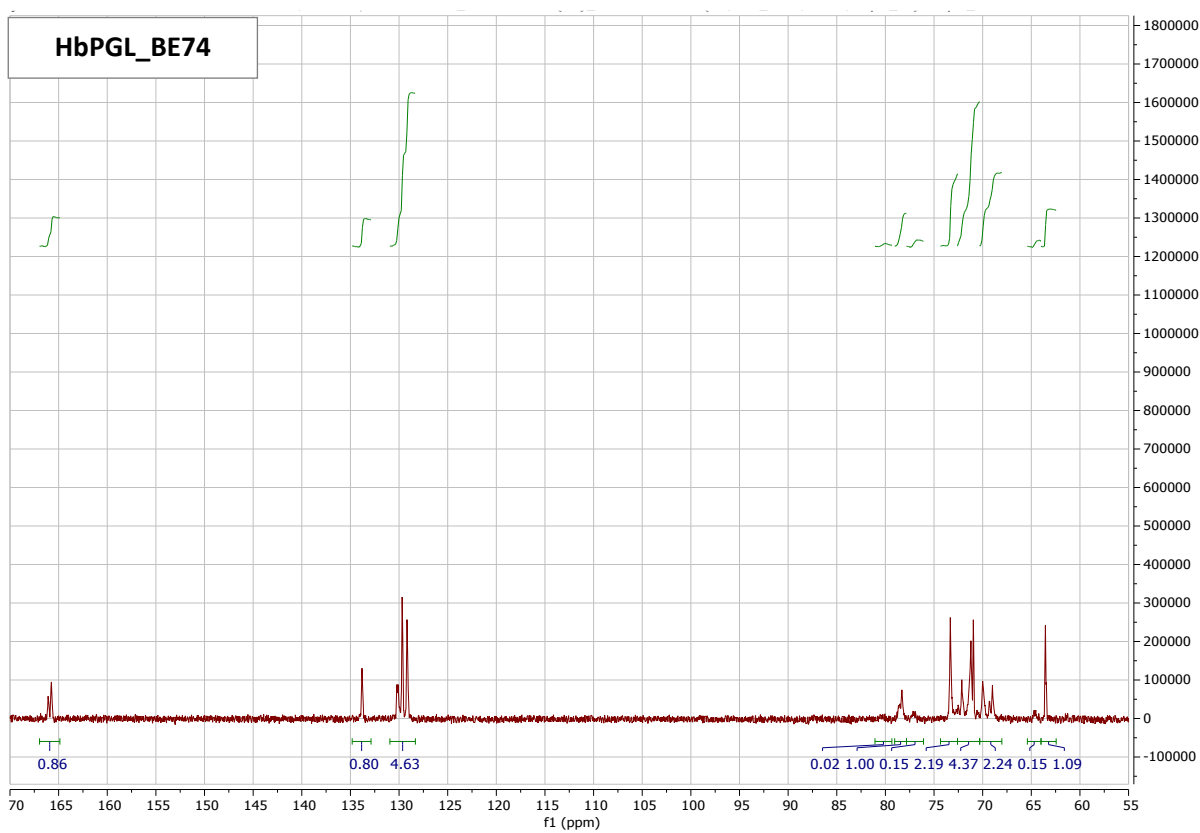


Figure S27. ^{13}C INVGATED NMR spectrum of HbPGL_BE74 recorded in DMSO-d_6 .

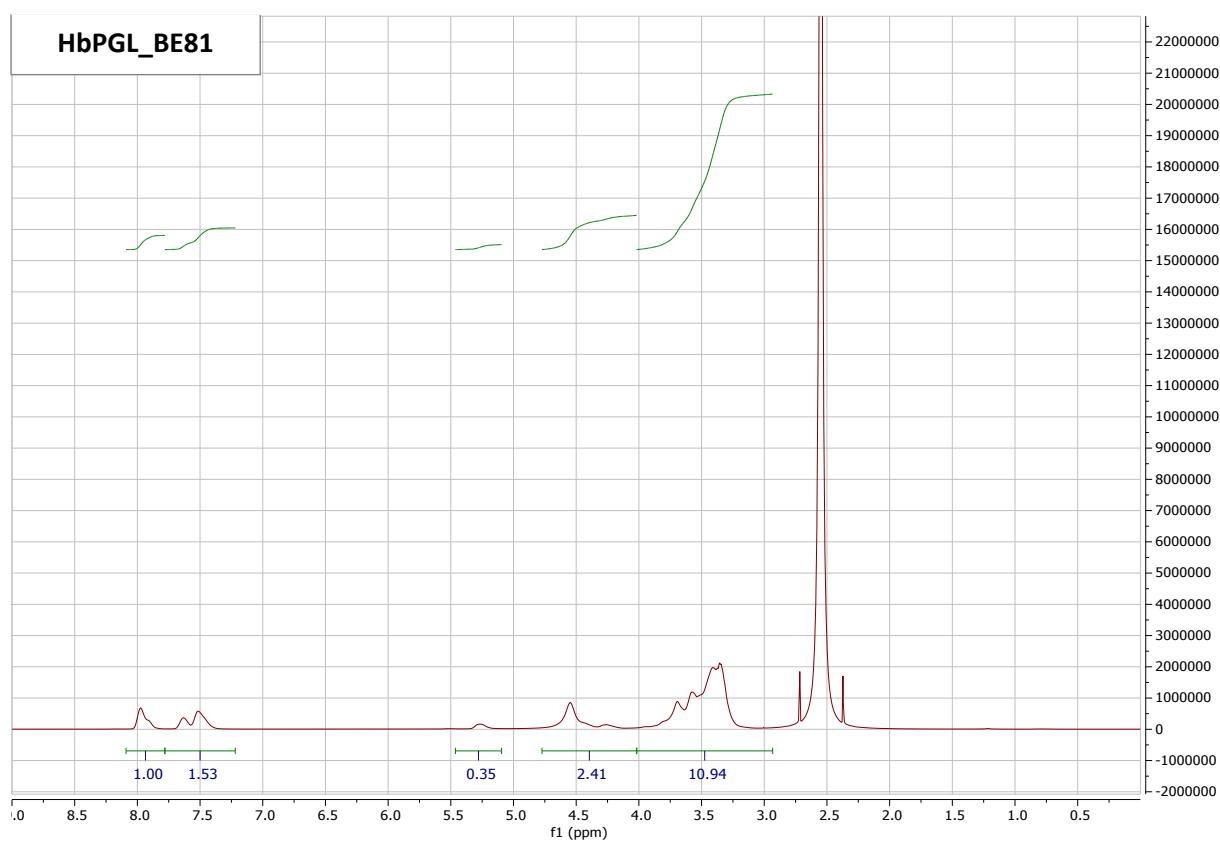


Figure S28. ^1H NMR spectrum of HbPGL_BE81 recorded in DMSO- d_6 .

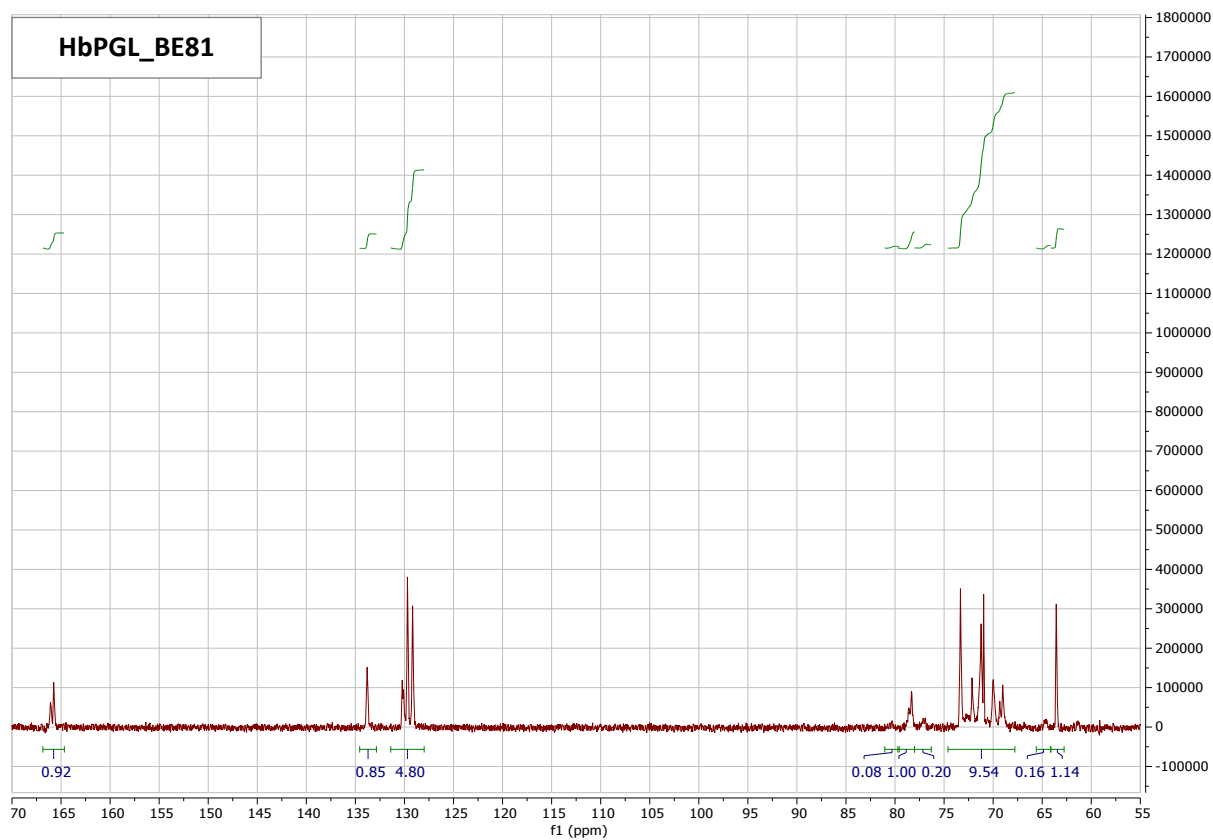


Figure S29. ^{13}C INV GATED NMR spectrum of HbPGL_BE81 recorded in DMSO- d_6 .

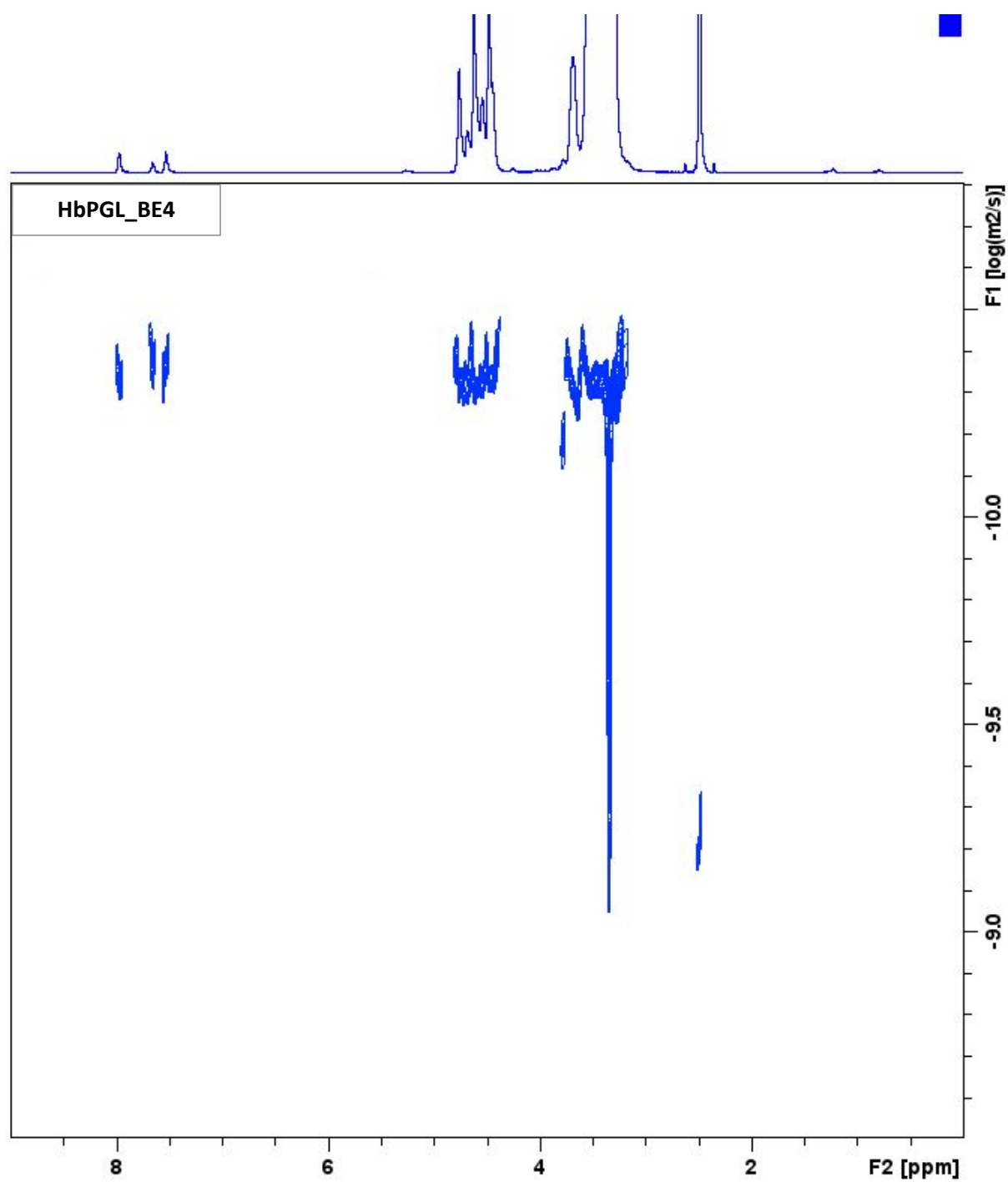


Figure S30. ¹H DOSY NMR spectrum of HbPGL_BE4 recorded in DMSO-d₆.

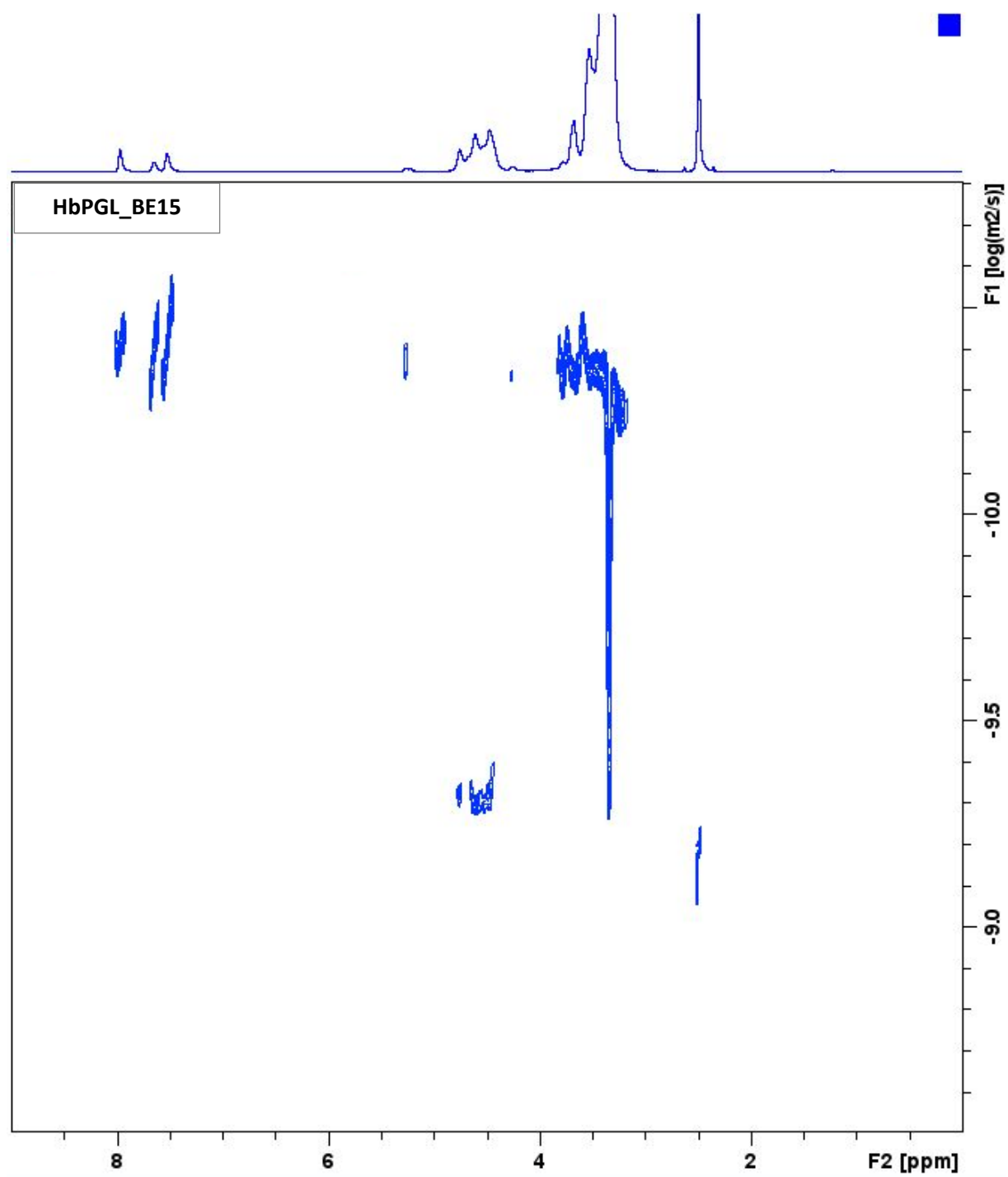


Figure S31. ¹H DOSY NMR spectrum of HbPGL_BE15 recorded in DMSO-d₆.

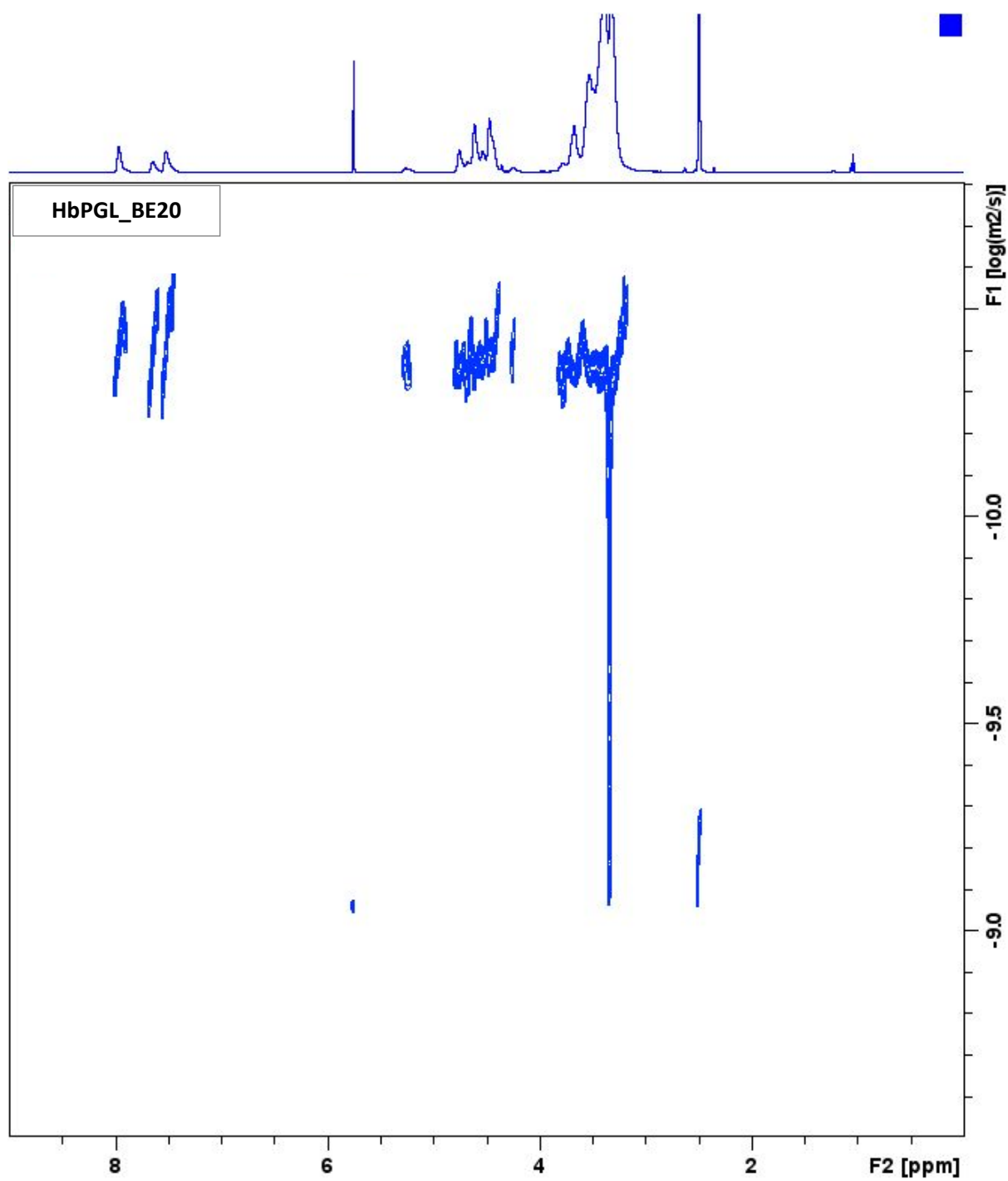


Figure S32. ^1H DOSY NMR spectrum of HbPGL_BE20 recorded in DMSO-d_6 .

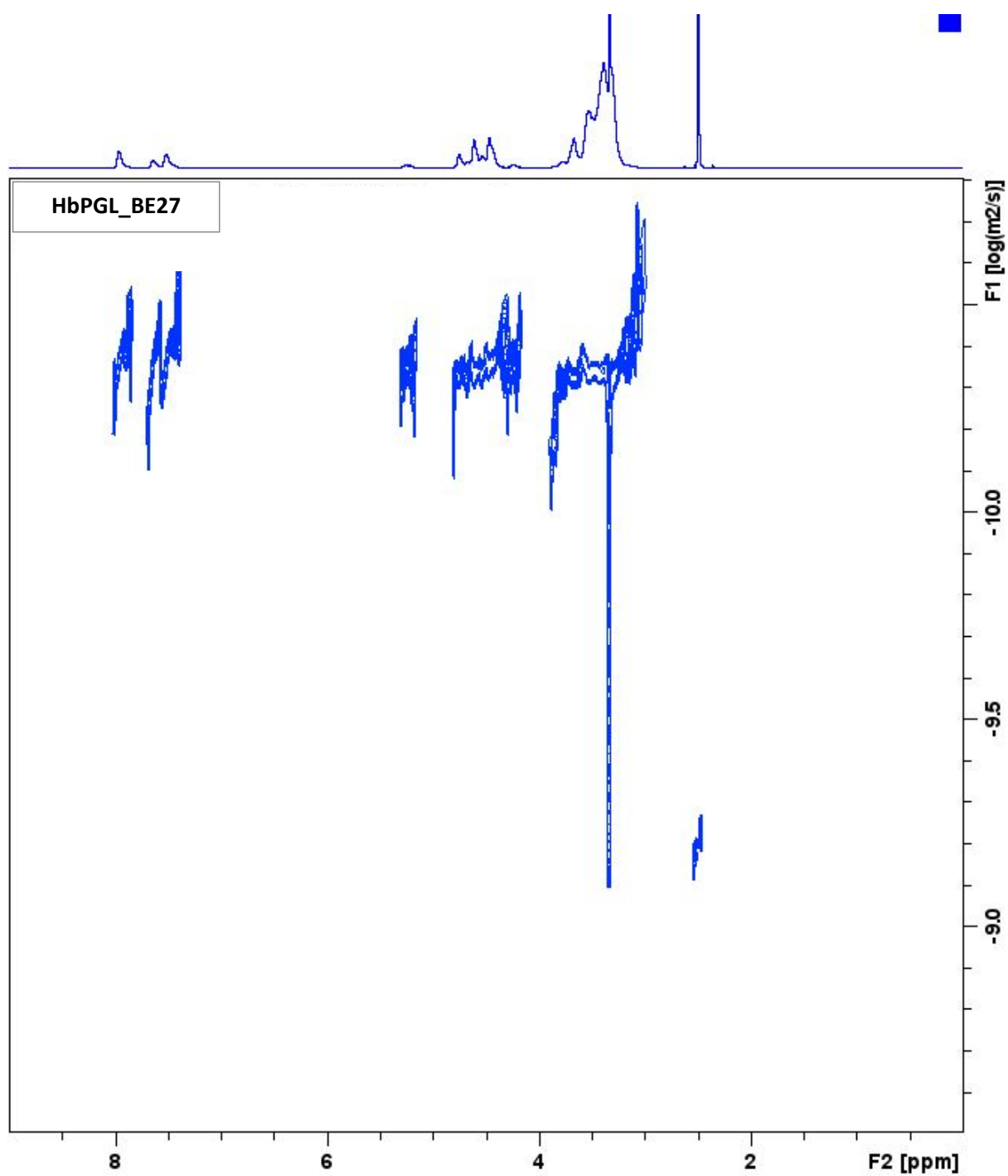


Figure S33. ^1H DOSY NMR spectrum of HbPGL_BE27 recorded in DMSO-d_6 .

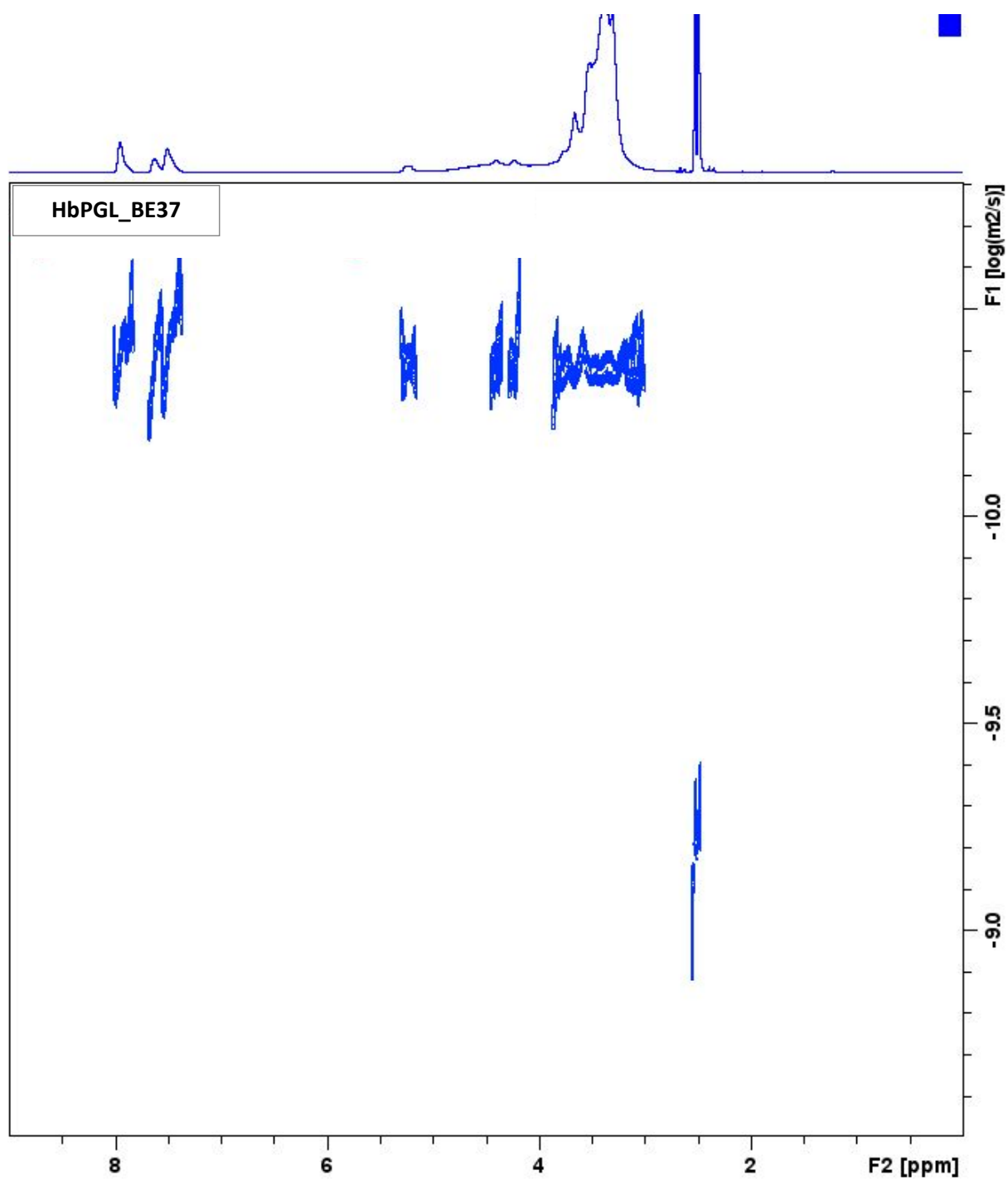


Figure S34. ¹H DOSY NMR spectrum of HbPGL_BE37 recorded in DMSO-d₆.

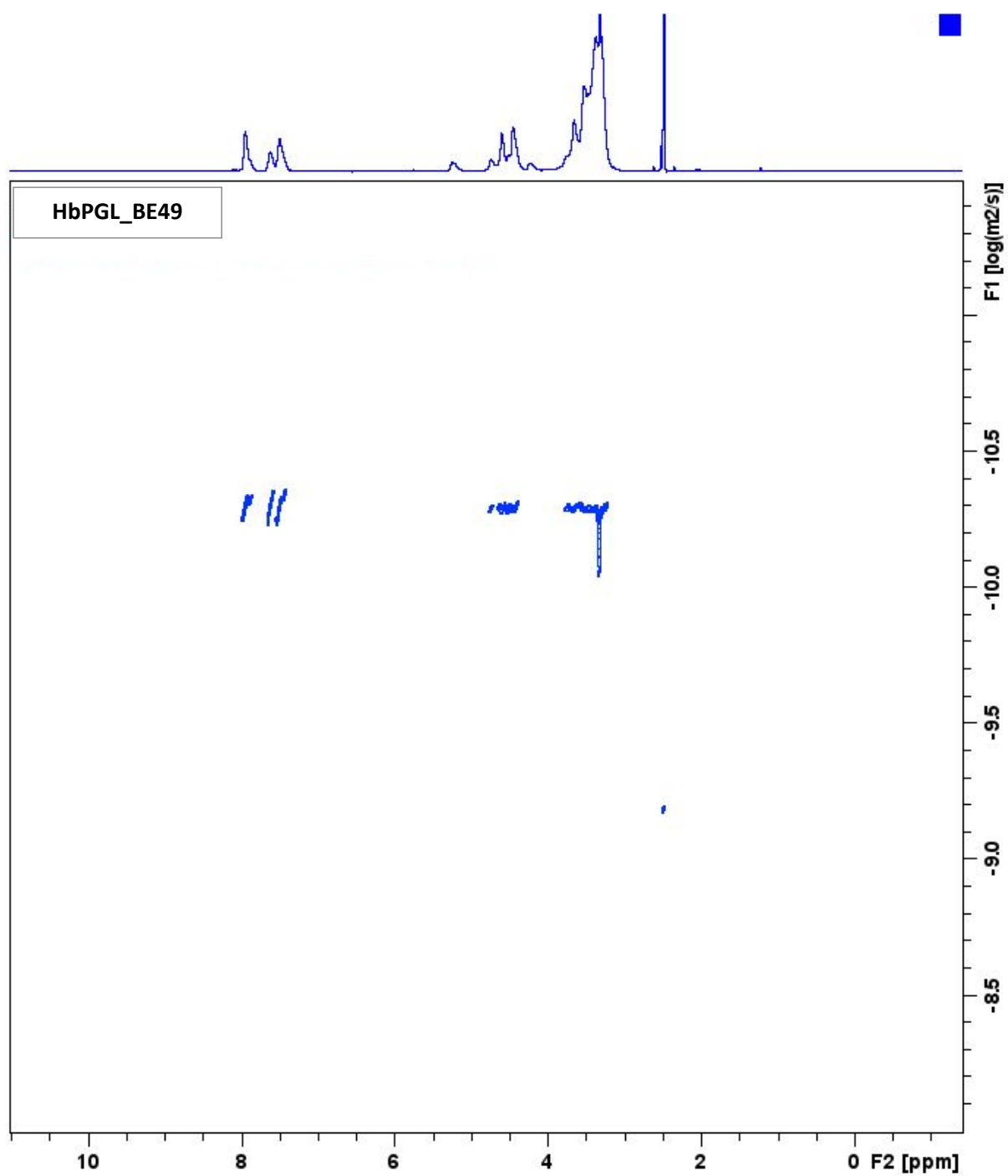


Figure S35. ^1H DOSY NMR spectrum of HbPGL_BE49 recorded in DMSO- d_6 .

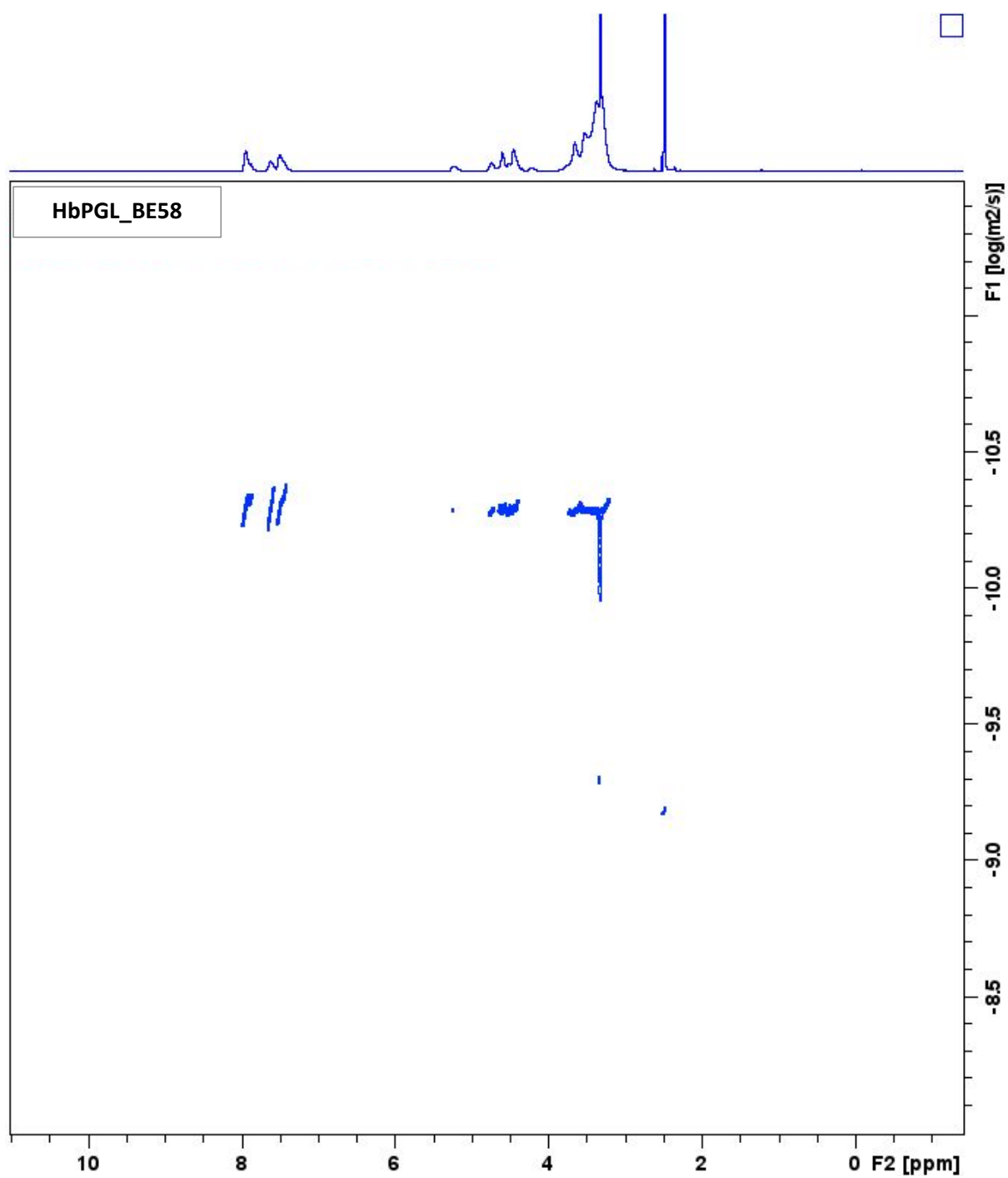


Figure S36. ^1H DOSY NMR spectrum of HbPGL_BE58 recorded in DMSO-d_6 .

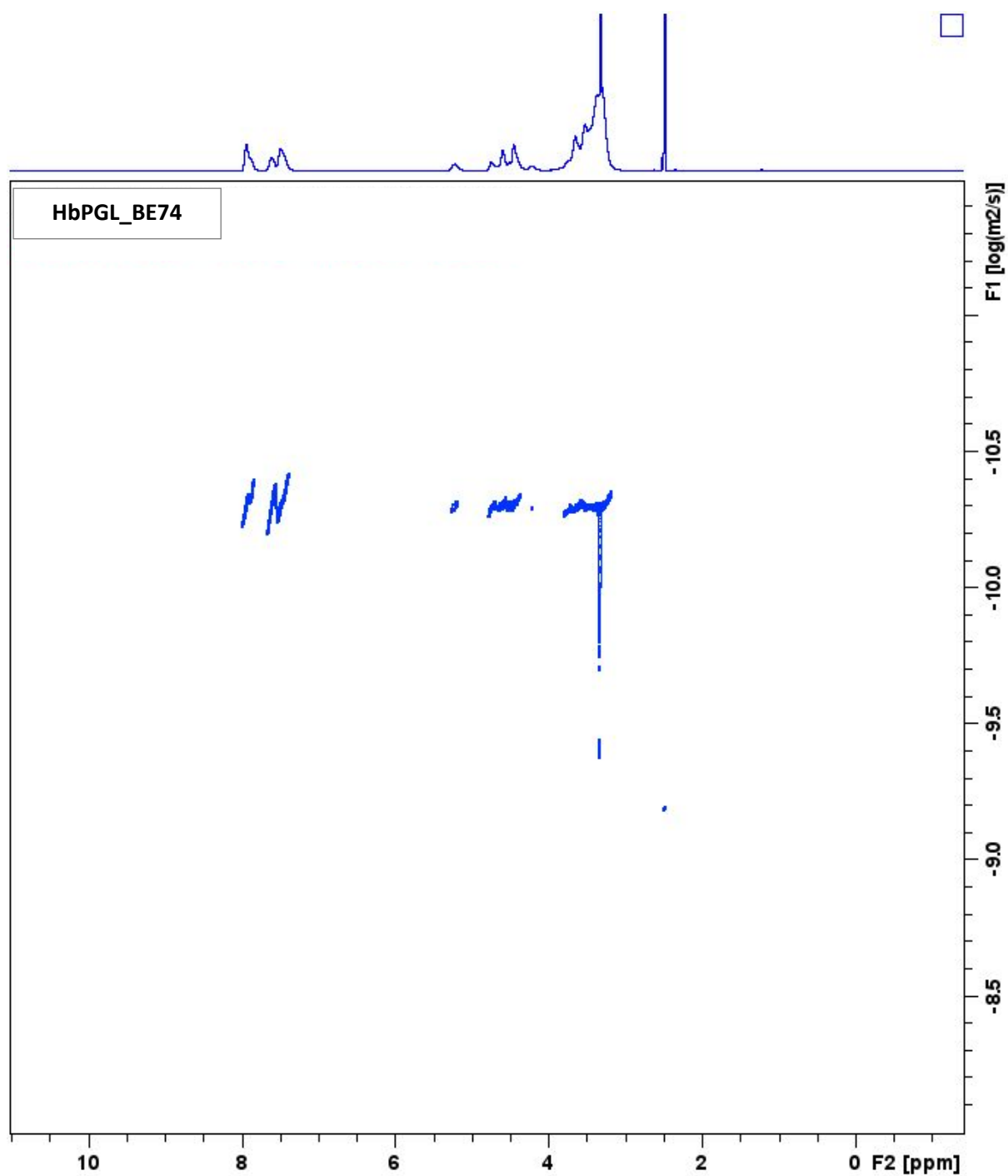


Figure S37. ^1H DOSY NMR spectrum of HbPGL_BE74 recorded in DMSO-d_6 .

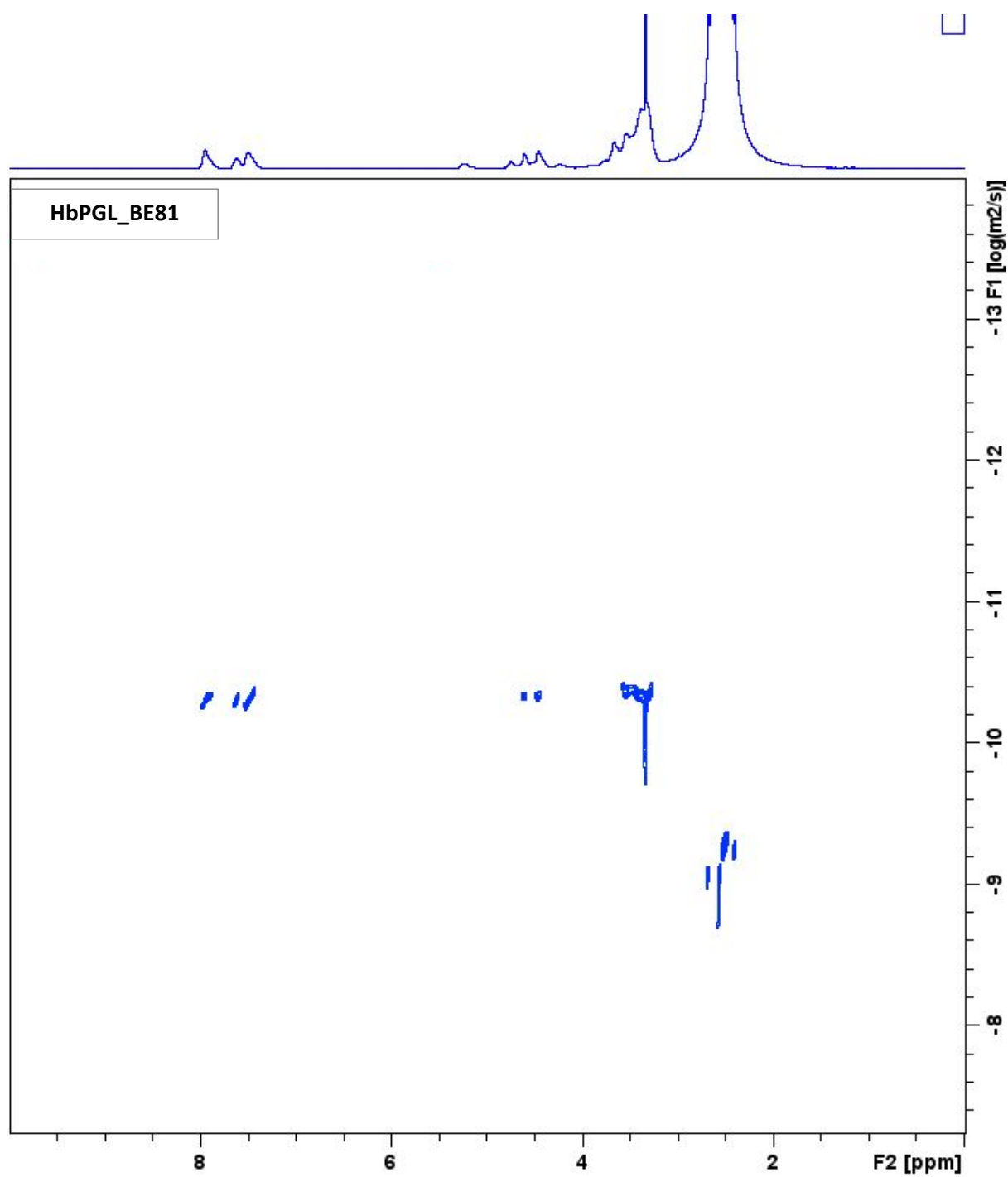


Figure S38. ¹H DOSY NMR spectrum of HbPGL_BE81 recorded in DMSO-d₆.

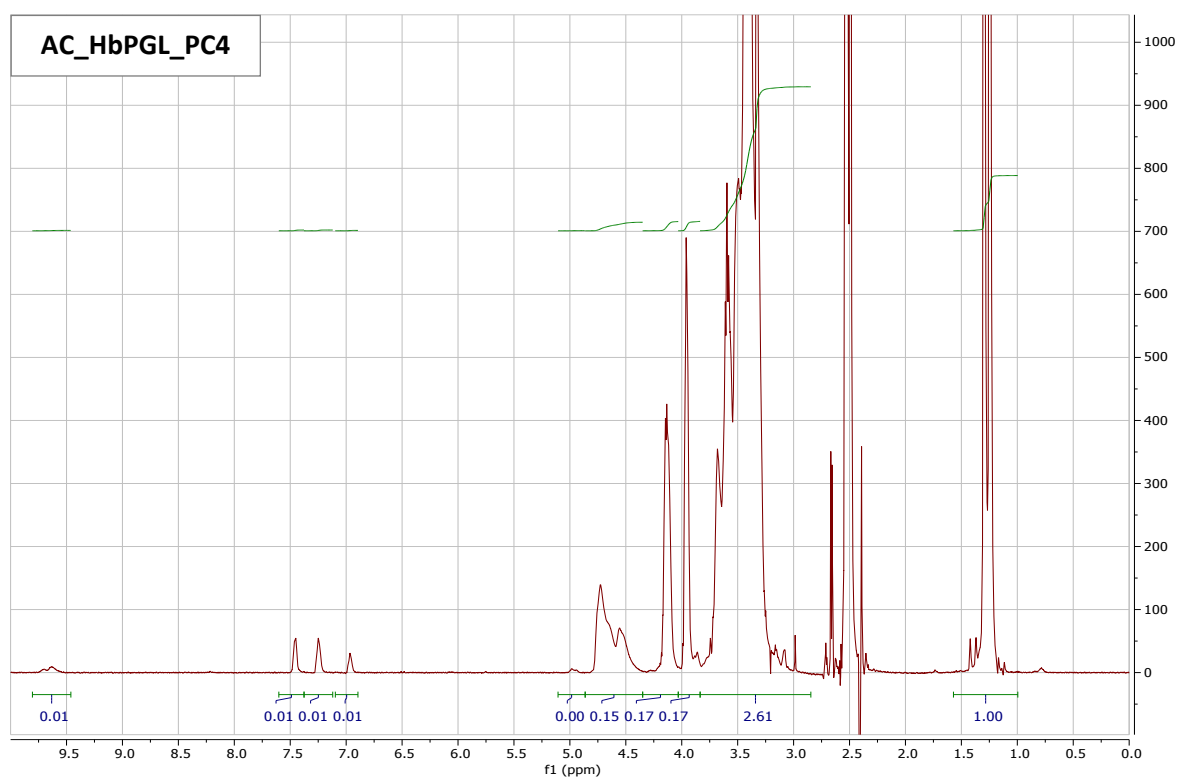


Figure S39. ^1H NMR spectrum of AC_HbPGL_PC4 recorded in DMSO-d_6 .

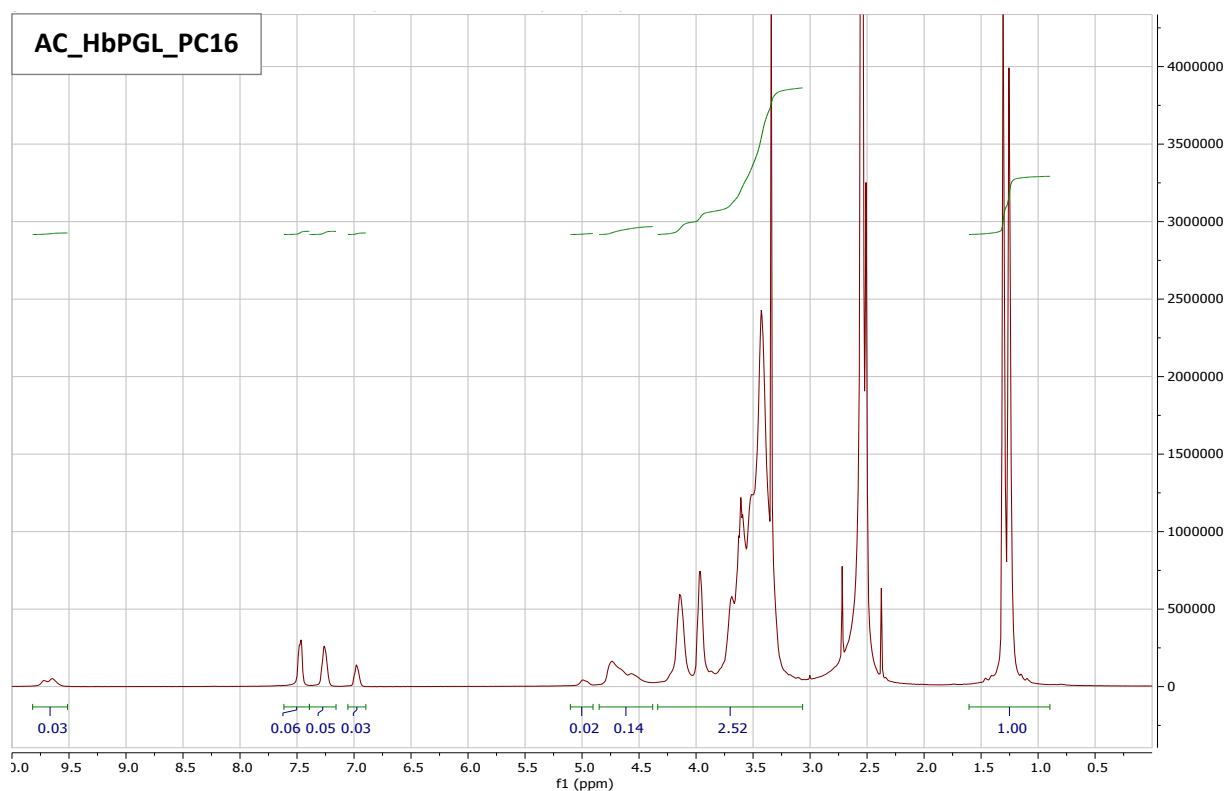


Figure S40. ^1H NMR spectrum of AC_HbPGL_PC16 recorded in DMSO-d_6 .

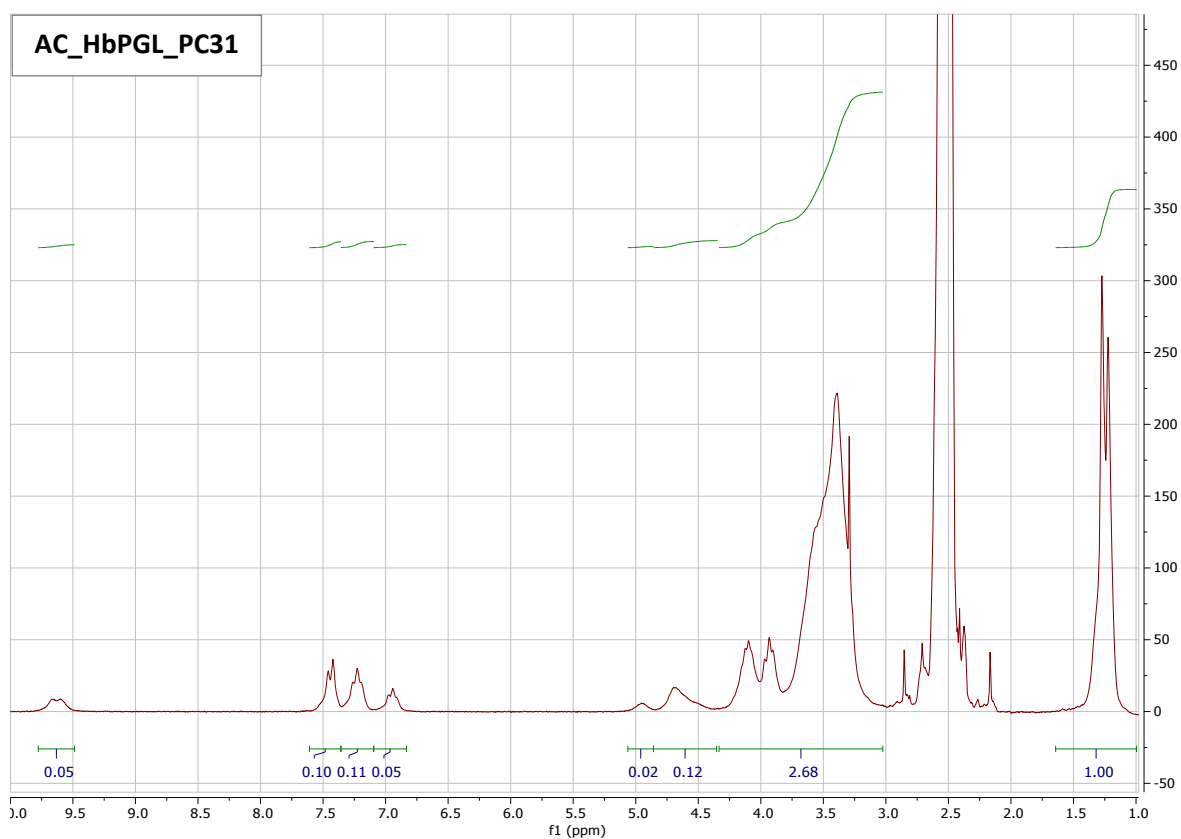


Figure S41. ^1H NMR spectrum of AC_HbPGL_PC31 recorded in DMSO-d_6 .

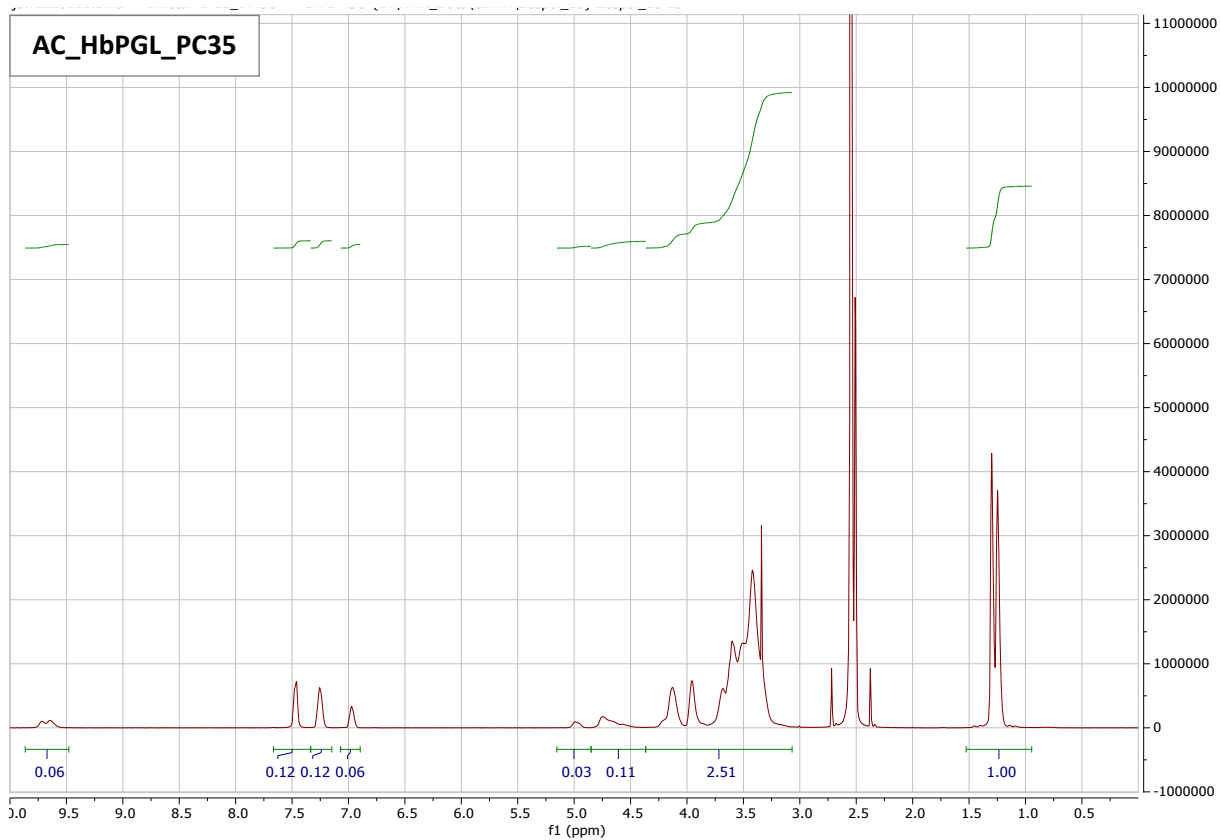


Figure S42. ^1H NMR spectrum of AC_HbPGL_PC35 recorded in DMSO-d_6 .

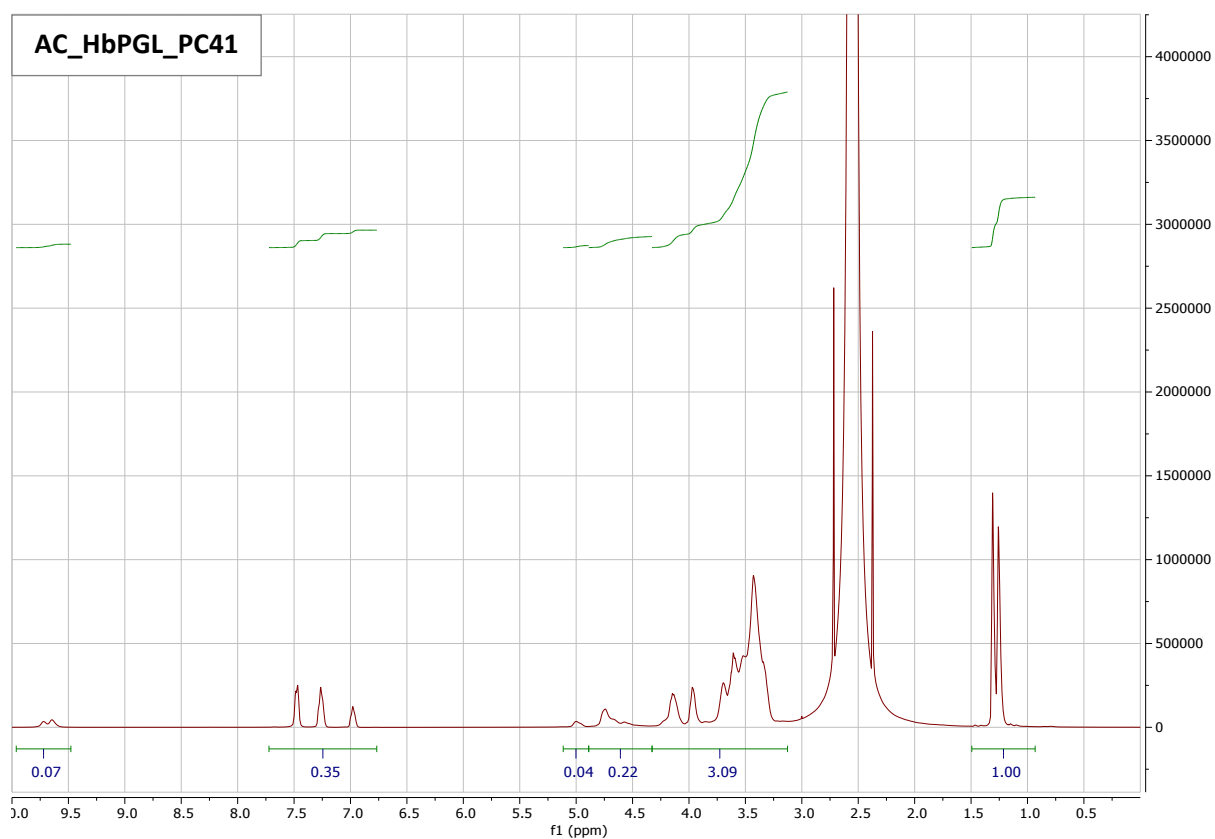


Figure S43. ^1H NMR spectrum of AC_HbPGL_PC41 recorded in DMSO- d_6 .

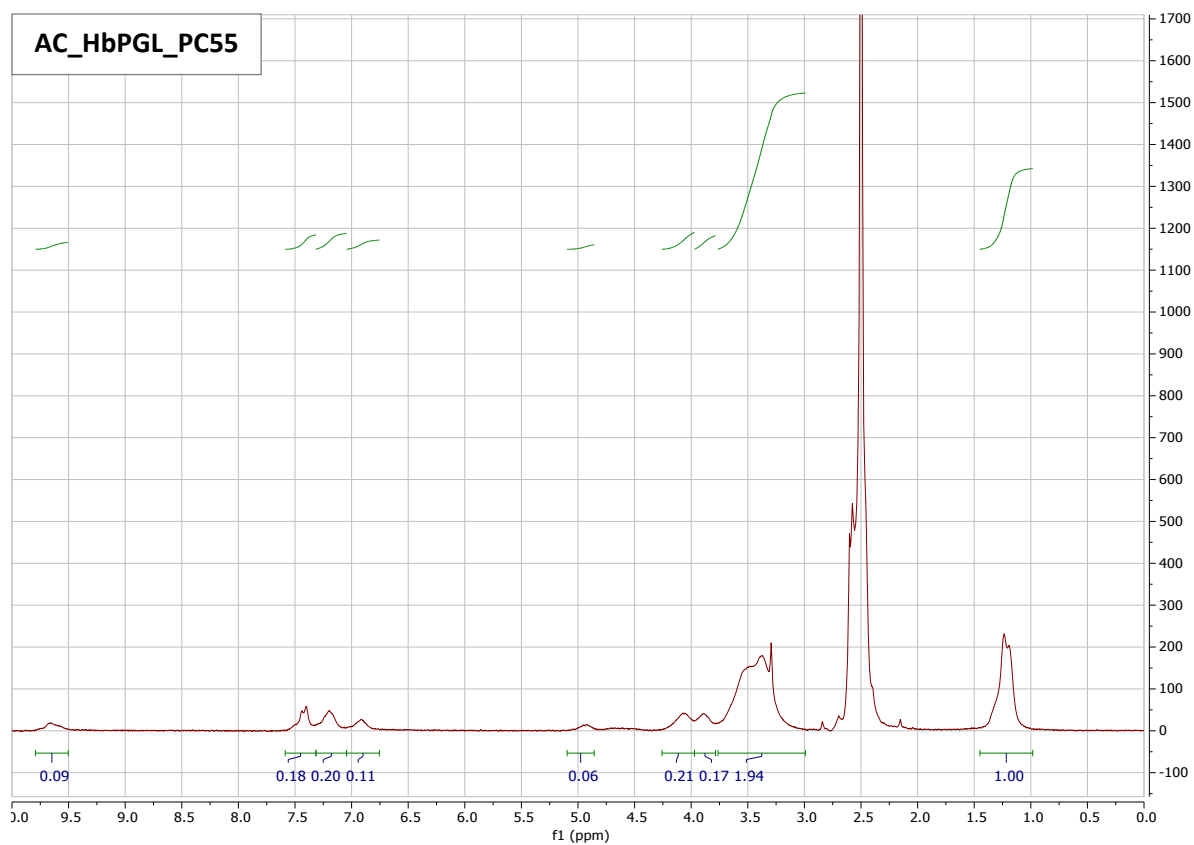


Figure S44. ^1H NMR spectrum of AC_HbPGL_PC55 recorded in DMSO- d_6 .

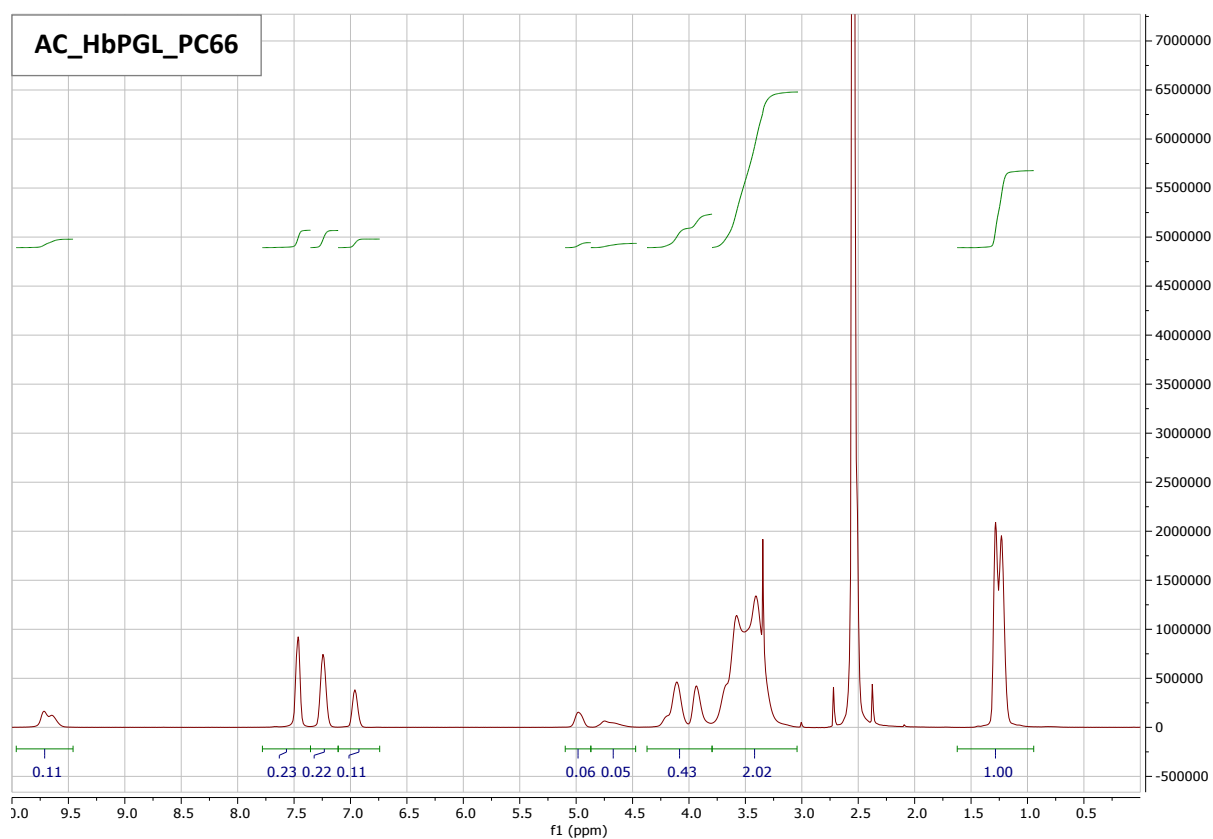


Figure S45. ^1H NMR spectrum of AC_HbPGL_PC66 recorded in DMSO- d_6 .

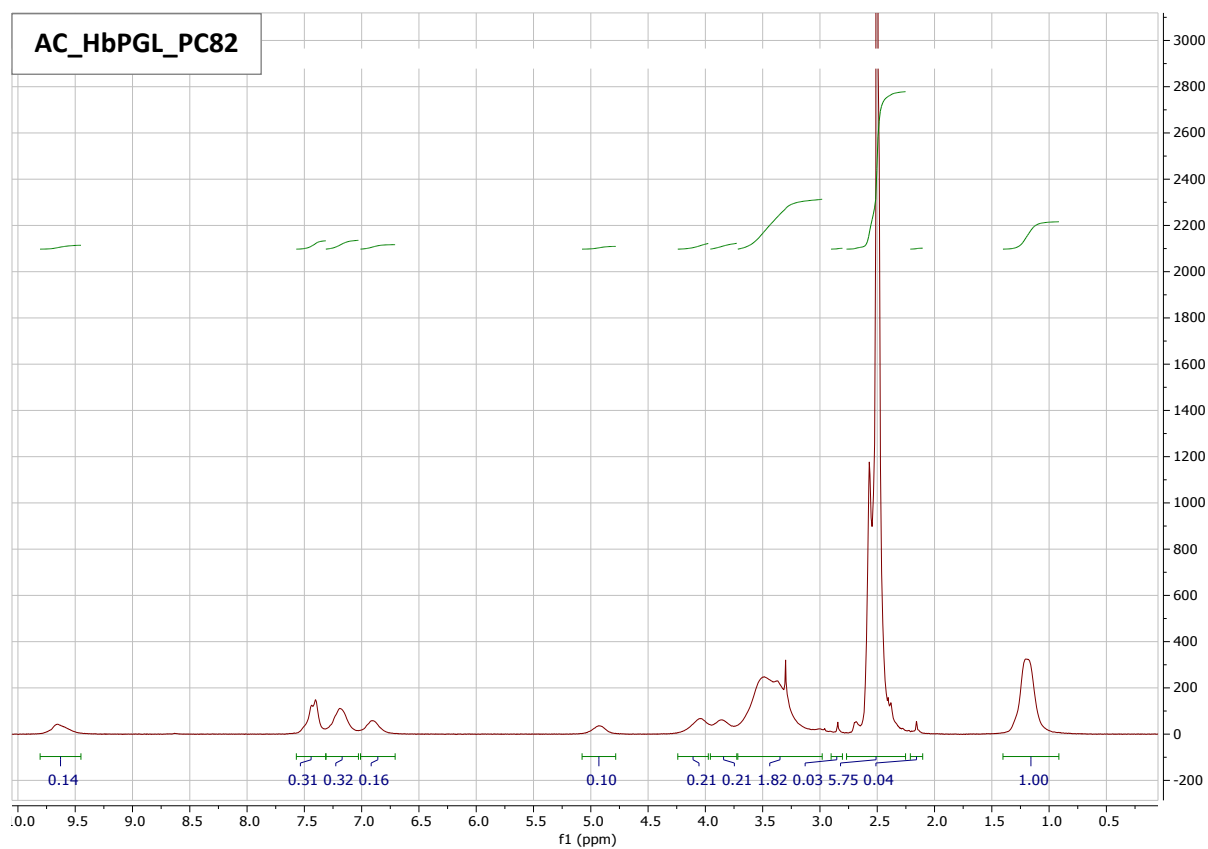


Figure S46. ^1H NMR spectrum of AC_HbPGL_PC82 recorded in DMSO- d_6 .

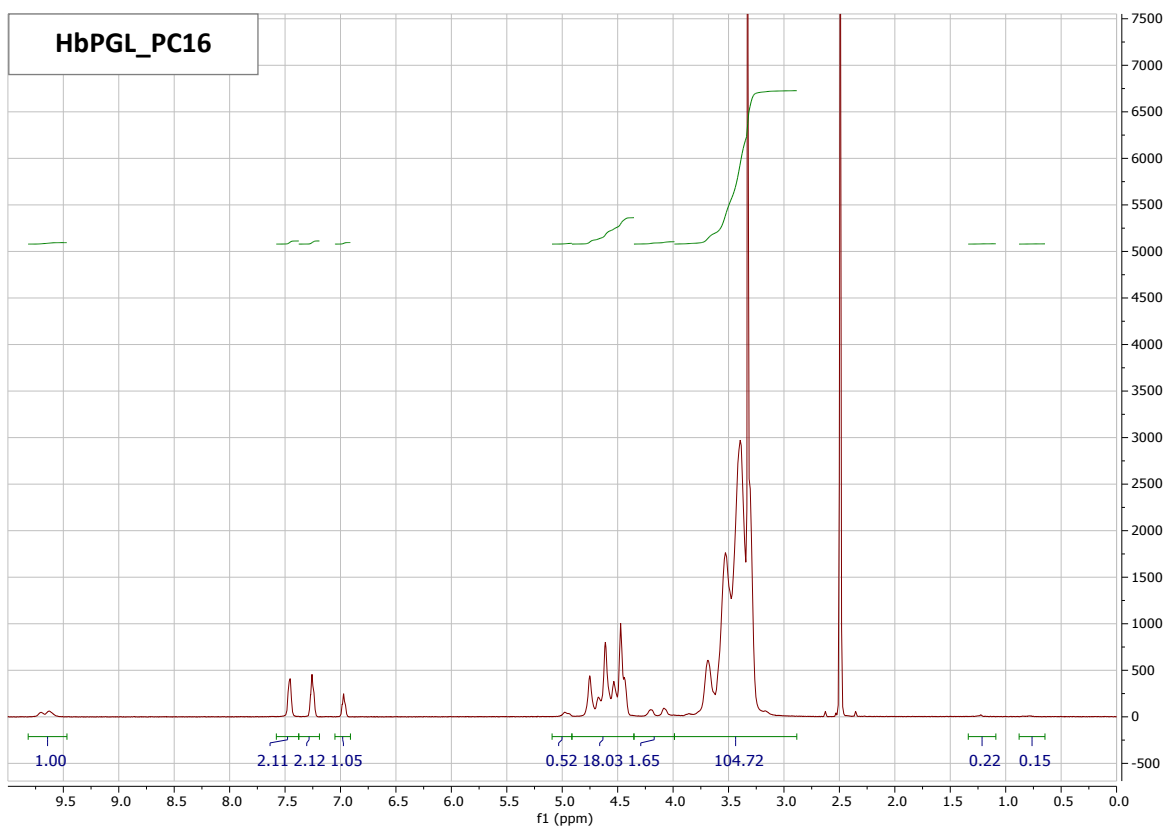


Figure S49. ^1H NMR spectrum of HbPGL_PC16 recorded in DMSO- d_6 .

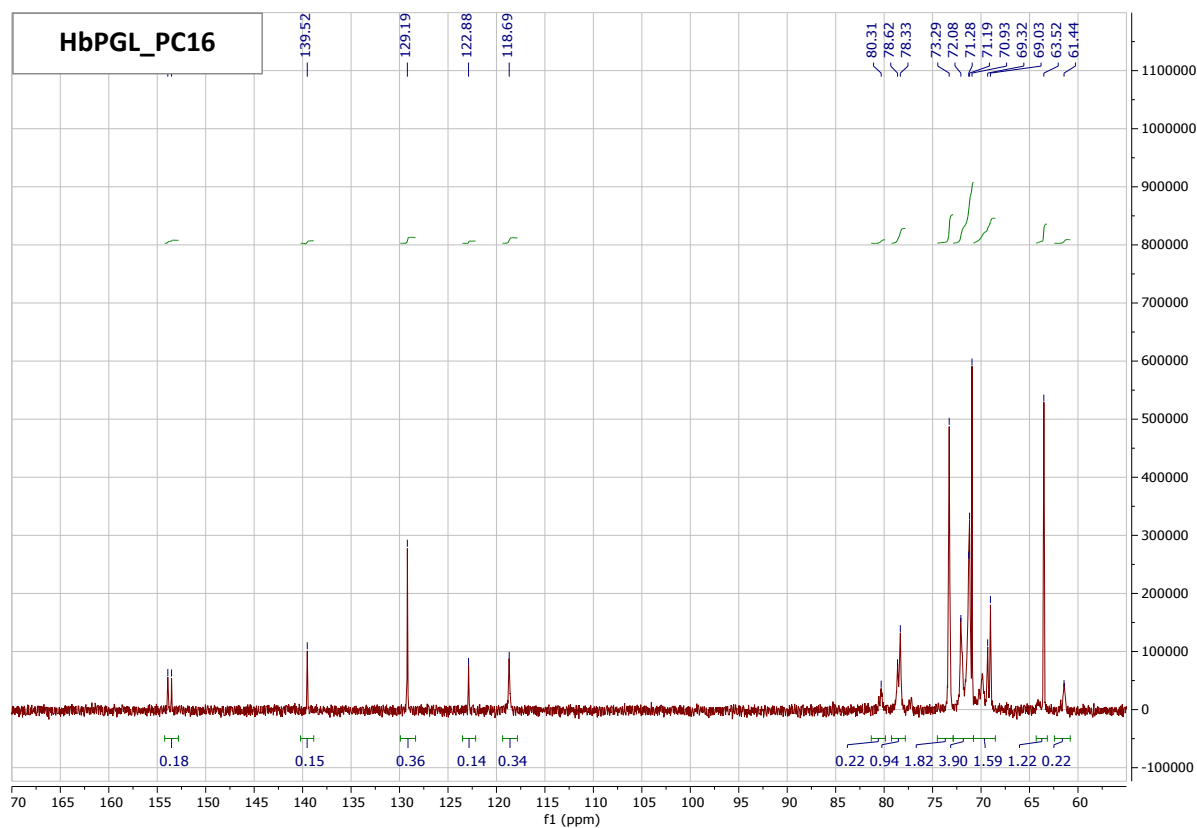


Figure S50. ^{13}C INVGATED NMR spectrum of HbPGL_PC16 recorded in DMSO- d_6 .

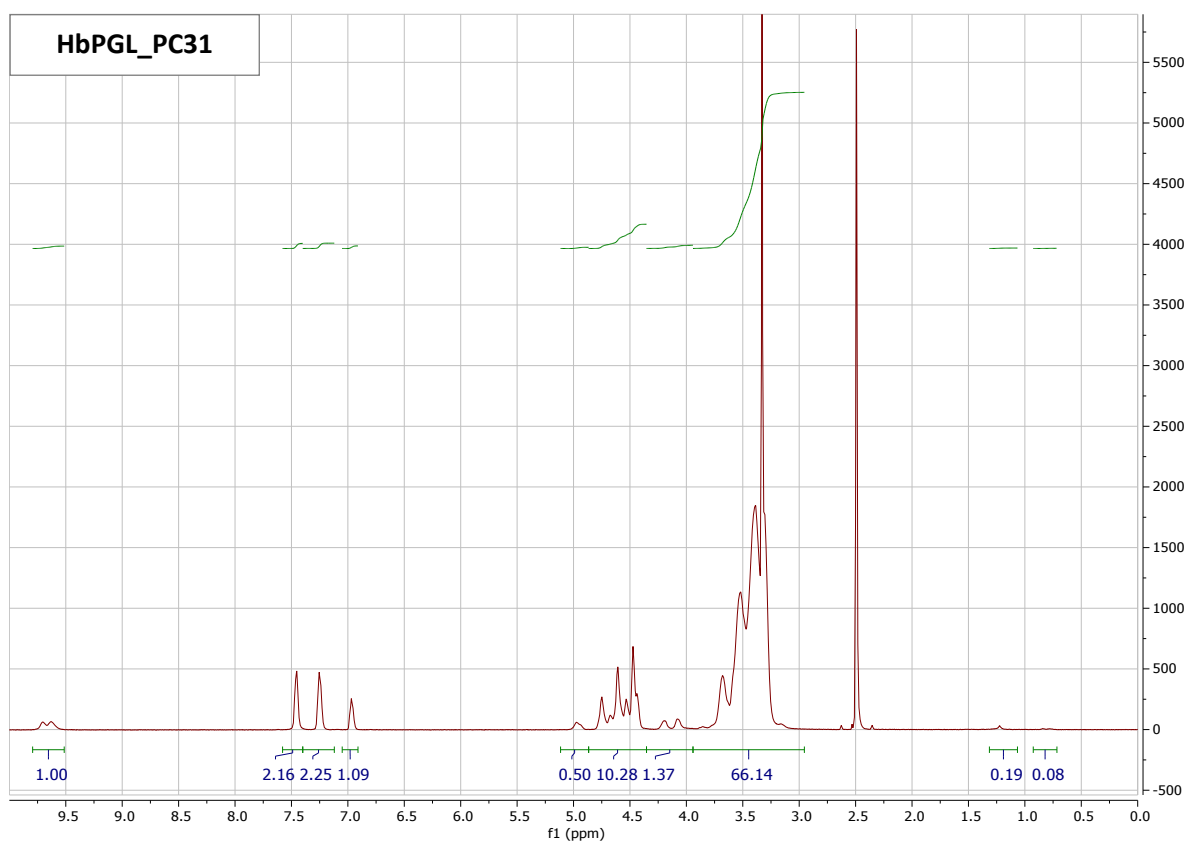


Figure S51. ^1H NMR spectrum of HbPGL_PC31 recorded in DMSO- d_6 .

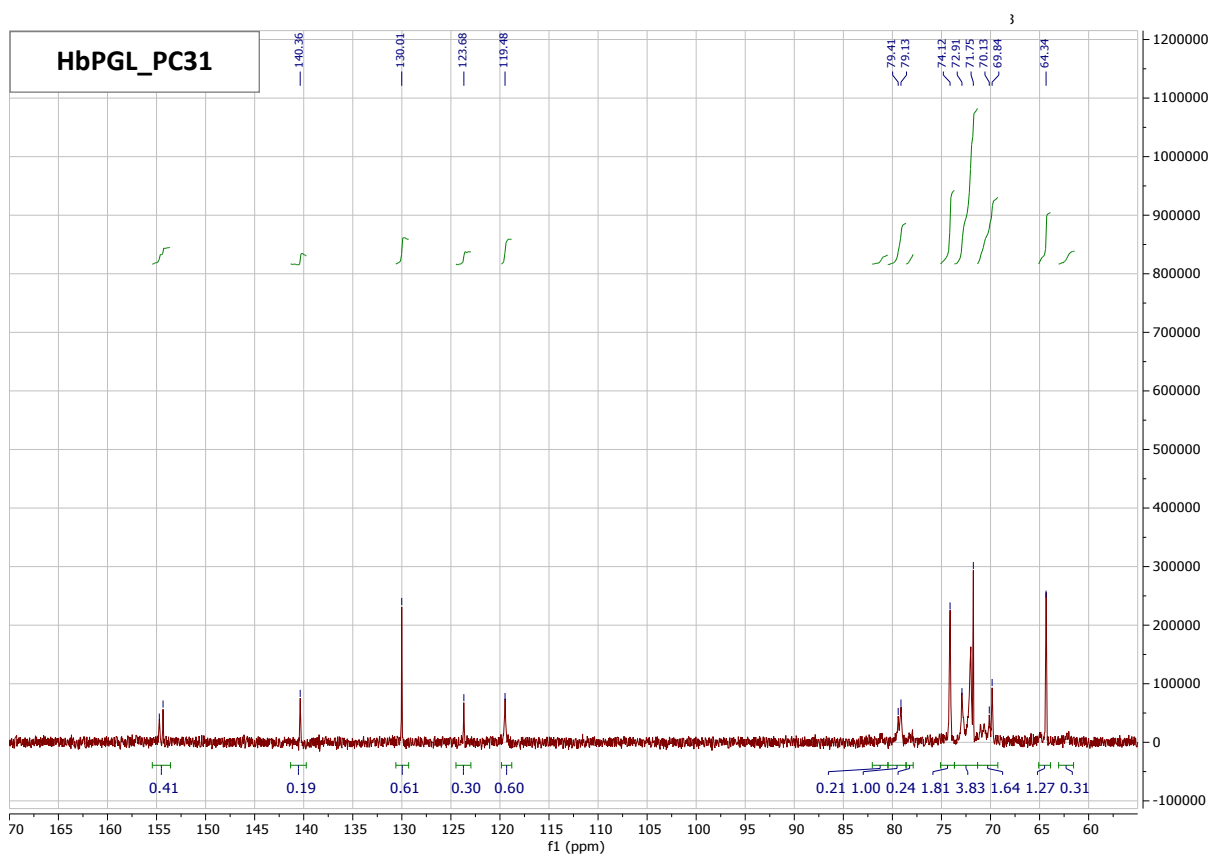


Figure S52. ^{13}C INVGATED NMR spectrum of HbPGL_PC31 recorded in DMSO- d_6 .

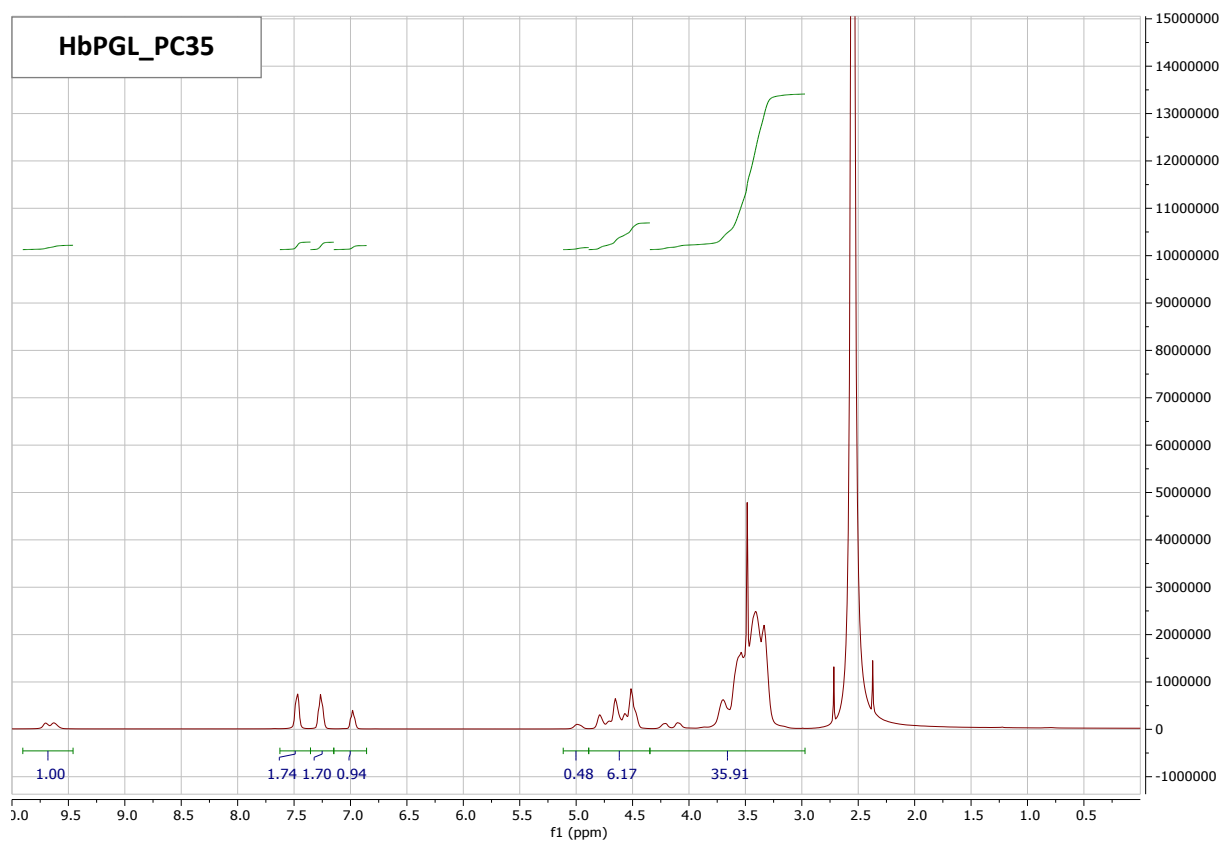


Figure S53. ^1H NMR spectrum of HbPGL_PC35 recorded in DMSO- d_6 .

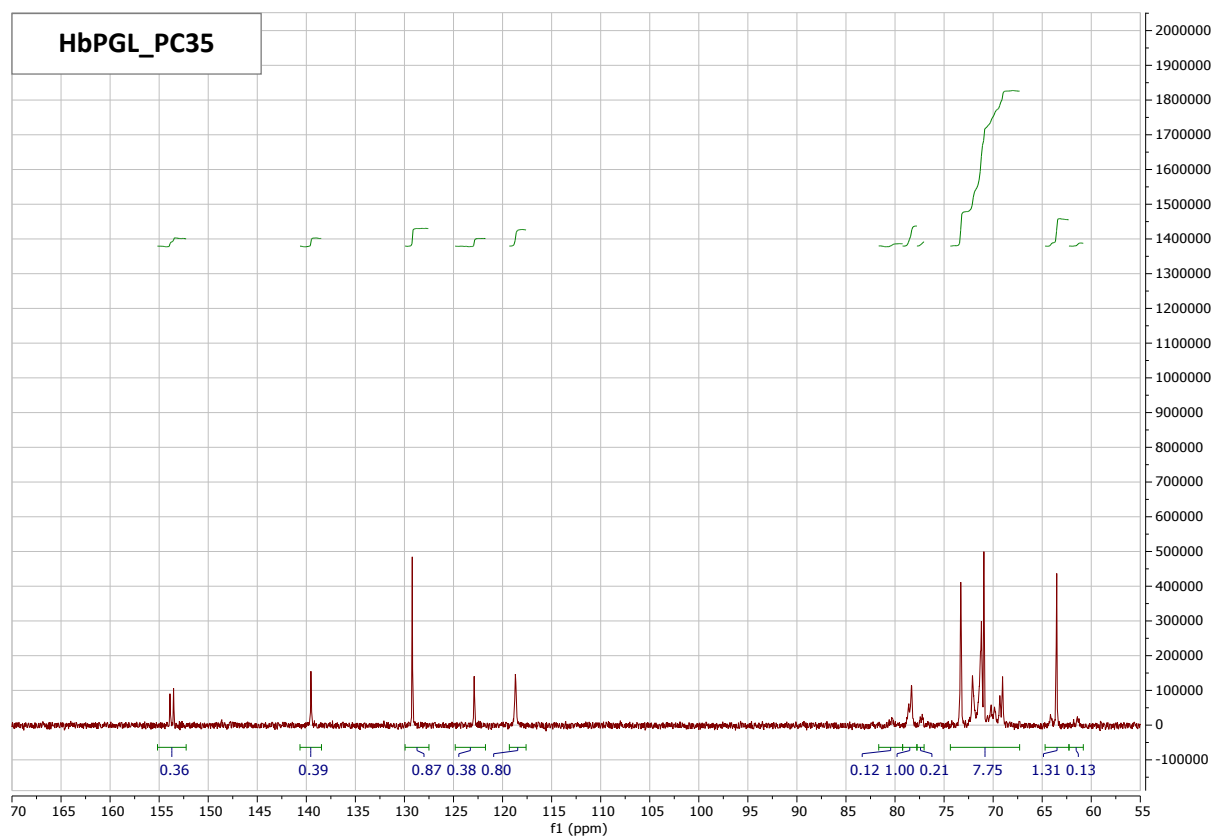


Figure S54. ^{13}C INVGATED NMR spectrum of HbPGL_PC35 recorded in DMSO- d_6 .

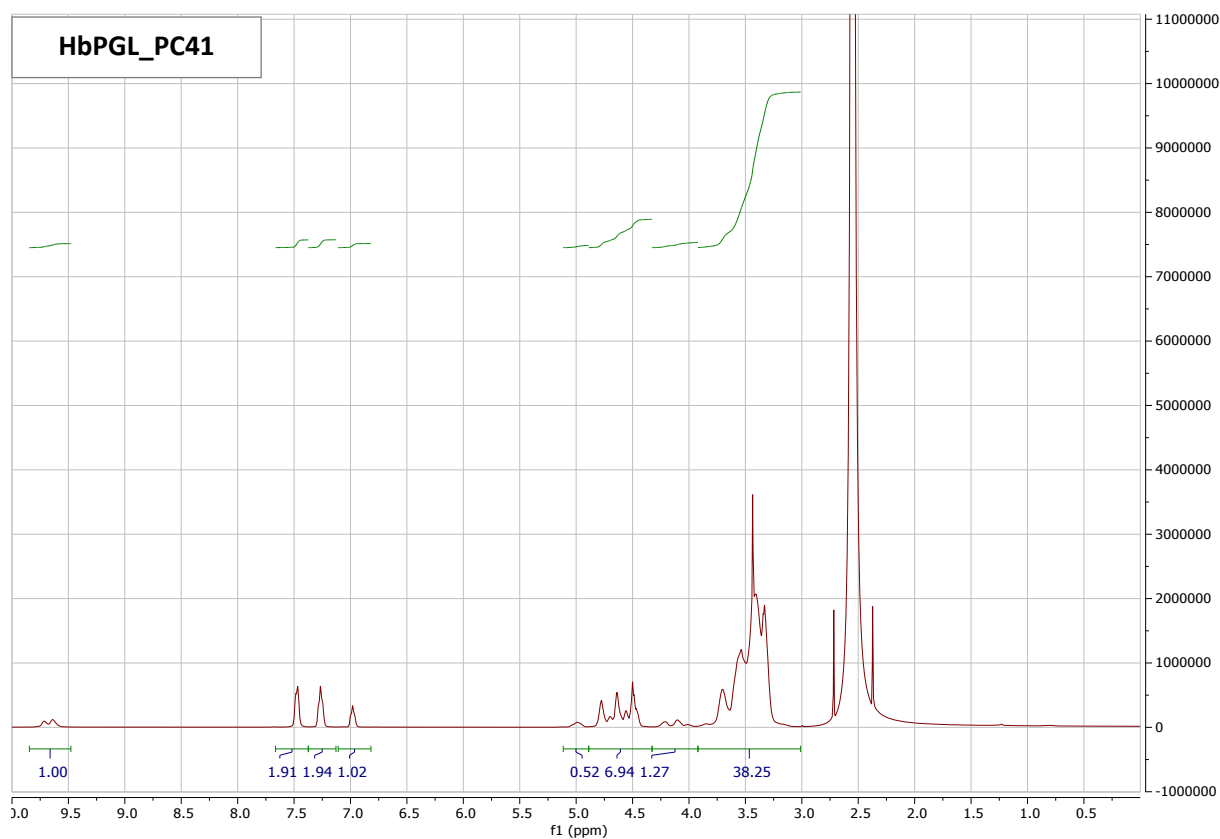
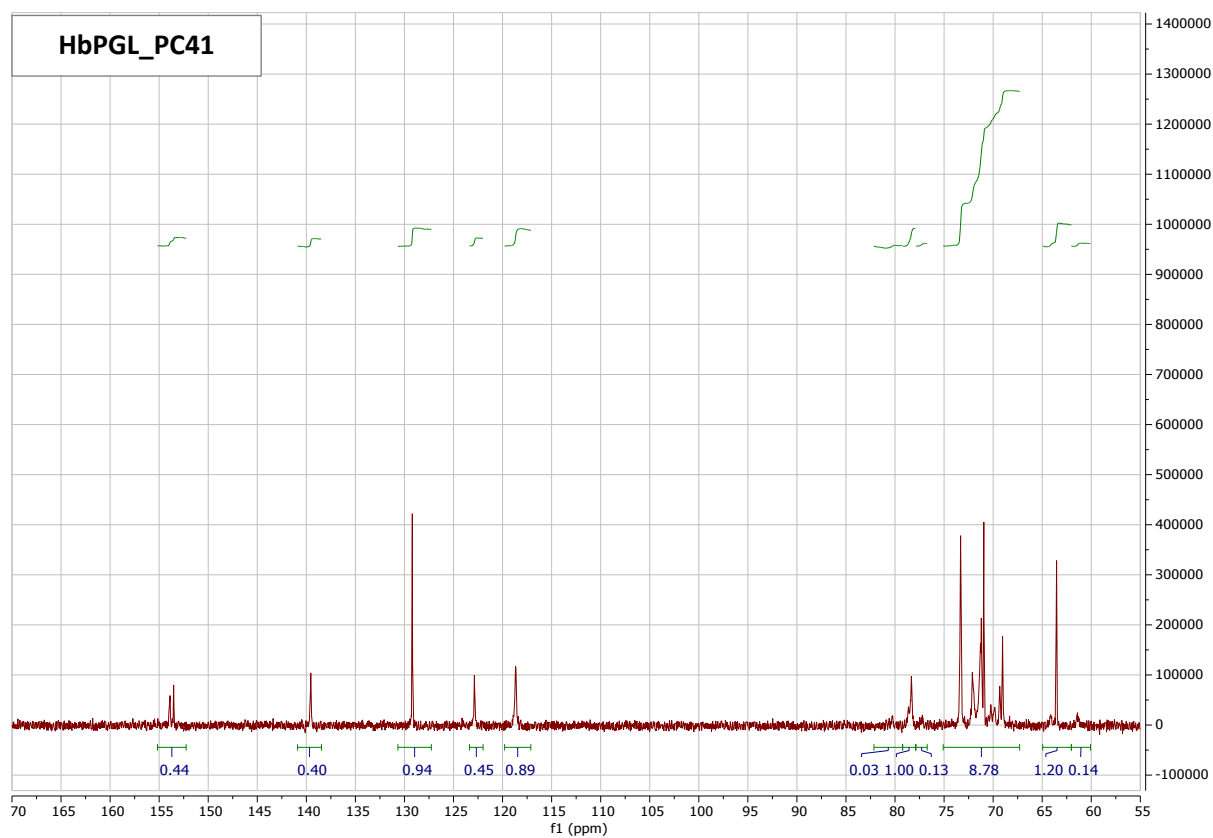


Figure S55. ^1H NMR spectrum of HbPGL_PC41 recorded in DMSO-d_6 .



FigureS56. ^{13}C INVGATED NMR spectrum of HbPGL_PC41 recorded in DMSO-d_6 .

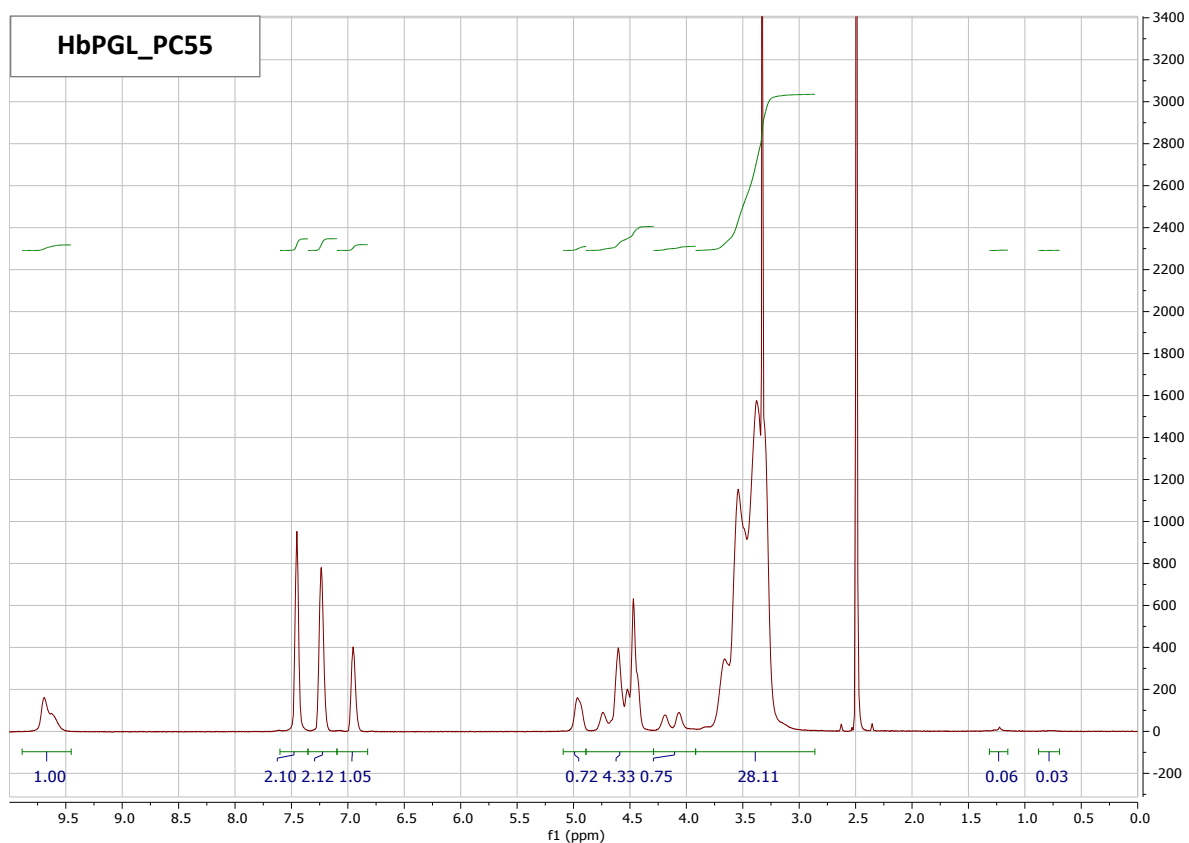


Figure S57. ^1H NMR spectrum of HbPGL_PC55 recorded in DMSO- d_6 .

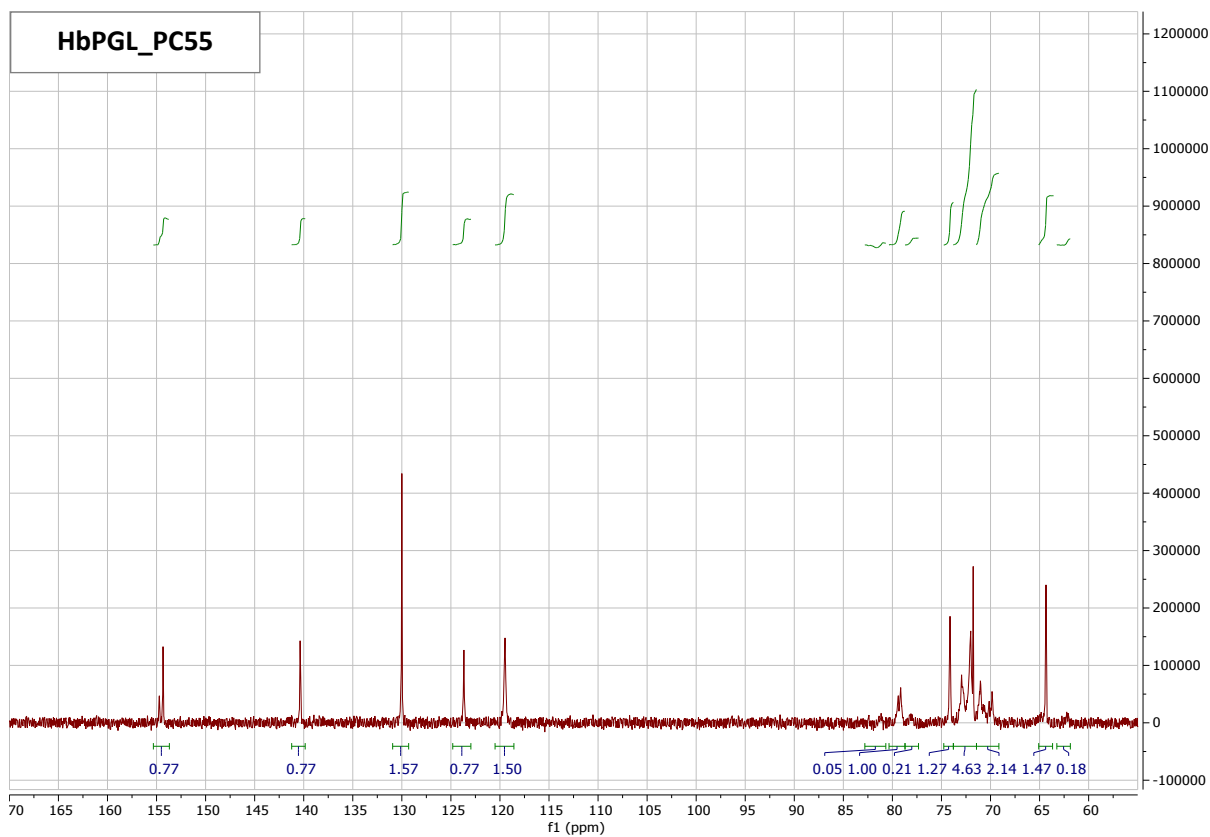


Figure S58. ^{13}C INVGATED NMR spectrum of HbPGL_PC55 recorded in DMSO- d_6 .

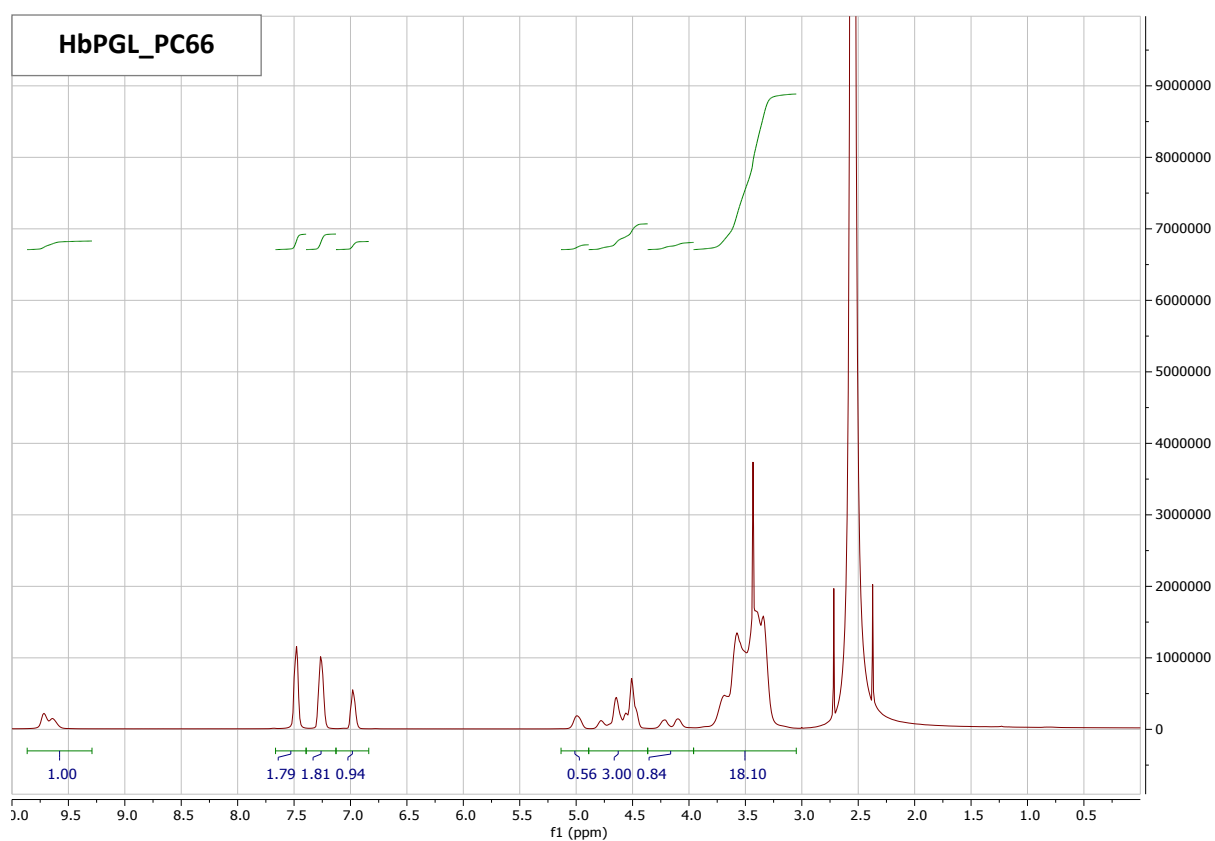


Figure S59. ^1H NMR spectrum of HbPGL_PC66 recorded in DMSO-d_6 .

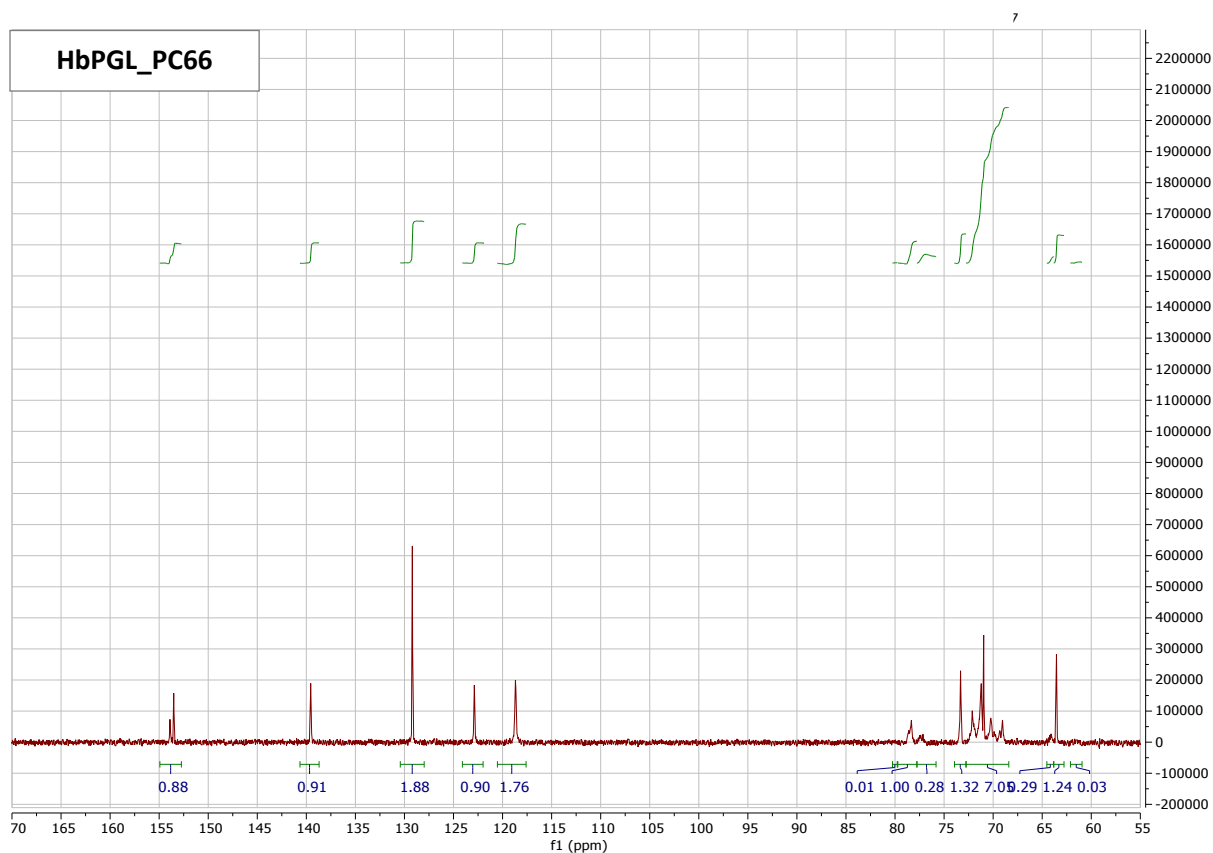


Figure S60. ^{13}C INVGATED NMR spectrum of HbPGL_PC66 recorded in DMSO-d_6 .

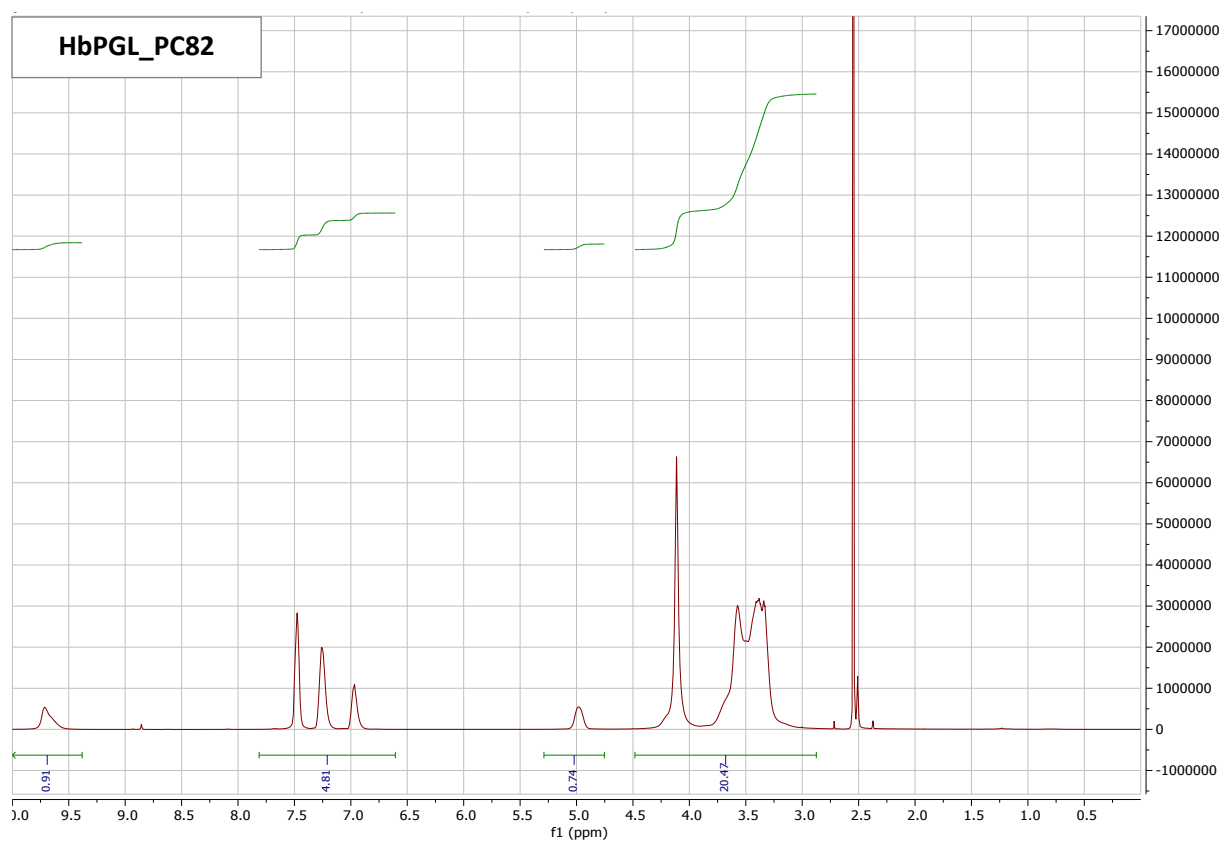


Figure S61. ^1H NMR spectrum of HbPGL_PC82 recorded in DMSO-d_6 .

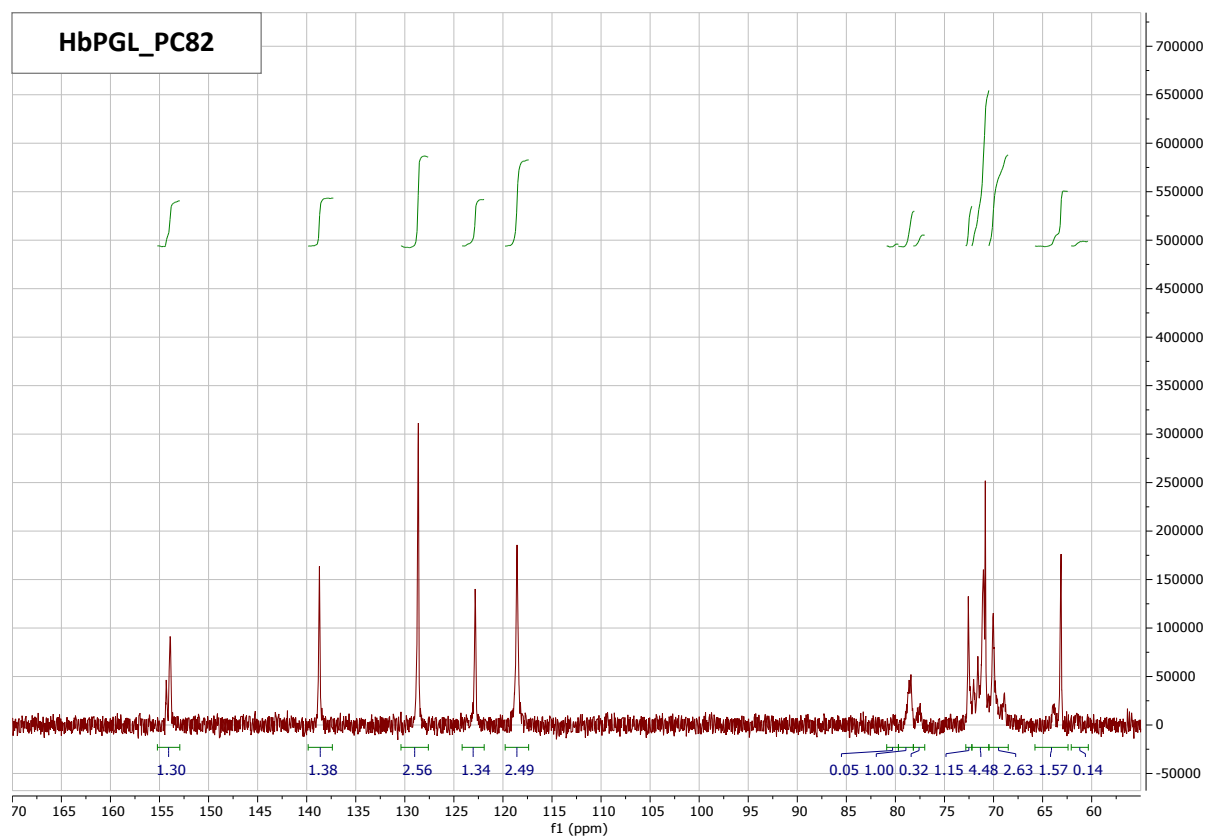


Figure S62. ^{13}C INVGATED NMR spectrum of HbPGL_PC82 recorded in DMSO-d_6 .

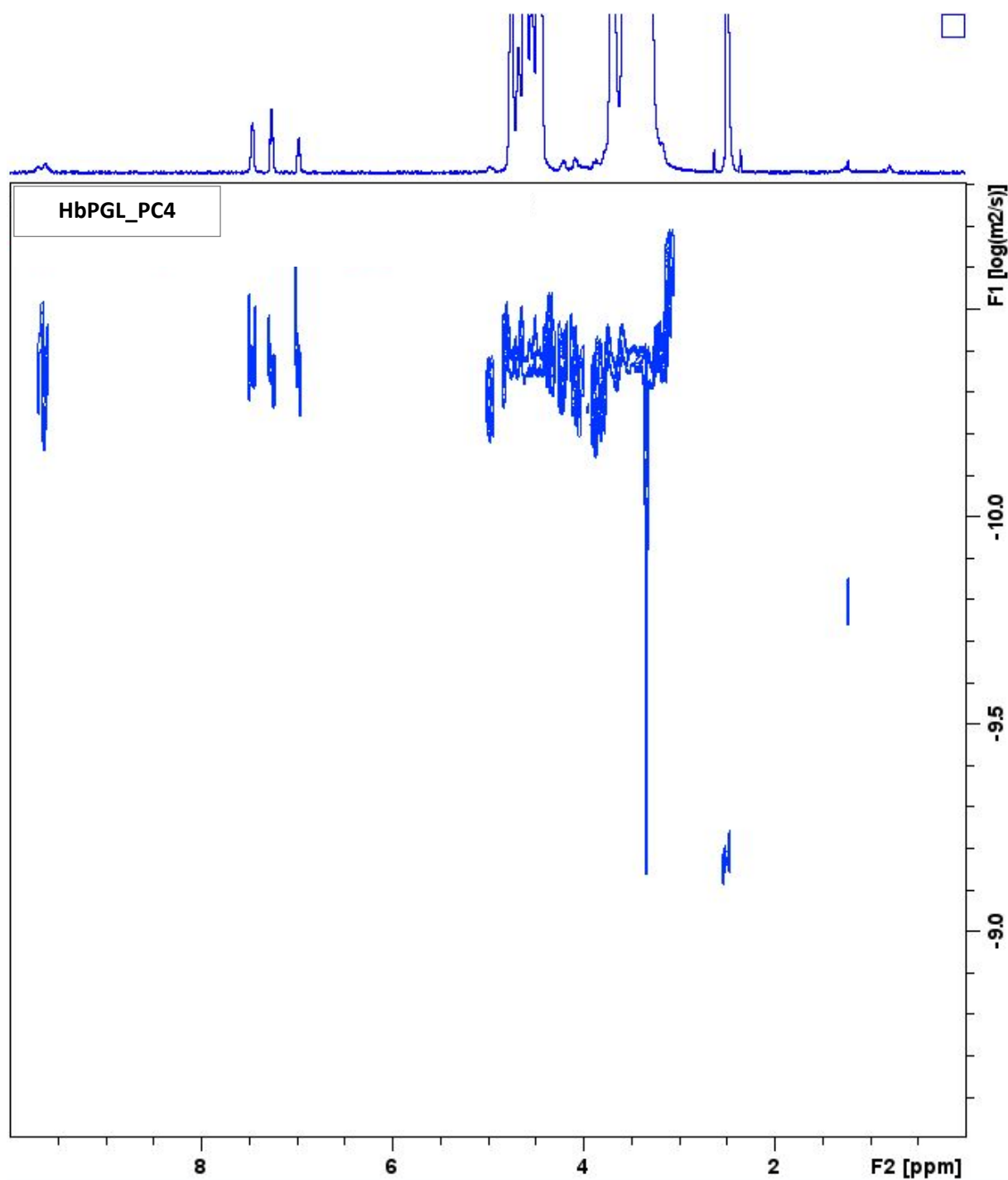


Figure S63. ¹H DOSY NMR spectrum of HbPGL_PC4 recorded in DMSO-d₆.

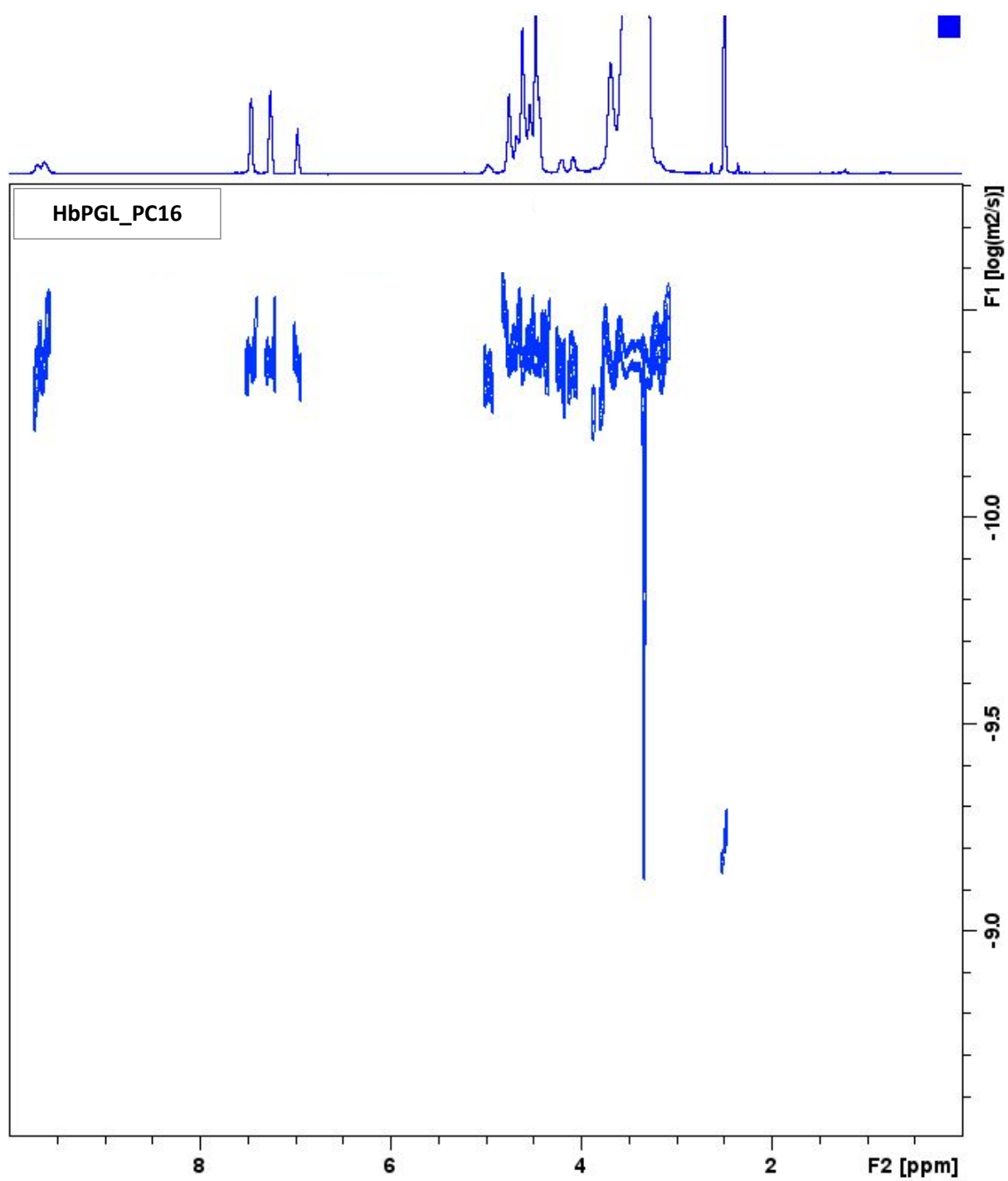


Figure S64. ¹H DOSY NMR spectrum of HbPGL_PC16 recorded in DMSO-d₆.

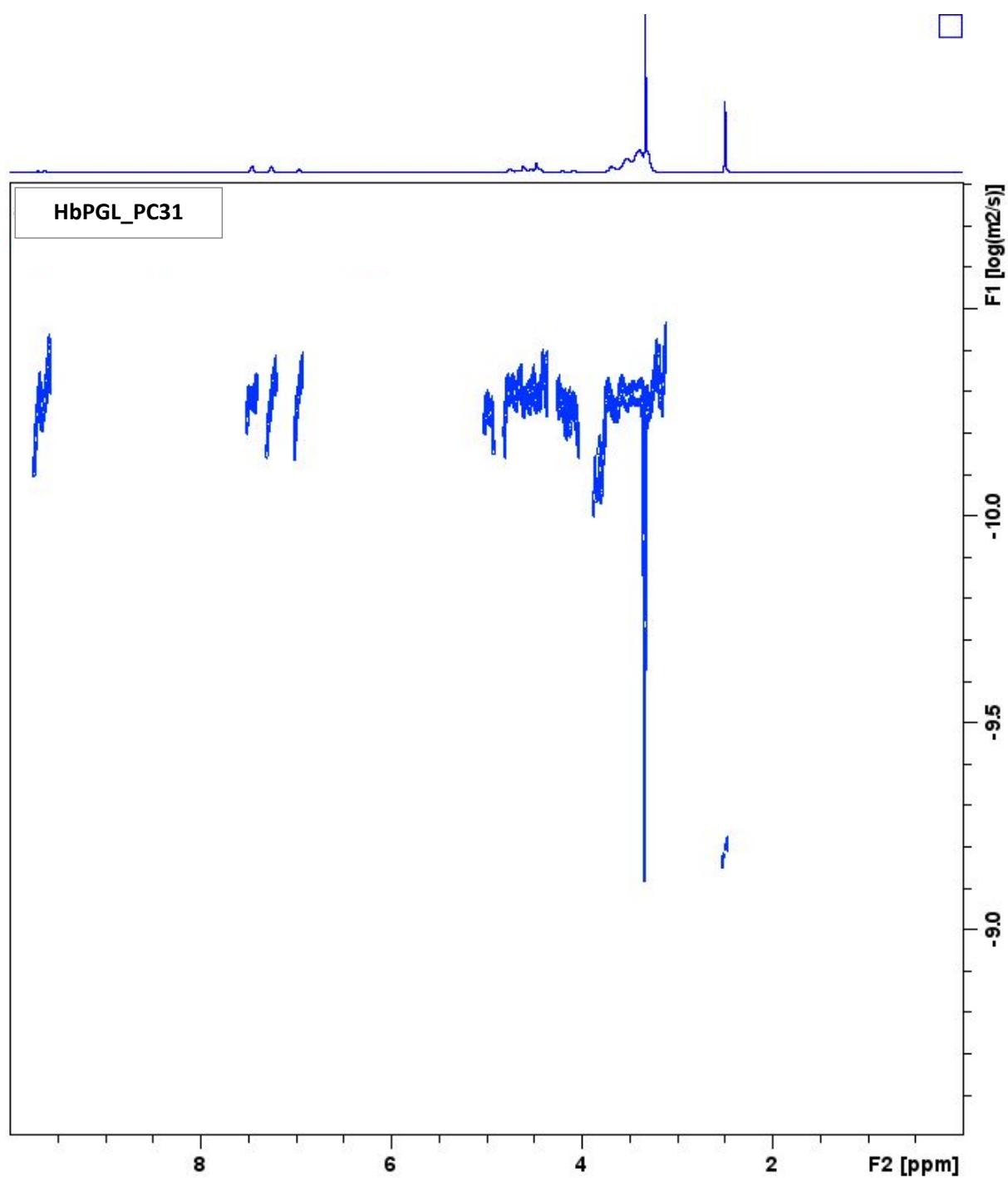


Figure S65. ¹H DOSY NMR spectrum of HbPGL_PC31 recorded in DMSO-d₆.

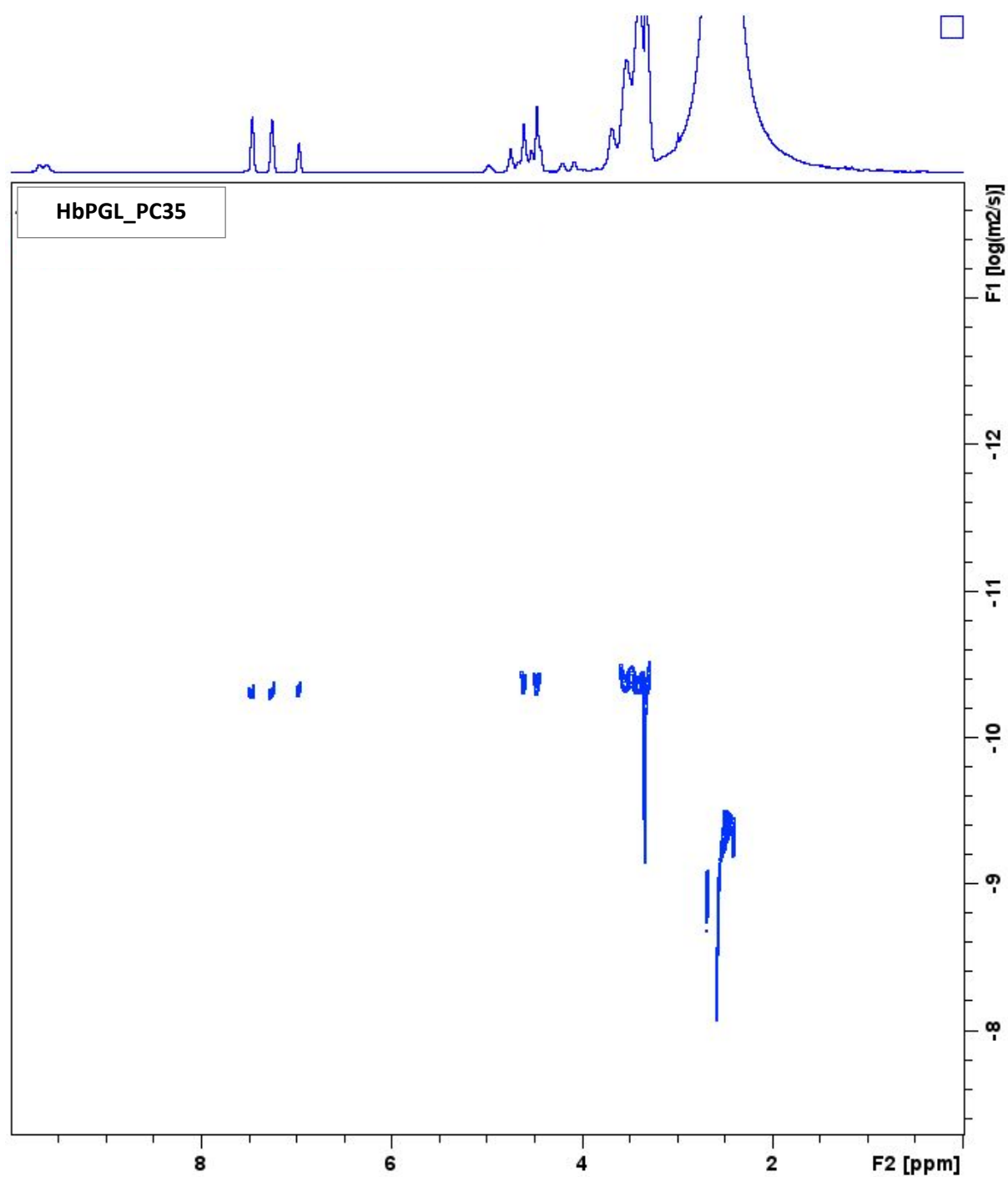


Figure S66. ^1H DOSY NMR spectrum of HbPGL_PC35 recorded in DMSO-d_6 .

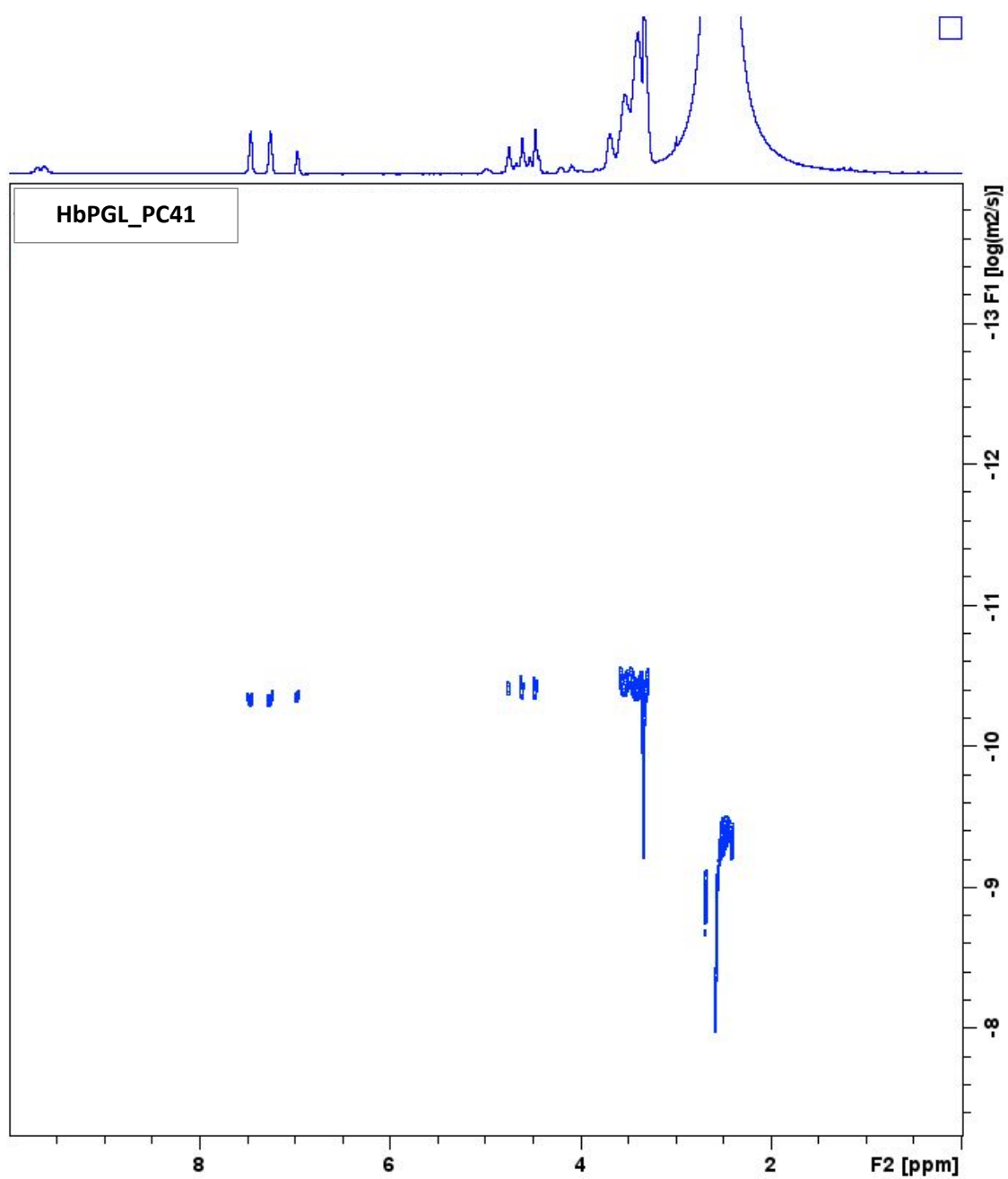


Figure S67. ^1H DOSY NMR spectrum of HbPGL_PC41 recorded in DMSO-d_6 .

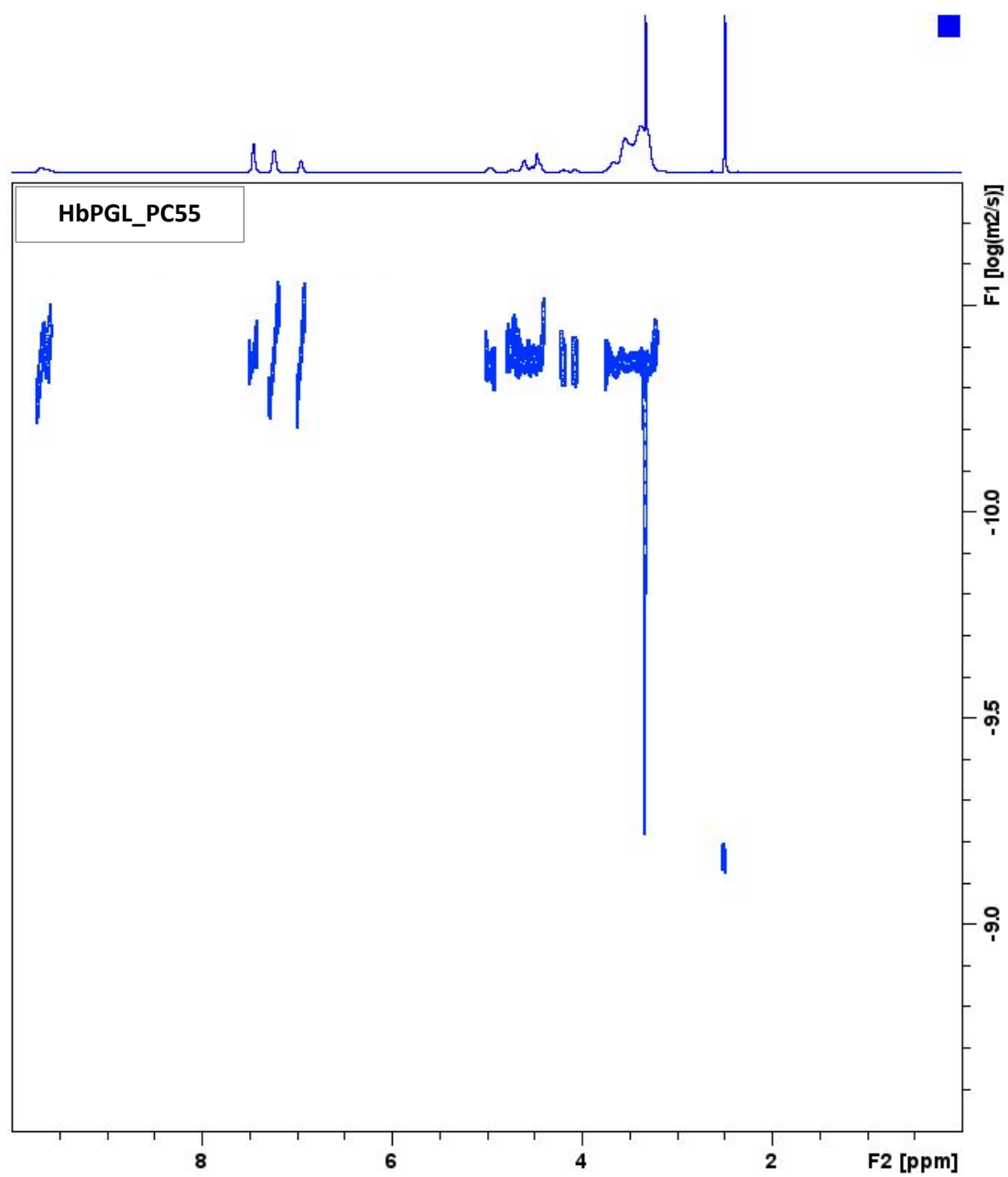


Figure S68. ^1H DOSY NMR spectrum of HbPGL_PC55 recorded in DMSO-d_6 .

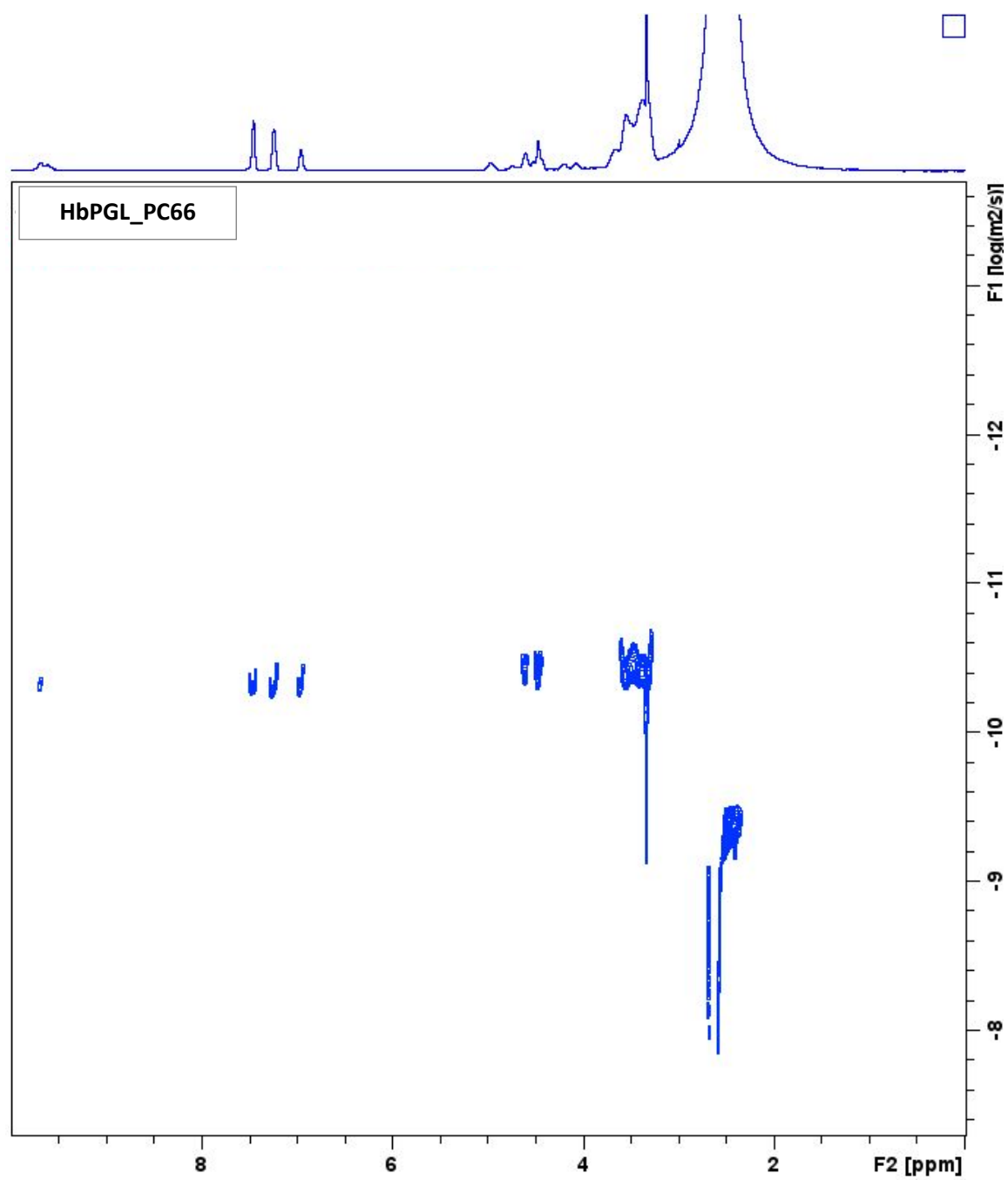


Figure S69. ^1H DOSY NMR spectrum of HbPGL_PC66 recorded in DMSO-d_6 .

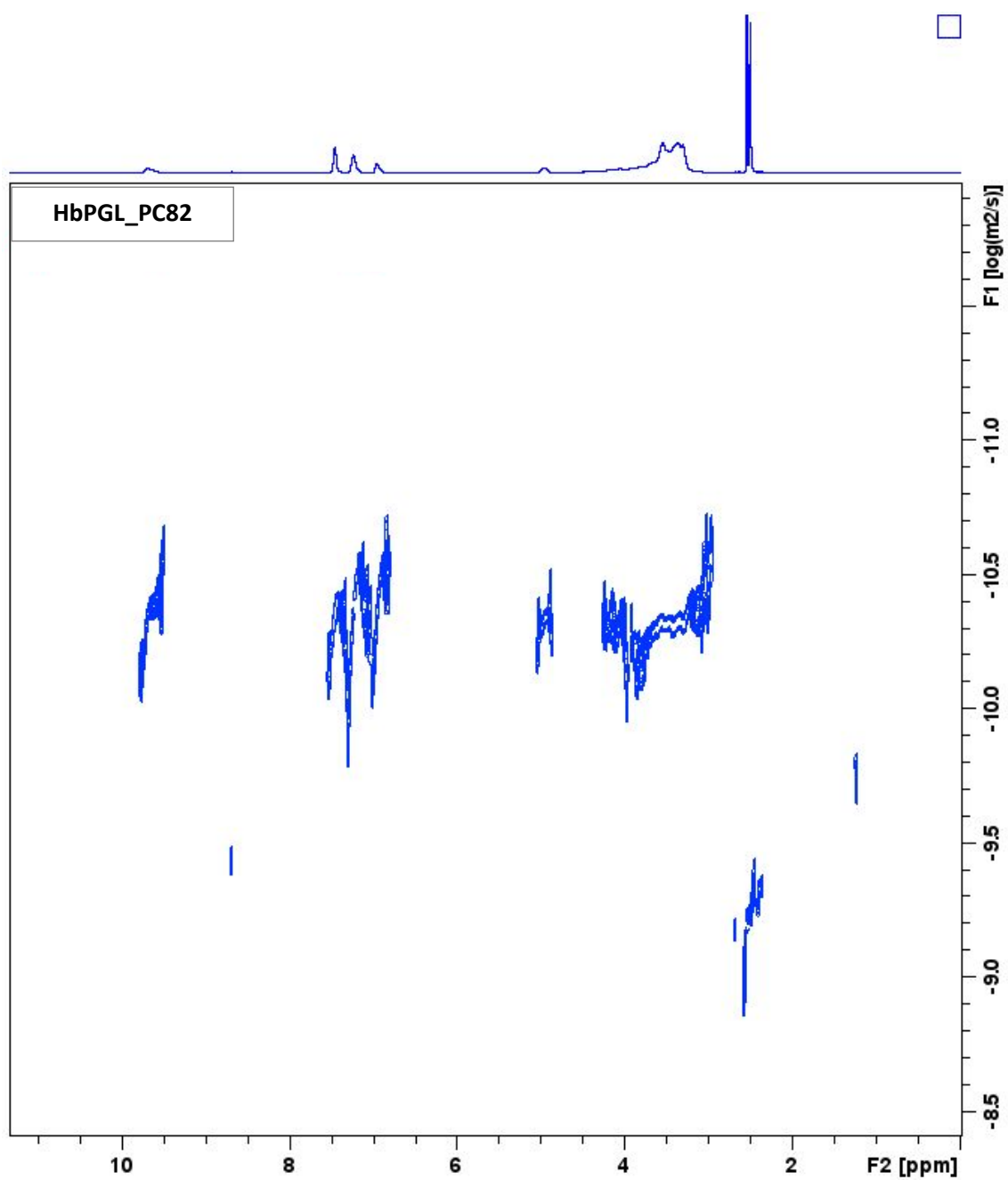


Figure S70. ^1H DOSY NMR spectrum of HbPGL_PC82 recorded in DMSO-d_6 .

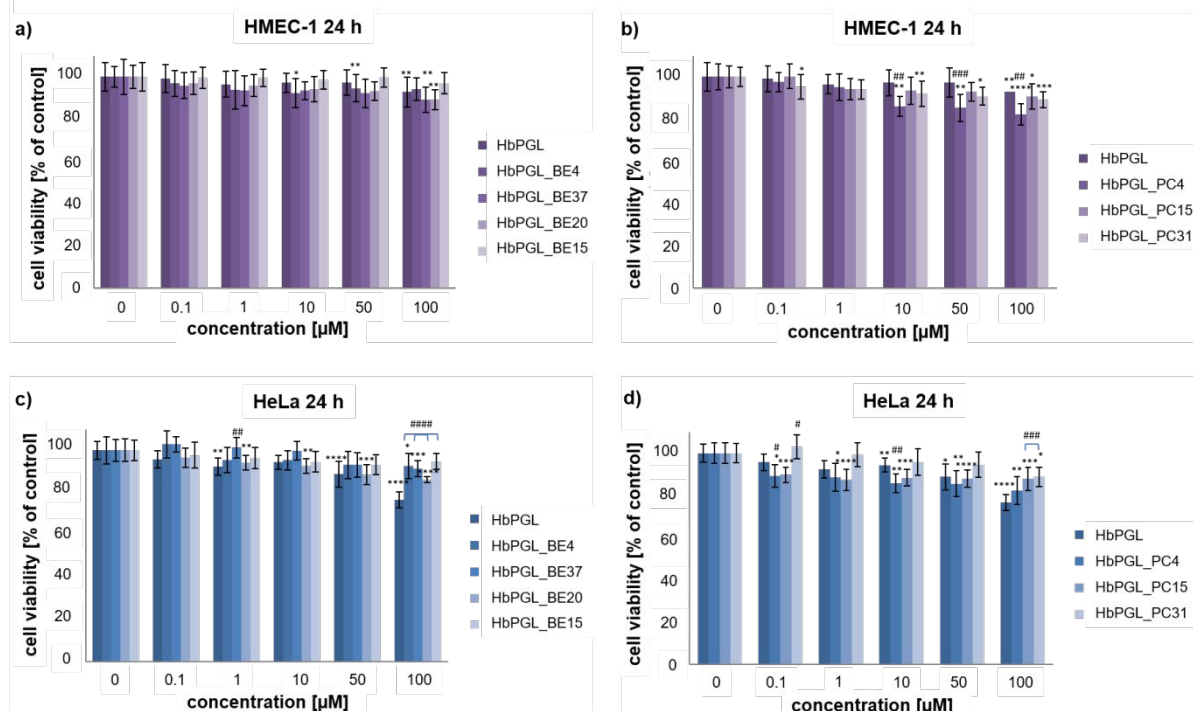


Figure S71. The influence of molar concentration of the neat hyperbranched polyglycidol and its hydrophobized derivatives on the cell viability of HMEC-1 (a, b) and HeLa (c, d), respectively after 24 incubation at 37 °C. Data are presented as a percentage of control (untreated cells) standard deviation (SD). The cytotoxicity values compared to the untreated control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$) as well as between unmodified hyperbranched polyglycidol and modified ones at the same compound concentration (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.005$, #### $p < 0.0001$).

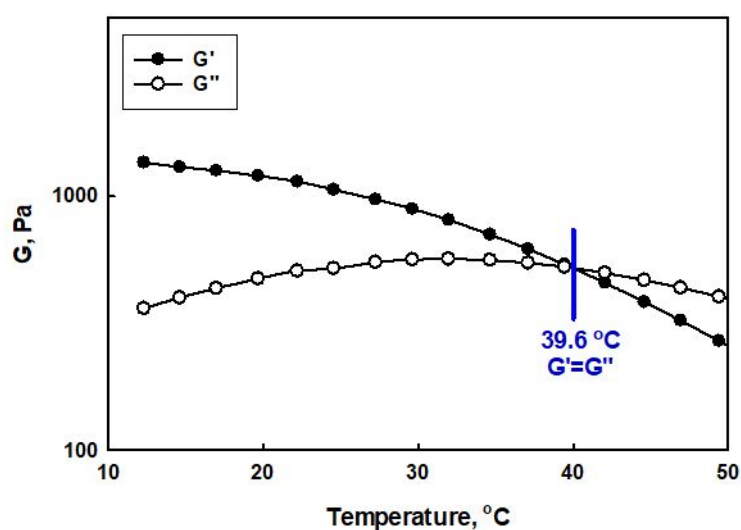


Figure S72. Temperature sweep test performed for hydrogel composed of neat HbPGL cross-linked with poly(AM-ran-2-AAPBA).

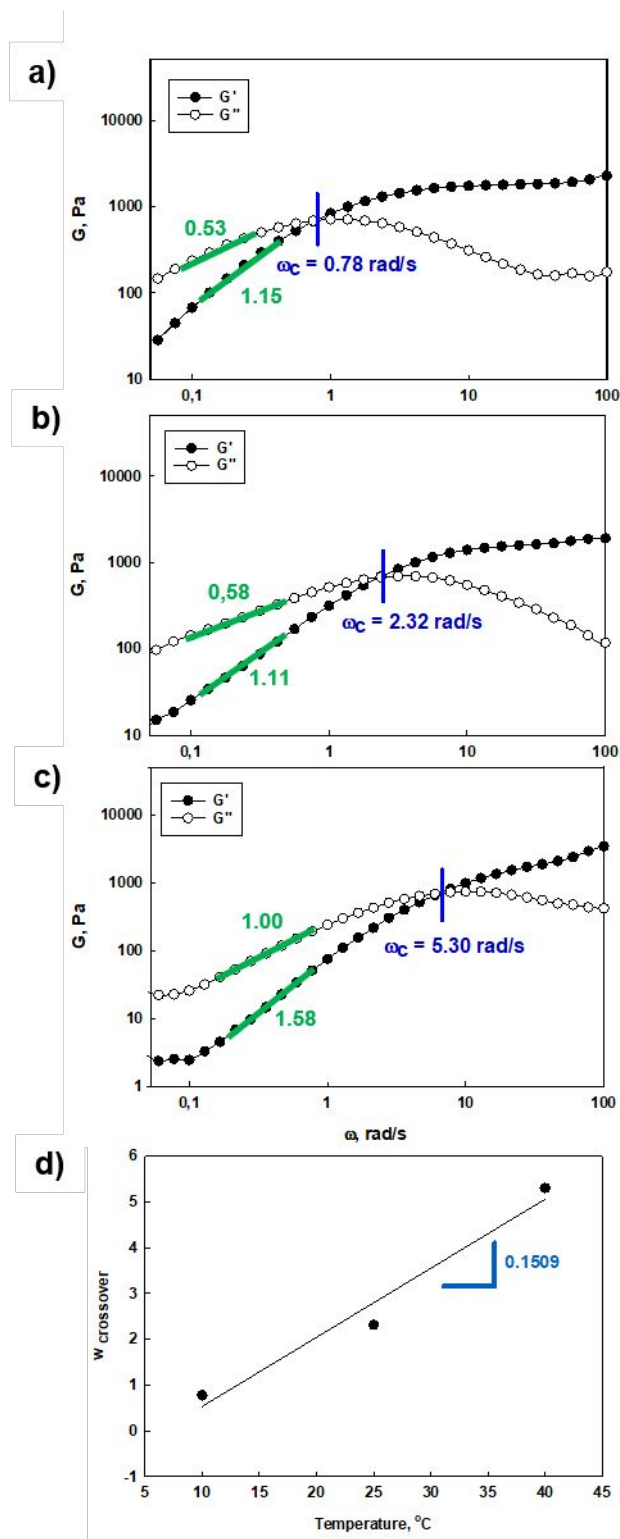


Figure S73. Frequency sweep tests performed for a hydrogel constructed of neat HbPGL cross-linked with poly(AM-ran-2-AAPBA) at 10 °C (a), 25 °C (b) and 40 °C (c) and plotted the temperature dependence of ω_c . (d).

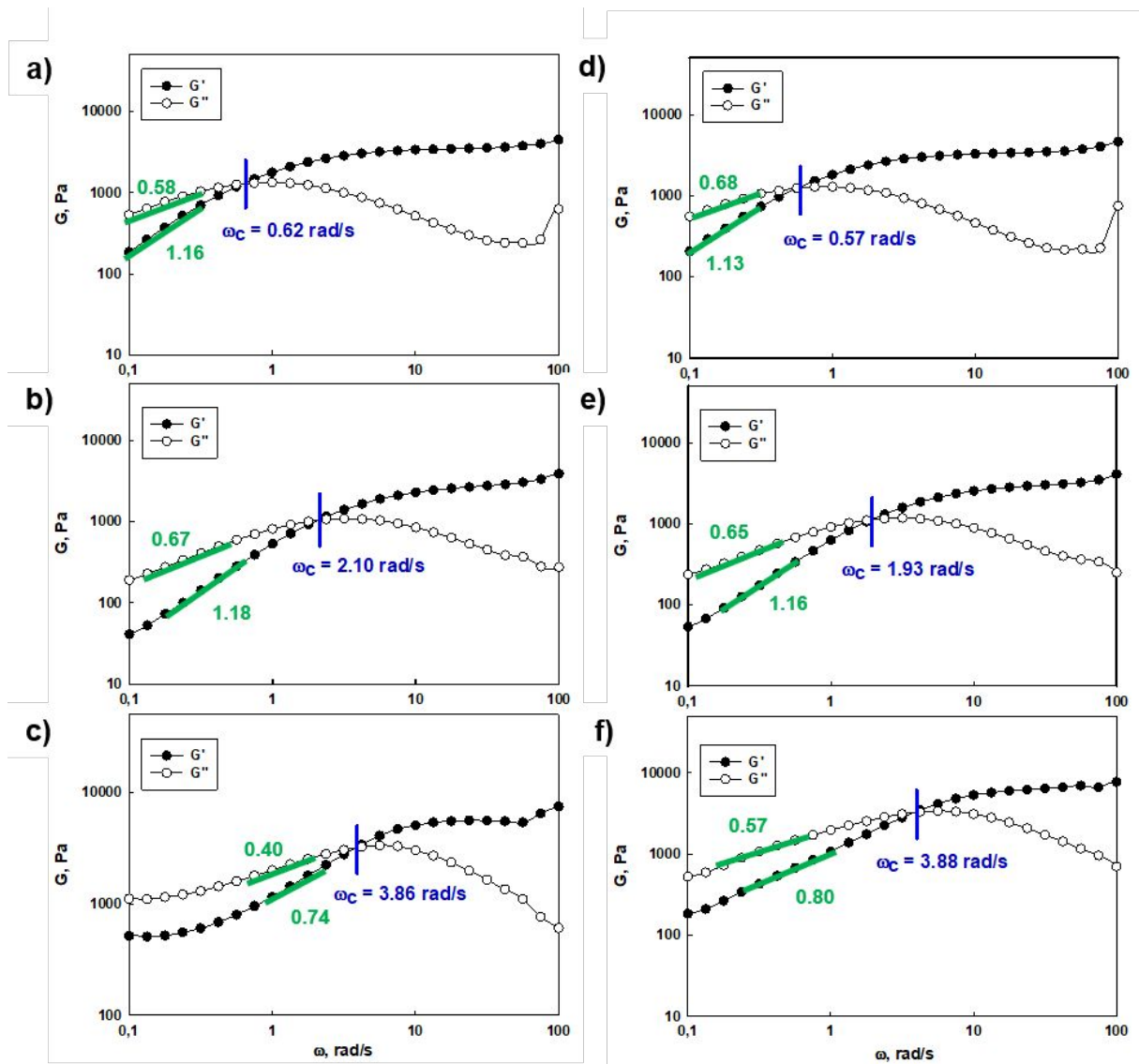


Figure S74. Frequency sweep tests performed for hydrogels constructed of poly(AM-ran-2-AAPBA) cross-linked respectively with HbPGL_BE4 recorded at 10 °C (a), 25 °C (b) and 40 °C (c) and with HbPGL_PC4 recorded at 10 °C (d), 25 °C (e) and 40 °C (f).

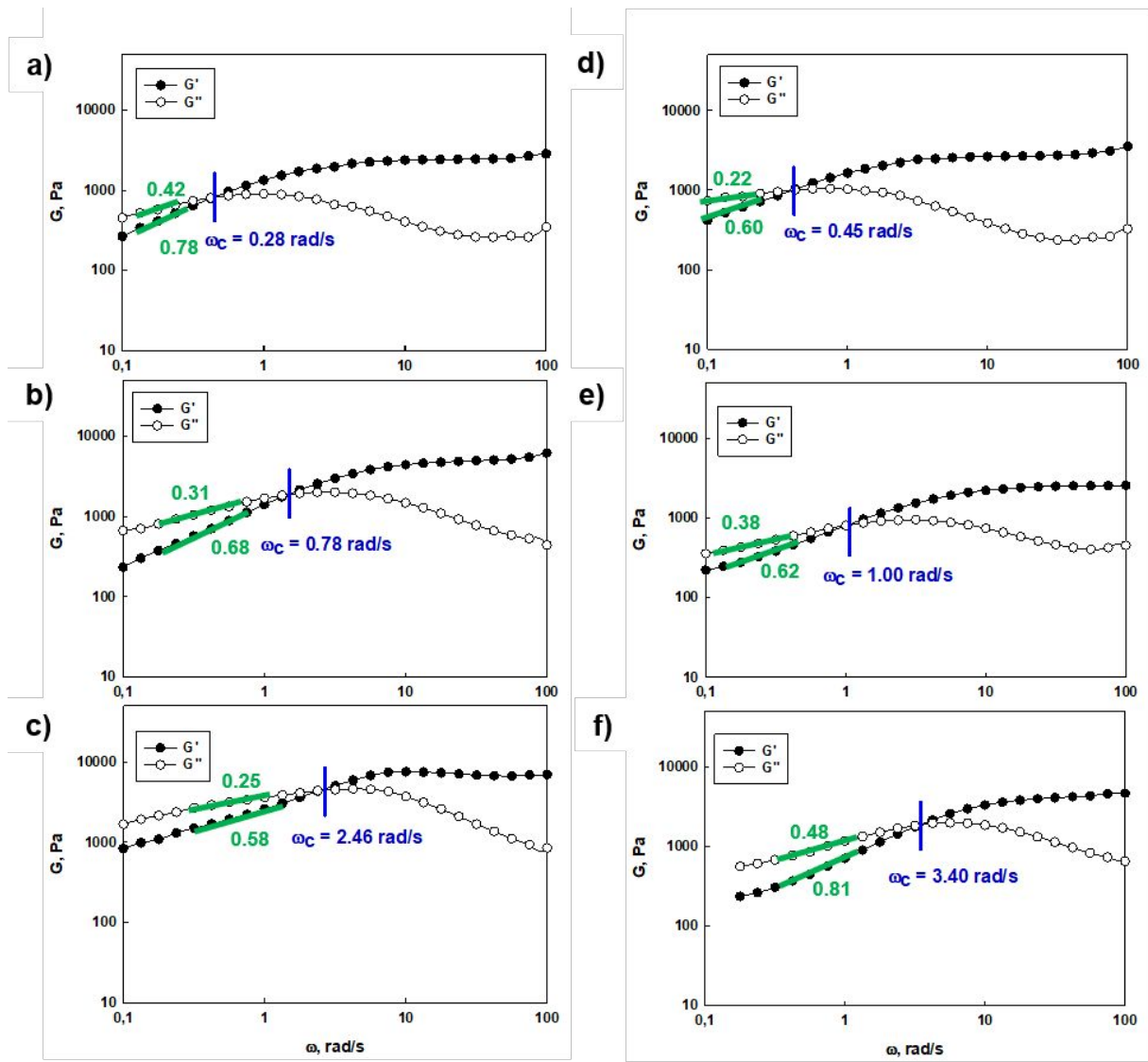


Figure S75. Frequency sweep tests performed for hydrogels constructed of poly(AM-ran-2-AAPBA) cross-linked respectively with HbPGL_BE15 recorded at 10 °C (a), 25 °C (b) and 40 °C (c) and with HbPGL_PC15 recorded at 10 °C (d), 25 °C (e) and 40 °C (f).

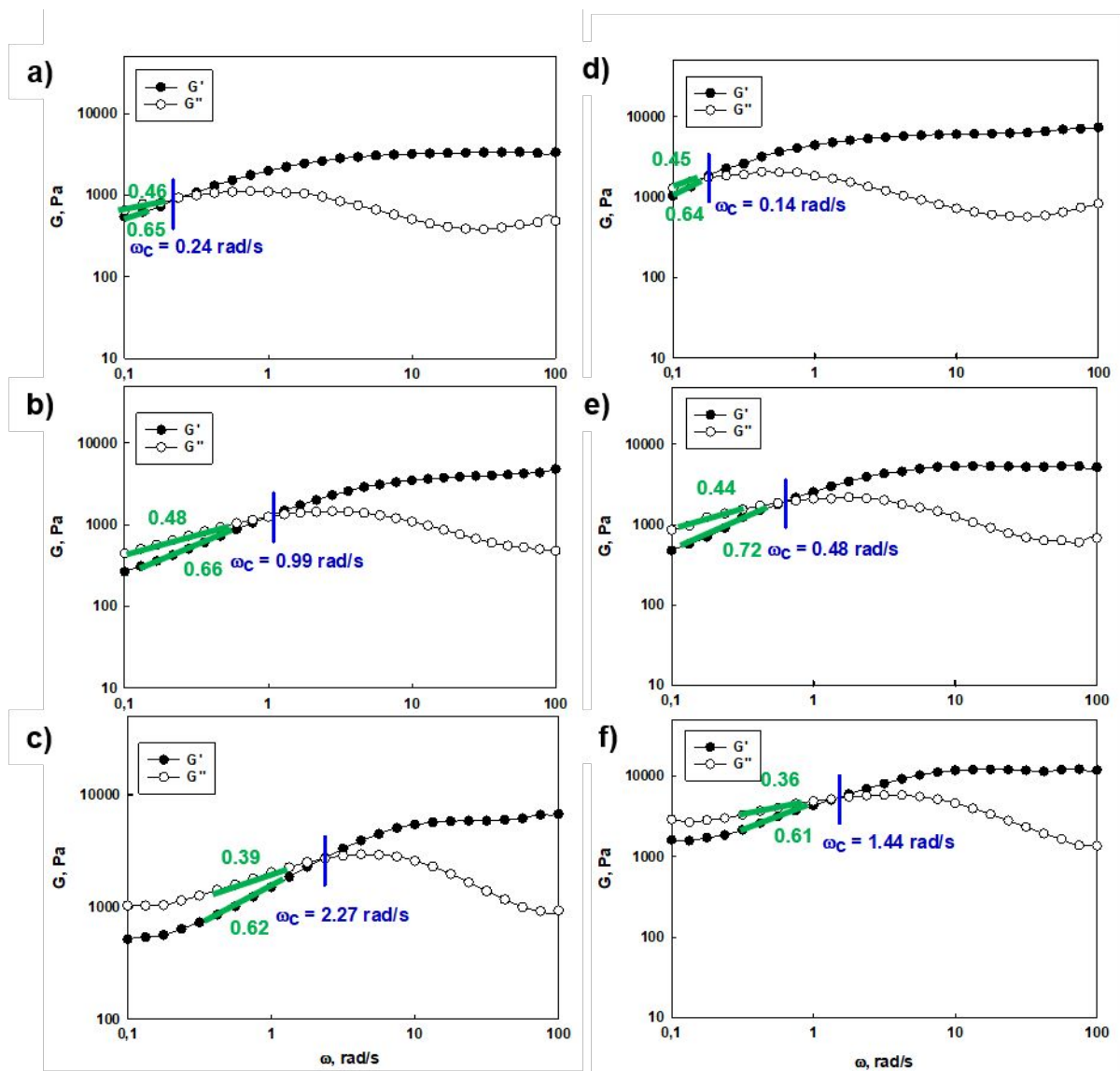


Figure S76. Frequency sweep tests performed for hydrogels constructed of poly(AM-ran-2-AAPBA) cross-linked respectively with HbPGL_BE26 recorded at 10 °C (a), 25 °C (b) and 40 °C (c) and with HbPGL_PC31 recorded at 10 °C (d), 25 °C (e) and 40 °C (f).

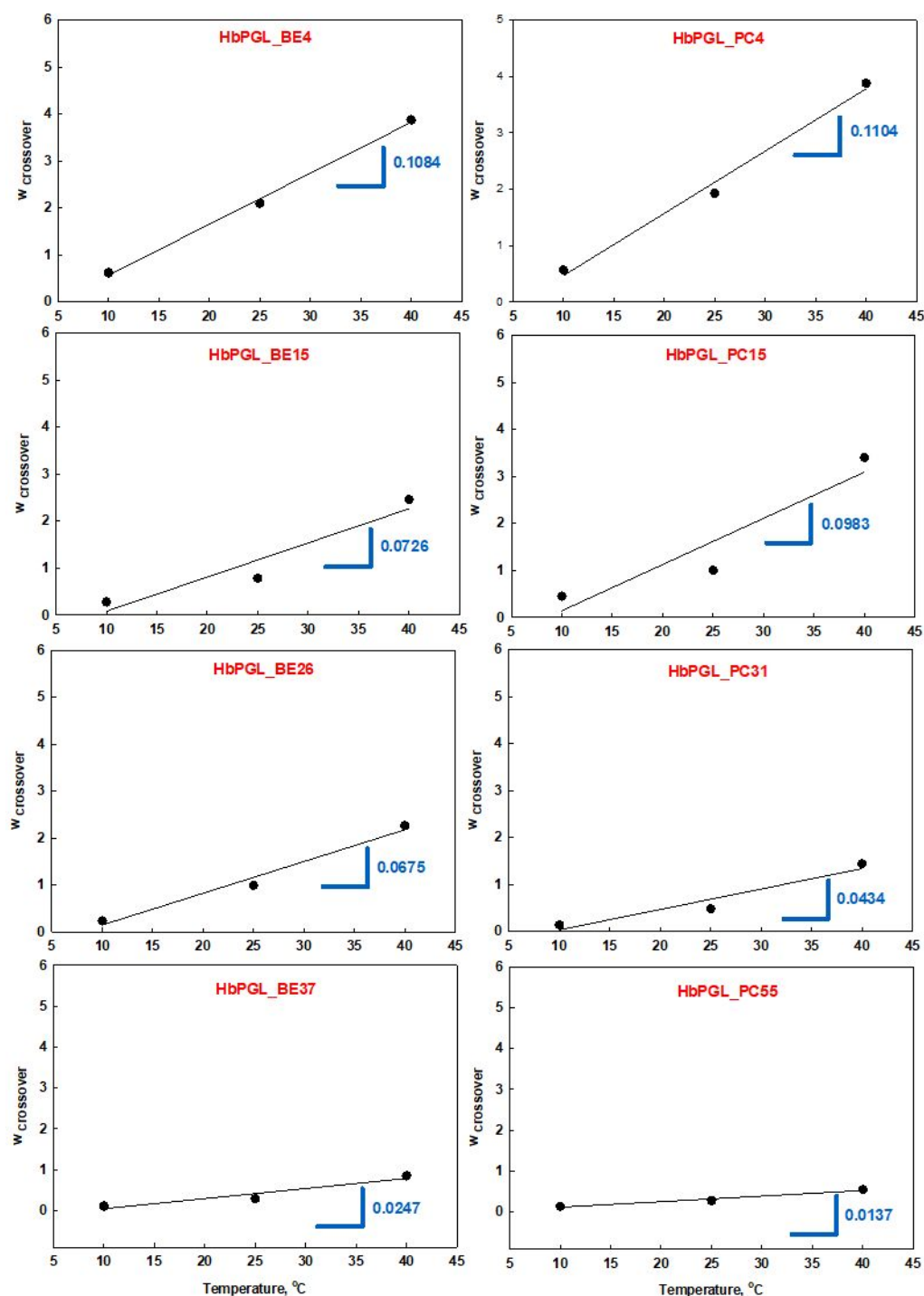


Figure S77. The temperature dependence of $\omega_{\text{crossover}}$ recorded for hydrogels constructed of hydrophobized HbPGL at different degree cross-linked with poly(AM-ran-2-AAPBA).

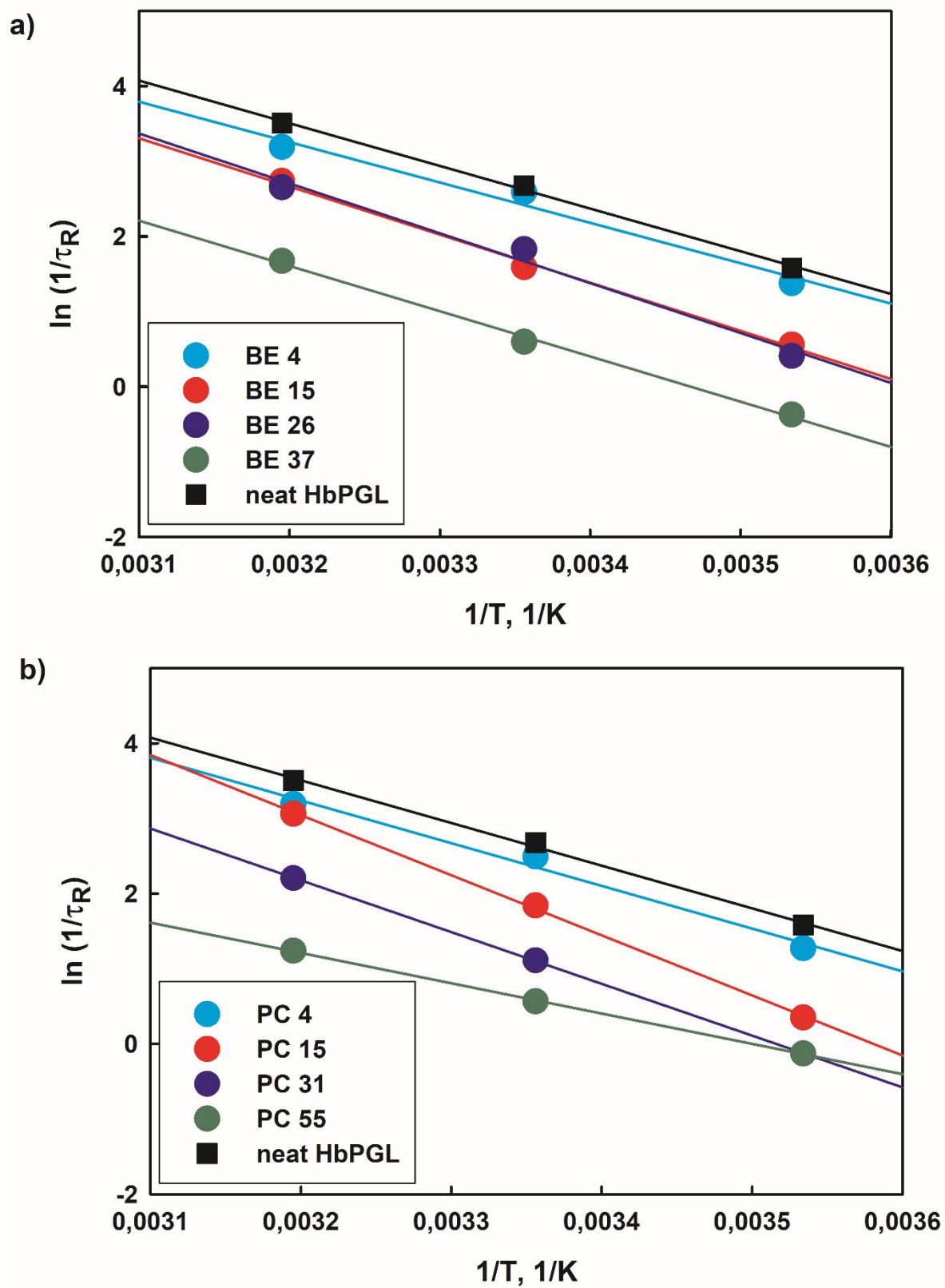


Figure S78. The dependence of $\ln(1/\tau_R)$ on $1/T$ determined for hydrogels constructed of HbPGL hydrophobized with phenyl units incorporated via ester (a) or urethane (b) linkages.

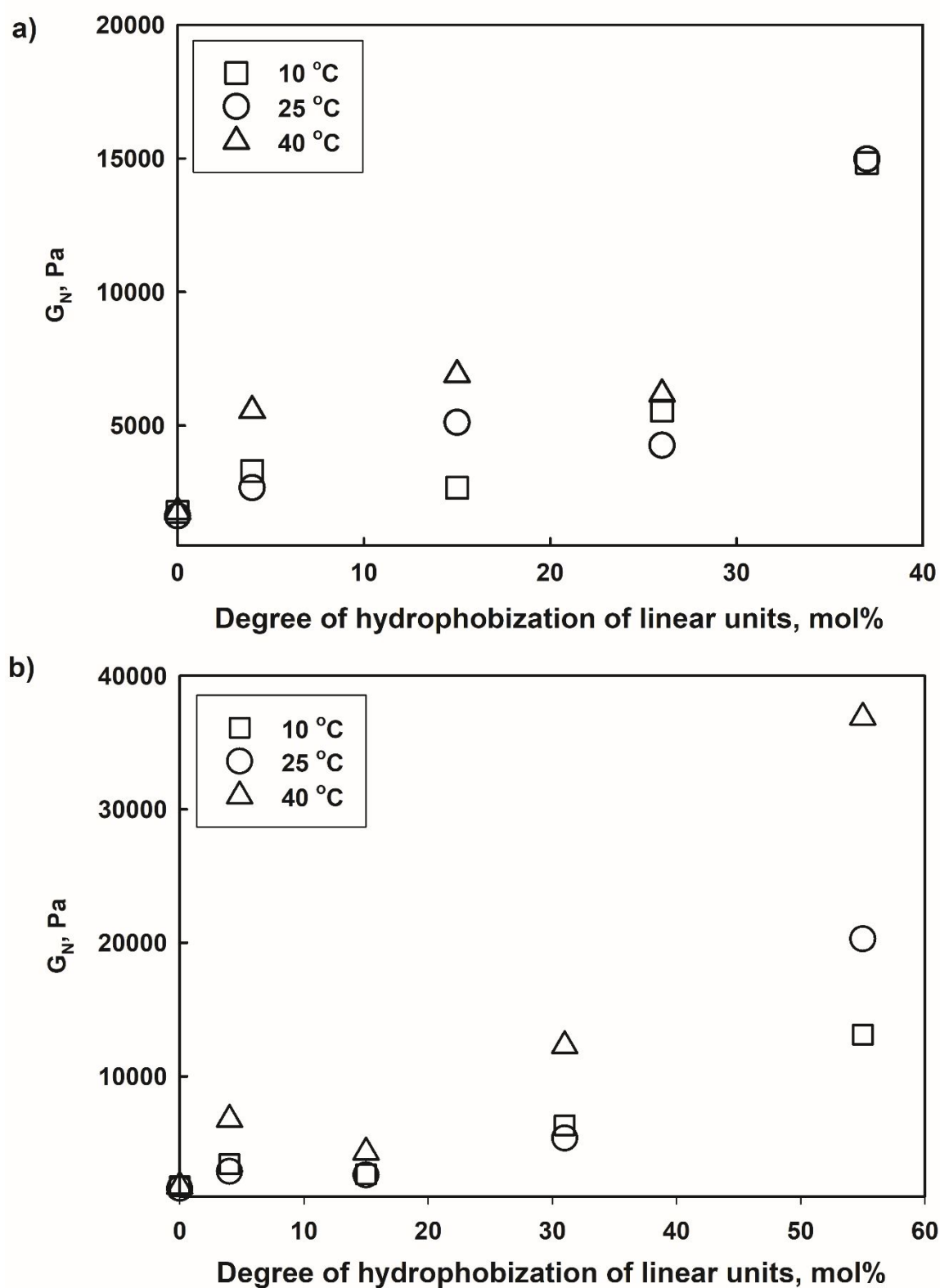


Figure S79. The dependence of G_N of hydrogels on the hydrophobization degree of used HbPGL performed via incorporation of phenyl groups via ester (a) and urethane (b) linkages.

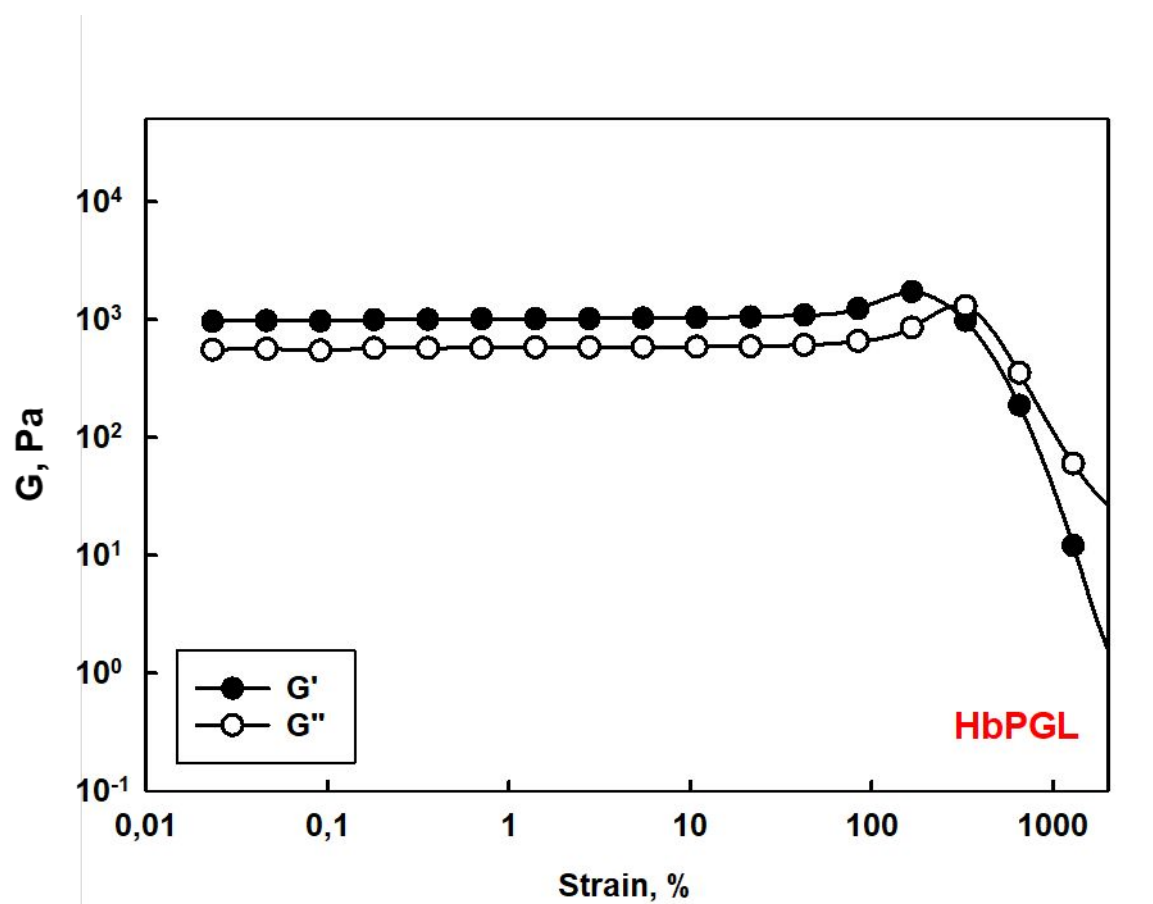


Figure S80. Strain sweep experiments performed for the hydrogel constructed of neat HbPGL cross-linked with poly(AM-*ran*-2-AAPBA).

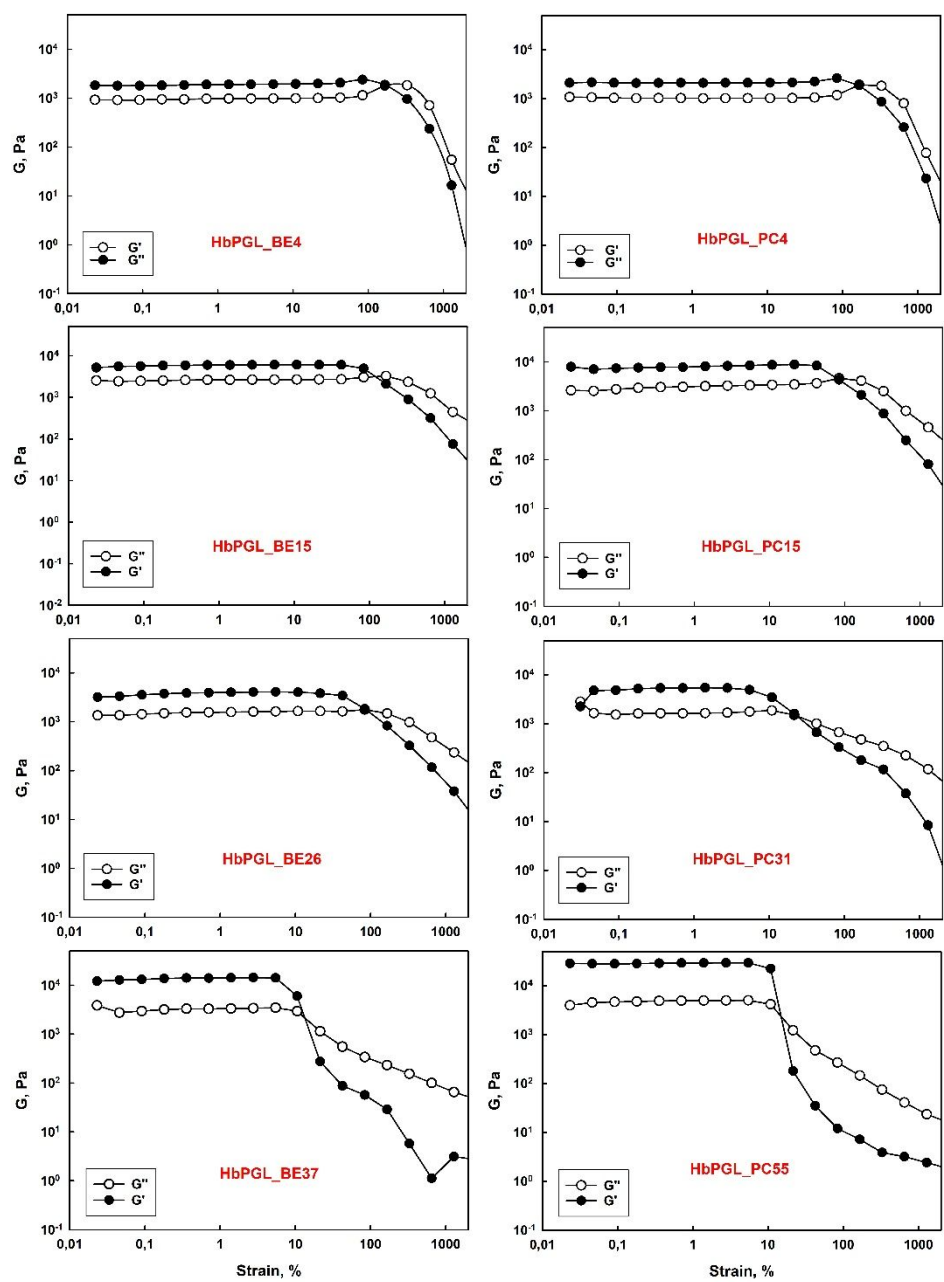


Figure S81. Strain sweep experiments performed for hydrogels constructed of hydrophobized HbPGL cross-linked with poly(AM-ran-2-AAPBA).

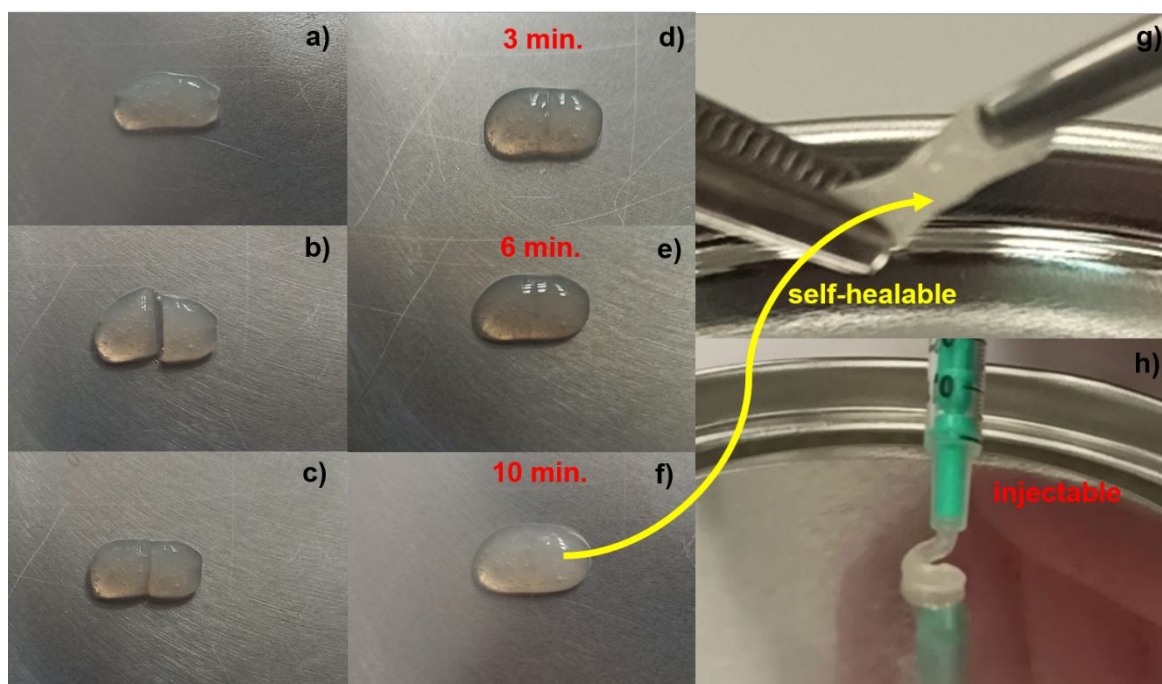


Figure S82. The illustration of experiment demonstrating the self-healable behaviour of neat HbPGL-based hydrogel. The hydrogel sample (a) was ruptured into two pieces (b), and placed in close contact (c). The sample was gradually repaired after 3 min. (d), 5 min. (e), 10 min. (f), respectively, and then the sample was raised with a couple of tweezers (g), which revealed that the sample was self-healable under ambient conditions. The hydrogel was injected via a syringe (h). The hydrogel after extrusion from the syringe preserves its integrity. In addition, a video file presenting an experiment of the hydrogel injection via a needle was attached.

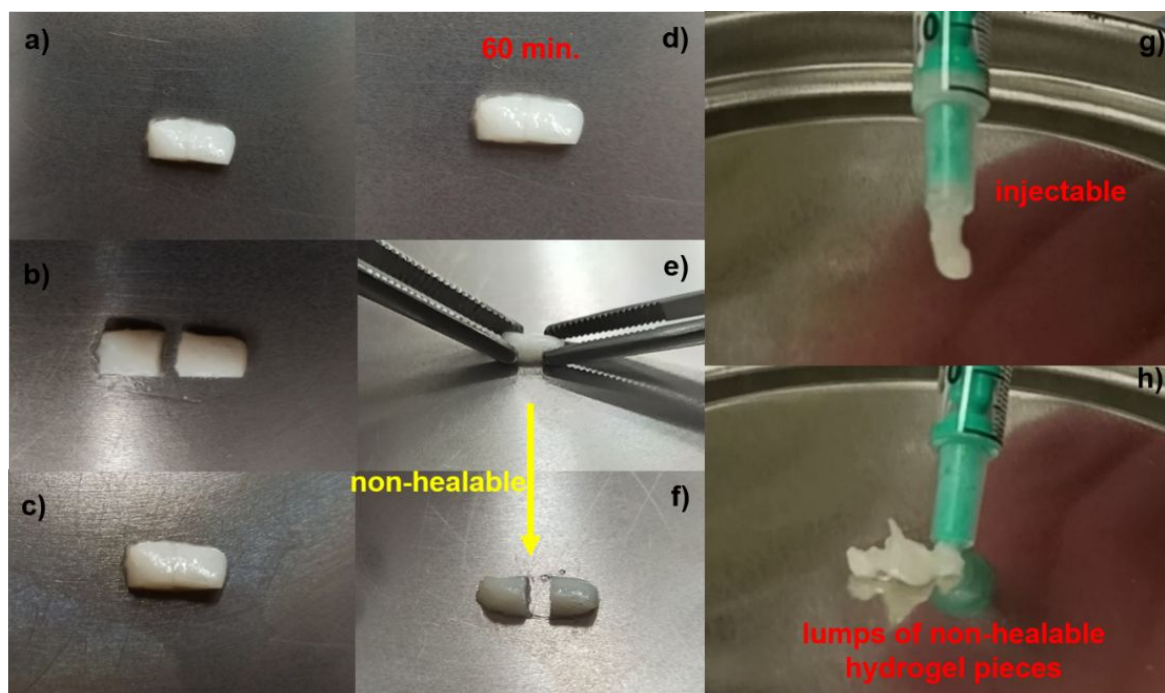


Figure S83. The illustration of experiment demonstrating the non-healable behaviour HbPGL_PC55-based hydrogel. The hydrogel sample (a) was ruptured into two pieces (b), and

placed in close contact (c). After 60 min. the sample was raised with a couple of tweezers (e), which revealed that the sample was not repaired (f). The hydrogel displayed the injectable properties, however, the sample was extruded in the form of separated non-healable lumps (h). In addition, a video file presenting an experiment of the hydrogel injection via a needle was attached.

Łódź, dn. 23.10.2024r.

Dr hab. Monika Gosecka, prof. CBMiM
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk
ul. Sienkiewicza 112
90-363 Łódź

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że mój udział w pracy „Self-Healable, Injectable Hydrogel with Enhanced Clotrimazole Solubilization as a Potential Therapeutic Platform for Gynecology” (Gosecka M., Jaworska-Krych D., Gosecki M., Wielgus E., Marcinkowska M., Janaszewska A., Klajnert-Maculewicz B., *Biomacromolecules*, 2022, 23, 10, 4203-4219) polegał na przygotowaniu koncepcji badawczej, przeprowadzeniu pomiarów reologicznych, analizie i interpretacji wyników, oraz napisaniu artykułu i przygotowaniu odpowiedzi na recenzje.

MGosecka

Łódź, dn. 23.10.2024r.

Mgr inż. Daria Jaworska-Krych
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk
ul. Sienkiewicza 112
90-363 Łódź

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że mój udział w pracy „Self-Healable, Injectable Hydrogel with Enhanced Clotrimazole Solubilization as a Potential Therapeutic Platform for Gynecology” (Gosecka M., Jaworska-Krych D., Gosecki M., Wielgus E., Marcinkowska M., Janaszewska A., Klajnert-Maculewicz B., *Biomacromolecules*, 2022, 23, 10, 4203-4219) polegał na przeprowadzeniu reakcji polimeryzacji oraz modyfikacji hiperrozgałęzionego poliglicydolu, przeprowadzeniu analizy NMR otrzymanych struktur, enkapsulacji leku w otrzymane struktury oraz przeprowadzeniu eksperymentu uwalniania leku ze struktury polimeru, przygotowaniu hydrofobizowanych hydrożeli zbudowanych z dynamicznych węzłów sieci, przeprowadzeniu eksperymentu samoreparacji sieci polimerowej.

D. Jaworska-Krych

Łódź, dn. 23.10.2024r.

Dr Mateusz Gosecki
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk
ul. Sienkiewicza 112
90-363 Łódź

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że mój udział w pracy „Self-Healable, Injectable Hydrogel with Enhanced Clotrimazole Solubilization as a Potential Therapeutic Platform for Gynecology” (Gosecka M., Jaworska-Krych D., Gosecki M., Wielgus E., Marcinkowska M., Janaszewska A., Klajnert-Maculewicz B., *Biomacromolecules*, 2022, 23, 10, 4203-4219) polegał na przeprowadzeniu pilotażowych reakcji polimeryzacji.

Gosecki

Łódź, dn. 23.10.2024r.

Dr Ewelina Wielgus
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk
ul. Sienkiewicza 112
90-363 Łódź

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że mój udział w pracy „Self-Healable, Injectable Hydrogel with Enhanced Clotrimazole Solubilization as a Potential Therapeutic Platform for Gynecology” (Gosecka M., Jaworska-Krych D., Gosecki M., Wielgus E., Marcinkowska M., Janaszewska A., Klajnert-Maculewicz B., *Biomacromolecules*, 2022, 23, 10, 4203-4219) polegał na przeprowadzeniu analizy ilościowej uwolnionego leku ze struktur polimerowych.



Łódź, dn. 23.10.2024r.

Dr Monika Marcinkowska
Katedra Biofizyki Ogólnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
ul. Pomorska 141/142
90-236 Łódź

Oświadczanie współautora publikacji

Oświadczam, że mój udział w pracy „Self-Healable, Injectable Hydrogel with Enhanced Clotrimazole Solubilization as a Potential Therapeutic Platform for Gynecology” (Gosecka M., Jaworska-Krych D., Gosecki M., Wielgus E., Marcinkowska M., Janaszewska A., Klajnert-Maculewicz B., *Biomacromolecules*, 2022, 23, 10, 4203-4219) polegał na przeprowadzeniu badań biologicznych oraz analizie wyników.

Monika Marcinkowska

dr hab. Anna Janaszewska, prof. UŁ
Katedra Biofizyki Ogólnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
ul. Pomorska 141/142
90-236 Łódź

Łódź, dn. 23.10.2024r.

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że mój udział w pracy „Self-Healable, Injectable Hydrogel with Enhanced Clotrimazole Solubilization as a Potential Therapeutic Platform for Gynecology” (Gosecka M., Jaworska-Krych D., Gosecki M., Wielgus E., Marcinkowska M., Janaszewska A., Klajnert-Maculewicz B., *Biomacromolecules*, 2022, 23, 10, 4203-4219) polegał na przeprowadzeniu badań biologicznych oraz opracowaniu wyników.

Anna Janaszewska

Łódź, dn. 23.10.2024r.

Prof. Dr hab. Barbara Klajnert-Maculewicz
Katedra Biofizyki Ogólnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
ul. Pomorska 141/142
90-236 Łódź

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że mój udział w pracy „Self-Healable, Injectable Hydrogel with Enhanced Clotrimazole Solubilization as a Potential Therapeutic Platform for Gynecology” (Gosecka M., Jaworska-Krych D., Gosecki M., Wielgus E., Marcinkowska M., Janaszewska A., Klajnert-Maculewicz B., *Biomacromolecules*, 2022, 23, 10, 4203-4219) polegał na współudziale w przygotowaniu koncepcji badawczej, nadzorze nad badaniami biologicznymi oraz interpretacji i współudziale w przygotowaniu tych wyników do publikacji.

B. Klajnert-Maculewicz

Enhanced Solubility and Bioavailability of Clotrimazole in Aqueous Solutions with Hydrophobized Hyperbranched Polyglycidol for Improved Antifungal Activity

Daria Jaworska-Krych, Monika Gosecka,* Mateusz Gosecki, Malgorzata Urbaniak, Katarzyna Dzitko, Anita Ciesielska, Ewelina Wielgus, Slawomir Kadlubowski, and Marcin Kozanecki



Cite This: *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2024, 16, 18434–18448



Read Online

ACCESS |

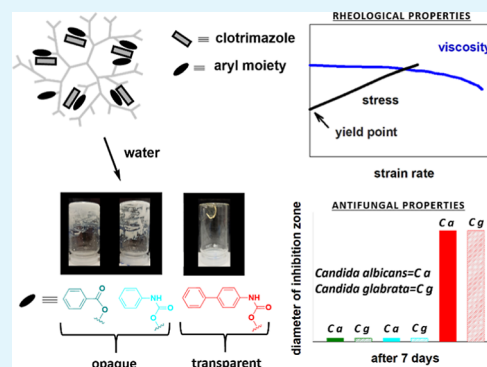
Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: The poor solubility of clotrimazole in the aqueous medium and the uncontrolled removal of the drug-loaded suppository content limit its effectiveness in the treatment of vulvovaginal candidiasis. We present here the aqueous formulations of clotrimazole in the form of non-Newtonian structured fluids, *i.e.*, Bingham plastic or pseudoplastic fluids constructed of hyperbranched polyglycidol, HbPGL, with a hydrophobized core with aryl groups such as phenyl or biphenyl. The amphiphilic constructs were obtained by the modification of linear units containing monohydroxyl groups with benzoyl chloride, phenyl isocyanate, and biphenyl isocyanate, while the terminal 1,2-diol groups in the shell were protected during the modification step, followed by their deprotection. The encapsulation of clotrimazole within internally hydrophobized HbPGLs using a solvent evaporation method followed by water addition resulted in structured fluids formation. Detailed Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC) analyses performed for aryl-HbPGLs with clotrimazole revealed the difference in drug compatibility among polymers. Clotrimazole in biphenyl-enriched HbPGL, unlike phenyl derivatives, was molecularly distributed in both the dry and the hydrated states, resulting in transparent formulations. The shear-thinning properties of the obtained fluid formulations make them injectable and thus suitable for the intravaginal application. Permeability tests performed with the usage of the Franz diffusion cell showed a 5-fold increase in the permeability constant of clotrimazole compared to drugs loaded in a commercially available disposable tablet and a 50-fold increase of permeability in comparison to the aqueous suspension of clotrimazole. Furthermore, the biphenyl-modified HbPGL-based drug liquid showed enhanced antifungal activity against both *Candida albicans* and *Candida glabrata* that was retained for up to 7 days, in contrast to the phenyl-HbPGL derivatives and the tablet. With their simple formulation, convenient clotrimazole/biphenyl-HbPGL formulation strategy, rheological properties, and enhanced antifungal properties, these systems are potential antifungal therapeutics for gynecological applications. This study points in the synthetic direction of improving the solubility of poorly water-soluble aryl-enriched pharmaceuticals.

KEYWORDS: hydrophobic drug, clotrimazole, drug carrier, structured fluid, Bingham fluid, drug permeability, intravaginal antifungal therapy



1. INTRODUCTION

Vulvovaginal candidiasis, a common fungal inflammatory disease caused mainly by *Candida albicans* (in about 90% of cases), with most of the remaining cases caused by *Candida glabrata*, is responsible for a third of all cases of vulvovaginitis in reproductive-aged women.^{1,2} Although *C. glabrata* is less prevalent, it is a substantial threat, particularly in immune-compromised individuals, *i.e.*, patients undergoing chemotherapy or antimetabolic drugs, HIV-infected patients, or transplant patients.^{3–5} Other major factors contributing to acute vulvovaginal candidiasis include estrogen use, elevated endogenous estrogen levels (due to pregnancy or obesity),⁶ diabetes, and the use of broad-spectrum antibiotics.^{3–6}

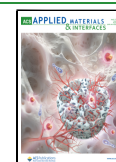
In the therapy of vulvovaginal candidiasis, clotrimazole (CLT), *i.e.*, an imidazole derivative belonging to the azole class of antifungal compounds, is commonly used in the form of creams, ointments, globules, and tablets.⁷ It shows mainly the activity against *C. albicans*, along with very low anti-*C. glabrata* activity.^{5,8} The bioavailability of CLT is limited in the aqueous medium due to its low solubility in water (0.49 $\mu\text{g/mL}$)⁹ and,

Received: December 26, 2023

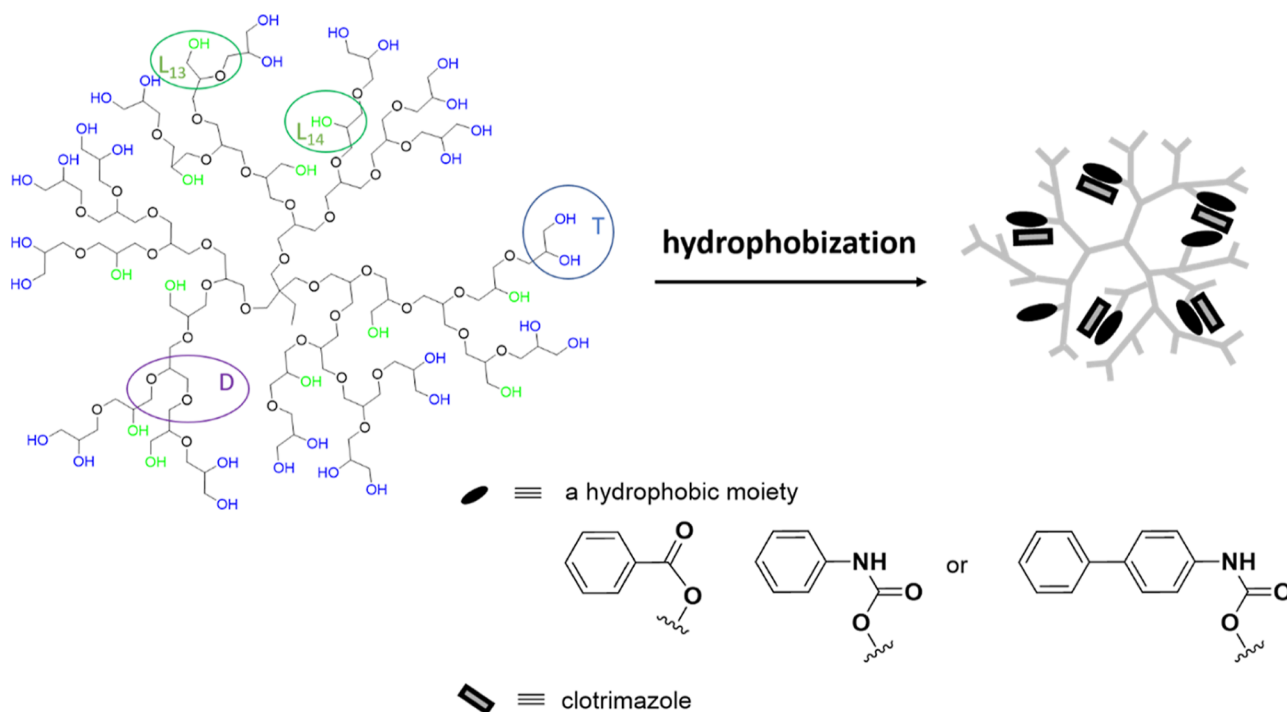
Revised: March 25, 2024

Accepted: March 27, 2024

Published: April 5, 2024



Scheme 1. Schematic Representation of Internally Aryl-Enriched Hyperbranched Polyglycidol Applied for the Encapsulation of Clotrimazole, where D = Dendritic, T = Terminal, and L_{13} and L_{14} = Linear Constitutional Units



in consequence, therapeutic efficiency is reduced. Furthermore, in the case of intravaginal therapy, frequent administration of globules or tablets is required as the content of the therapeutic formulation is often released uncontrollably.^{7,10} In fact, the affected site is often not adequately penetrated by the bioactive compound, its absorbed amount is below the therapeutic dose, leading to recurrent candidiasis and ultimately may be the cause of infertility.¹¹ For this reason, the number of azole-resistant fungal infections is still increasing.^{12–14}

The current challenge in intravaginal therapies is the formation of an efficient carrier of CLT, which can enhance its solubility in aqueous medium, prolonged drug interactions with the afflicted area, and provide suitable permeability of the vaginal mucosa with drug molecules. Additionally, it is expected to reduce the number of administrations of the therapeutic formulation required for recovery.

Prolonged drug interaction with the vagina can be attained by the use of hydrogel carriers. Their usage in the transport of CLT is, however, problematic as a result of the discrepancy between the hydrophilic nature of hydrogel systems and the hydrophobic character of the bioactive compounds. However, it can be overcome by the construction of hydrogels with the incorporation of distinct hydrophobized domains.¹⁵ Until now, the solubilization of azole-based antifungal drugs such as voriconazole in the aqueous medium was attained by embedding solid drug-loaded polymer particles in the hydrogel matrix.^{16,17} In the case of fluconazole, the suspension of drug particles coated with poly(ethylene glycol) was combined with the gelling mixture.¹⁸ The solubility of CLT in the aqueous medium was attained by the usage of water-miscible cosolvents or drug loading in the form of microemulsions or nanocapsules¹⁹ suspended into the aqueous solution of gelling polymers. Such a strategy of incorporation of poorly water-soluble drugs often requires, however, the usage of surfactants.²⁰ The complete release of CLT from these

hydrogel carriers was limited to several hours. Recently, a novel synthetic strategy of CLT-enriched hydrogels constructed of dynamic cross-links has been elaborated based on the usage of drug-loaded unimolecular micelles displaying prolonged CLT release reaching 40 h.^{21–23} This approach required, however, the use of a cross-linking agent for hydrogel formation.

In this work, we demonstrate the aqueous non-Newtonian structured fluids loaded with CLT constructed of a one-polymer component, *i.e.*, aryl-enriched polyether unimolecular micelles, without the need of adding any surfactant or additional cross-linking agent. Formulations of such simple construction based on internally hydrophobized hyperbranched polyglycidol, hHbPGL, with phenyl and biphenyl moieties exhibiting affinity to CLT ensure extended retention of the bioactive compound in the affected area and enhanced CLT bioavailability. The characteristics of CLT-loaded structured fluids make them promising carriers of hydrophobic drugs for efficient intravaginal therapy. The biocompatible character of HbPGL with a hydrophobized interior makes these formulations highly prospective as drug delivery systems.²²

In this study, we present the relationship between the structural characteristics of the constructed unimolecular micelles, *i.e.*, the size of the aryl group, the type of linkage used for immobilization of the aryl group, the rheological properties of the prepared formulations, the solubilization ability of CLT and its permeability through the skin barrier, and antifungal properties against both *C. albicans* and *C. glabrata*. It was shown that the structured liquids of HbPGLs enriched with an aryl group with CLT could show better activity against *C. glabrata* compared with the free drug. The antifungal properties of the structured liquids were closely dependent on the size of the aryl group used to hydrophobize HbPGL, affecting the solubility of CLT in hyperbranched

polymeric structures and the skin permeability. This work contributes to a better understanding of the material construction strategy and its biological function. Moreover, this work demonstrates the potential of structured fluids to be key drug carriers in gynecology in addition to hydrogel formulations.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials. 1,1,1-Tris(hydroxymethyl)propane was purchased from Sigma-Aldrich. It was dissolved under reflux in acetone, precipitated with ethyl ether, and then dried prior to use. NaH (60 wt %) in mineral oil was purchased from Merck. The oil was removed by washing with dry 1,4-dioxane and then drying under reduced pressure. Glycidol (Sigma-Aldrich) was dried over CaH₂ and distilled before use. Tetrahydrofuran (THF) was purchased from Sigma-Aldrich and dried over Na/K alloy. 2,2-Dimethoxypropane (TCI), benzoyl chloride, phenyl isocyanate (Alfa Aesar), and 4-biphenyl isocyanate (Sigma-Aldrich) were used as received. *p*-Toluenesulfonic acid (PTSA) was purchased from Sigma-Aldrich and dried with benzene before use. CLT (Sigma-Aldrich) was used as received. Clodital MAX 500 mg, USP Health, a CLT-loaded commercially available tablet, was used as a reference.

2.2. Synthesis of HbPGL. The synthesis of HbPGL was carried out in a thermostated glass reactor equipped with a steel mechanical stirrer under an argon atmosphere. Twenty percent of the hydroxyl groups of 1,1,1-tris(hydroxymethyl)propane (105 mg; 7.8×10^{-4} mol) were converted to alcoholates in THF using NaH (4.6×10^{-4} mol). Thirty five mL of glycidol was dropped into the reactor at a rate of 2 mL/h, and the polymerization was conducted for 24 h at 95 °C. The product was dissolved in methanol, twice precipitated into acetone, and dried. The polymer was then dissolved in deionized water and dialyzed using dialysis tubes MCWO = 3.5k. The structure of the synthesized polymer was characterized with ¹H and ¹³C INVGATE NMR spectroscopy. The degree of branching of the synthesized neat HbPGL was 0.55. The molar fraction of dendritic (D) and total linear constitutional units L₁₃ and L₁₄ bearing monohydroxyl groups was 0.25 and 0.40, respectively, whereas the molar fraction of terminal units (T) containing diol moieties was 0.35. D, L₁₃, L₁₄, and T are denoted in Scheme 1. The weight-average molecular mass *M_w* was determined based on GPC results using water as an eluent and is equal to 12,000 g/mol, while the dispersity *D* = 1.8.

2.3. Hydrophobization of HbPGL Core with Phenyl and Biphenyl Urethane Moieties. HbPGL (20 g) of a molecular weight equal to 12,000 g/mol was chemically modified by the protection of 1,2-diol groups in reaction with 2,2-dimethoxypropane (96 mL, 0.78 mol) in the presence of PTSA (0.192 g, 1.11 mmol) by ultrasonication at 40 °C for 3 h. The crude product was diluted with chloroform and extracted three times with a saturated Na₂CO₃ solution to remove PTSA. The organic phase was dried over MgSO₄ and dialyzed in chloroform for 24 h. The product was then dried under high vacuum conditions and analyzed by ¹H and ¹³C INVGATE NMR spectroscopy in deuterated DMSO to confirm the complete conversion of terminal 1,2-diol groups to acetals (Acet), Figures S4–S6.

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 4.84–4.36 (OH-L₁₃, L₁₄), 4.14 m, 1H, CH-PG (T Acet), 3.97 (m, 1H, CH(H)-PG (T Acet)), 3.80–3.20 (5H-HbPGL backbone, m, 1H, CH(H)-PG (T Acet)), 1.30 (3H-CH₃ T Acetal), 1.26 (3H-CH₃ T Acetal).

¹³C INVGATE NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 108.84 (C-T Acetal), 80.39 (CH-L₁₃), 78.38 (CH-D), 74.69 (CH-T Acetal), 73.33 (CH₂-2L₁₄), 72.64–70.61 (CH₂-2D,T), 69.91 (CH₂-L₁₃), 69.52–68.77 (CH-L₁₄), 66.46 (CH₂-T Acetal), 61.27 (CH₂-L₁₃), 27.09 (CH₃-T Acetal), 25.85 (CH₃-T Acetal).

HbPGL with protected 1,2-diol groups (3.5 g) in terminal units was dried with benzene, dissolved in pyridine (20 mL) under argon conditions, and heated to 50 °C. Then, a 4-biphenyl isocyanate solution in pyridine (0.106 g/mL) or 0.89 mL of phenyl isocyanate, respectively, was dropped. The reaction was carried out for 24 h. The

reaction mixture was dialyzed against DMSO. After evaporation of the solvent, the degree of hydrophobization of all monohydroxyl units was determined on the basis of the ¹H NMR spectrum recorded in deuterated DMSO-*d*₆, comparing the integration of methyl protons from acetal groups in terminal units (1.15 and 1.35 ppm) and aromatic protons from biphenyl groups (7.10 to 7.75 ppm). In the case of the phenyl-HbPGL derivative, 66 mol % of all L₁₃ and L₁₄ units were hydrophobized, i.e., 41 hydrophobic units per macromolecule (Figure S7), while for the biphenyl-enriched HbPGL derivative, 40 mol % of all L₁₃ and L₁₄ units were hydrophobized, i.e., 24 hydrophobic units per macromolecule (Figure S9).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) for the BPh-HbPGL derivative 9.97–9.68 (1H-NH), 7.57 (6H-biphenyl), 7.40 (2H-biphenyl), 7.30 (1H-biphenyl), 5.01 (1H-CH-L_{1,4}-hydrophobic), 4.89–4.44 (1H-OH-L_{1,3}, L_{1,4}), 4.24 (1H-CH₂-L_{1,3}-hydrophobic), 4.12 (1H-CH₂-T_{Acetal}), 3.94 (1H-CH₂-T_{Acetal}), 3.82–3.02 (HbPGL-backbone), 1.29 (3H-CH₃ T_{Acetal}), 1.23 (3H-CH₃ T_{Acetal}).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) for the Ph-HbPGL derivative 9.78–9.55 (1H-NH), 7.46-2H, 7.25-2H, 6.97-1H-phenyl, 4.97 (1H-CH-L_{1,4}-hydrophobic), 4.86–4.38 (1H-OH-L_{1,3}, L_{1,4}), 4.20 (1H-CH₂-L_{1,3}-hydrophobic), 4.11 (1H-CH₂-T_{Acetal}), 3.94 (1H-CH₂-T_{Acetal}), 3.82–3.02 (HbPGL-backbone), 1.29 (3H-CH₃ T_{Acetal}), 1.23 (3H-CH₃ T_{Acetal}).

Subsequently, 1,2-diol groups of the polymer in terminal units were deprotected by the addition of an aqueous solution of 0.1 M HCl to the polymer solution in DMSO and stirred overnight at room temperature. The mixture was dialyzed against deionized water for 24 h, changing the solvent until it reached a neutral pH. The product was lyophilized and characterized by using ¹H NMR spectroscopy in deuterated DMSO (Figures S8 and S10).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) for BPh-HbPGL derivative 9.98–9.65 (1H-NH), 7.57 (6H-biphenyl), 7.40 (2H-biphenyl), 7.30 (1H-biphenyl), 5.01 (1H-CH-L_{1,4}-hydrophobic), 4.90–4.34 (1H-OH-L_{1,3}, L_{1,4}, T), 4.23 (1H-CH₂-L_{1,3}-hydrophobic), 4.11 (1H-CH₂-L_{1,3}-hydrophobic), 3.98–3.00 (HbPGL-backbone).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) for Ph-HbPGL derivative 9.80–9.49 (1H-NH), 7.45-2H, 7.25-2H, 6.97-1H-phenyl, 4.98 (1H-CH-L_{1,4}-hydrophobic), 4.86–4.36 (1H-OH-L_{1,3}, L_{1,4}, T), 4.21 (1H-CH₂-L_{1,3}-hydrophobic), 4.09 (1H-CH₂-L_{1,3}-hydrophobic), 3.90–3.00 (HbPGL-backbone).

2.4. Hydrophobization of AC-HbPGL Core with Benzoate Groups (Ester Derivative). HbPGL with protected 1,2-diol groups (3.5 g) in terminal units was dried with benzene, dissolved in pyridine (20 mL) under argon conditions, and cooled in an ice bath to 0 °C. Then, 0.92 mL of benzoyl chloride was dropped. The reaction was carried out for 24 h. The reaction mixture was dialyzed against DMSO. After evaporation of the solvent, the degree of hydrophobization of all monohydroxyl units (57 mol %; 35 hydrophobic units per macromolecule) based on the ¹H NMR spectrum recorded in deuterated DMSO-*d*₆, comparing the integration of methyl protons from acetal groups in terminal units (1.15 and 1.35 ppm) and aromatic protons from phenyl groups (7.21 to 8.02 ppm).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) for the BE-HbPGL derivative 7.95-2H, 7.62-1H, 7.50-2H (phenyl), 5.25 (1H-CH-L_{1,4}-hydrophobic), 5.01–4.31 (1H-OH-L_{1,3}, L_{1,4}), 4.24 (1H-CH₂-L_{1,3}-hydrophobic), 4.13 (1H-CH₂-T_{Acetal}), 3.94 (1H-CH₂-T_{Acetal}), 3.82–3.14 (HbPGL-backbone), 1.29 (3H-CH₃ T_{Acetal}), 1.25 (3H-CH₃ T_{Acetal}).

After the determination of the hydrophobization degree, the diol groups were deprotected by adding a 0.1 M HCl aqueous solution to the polymer solution in DMSO and stirred overnight. Finally, the mixture was dialyzed against deionized water and analyzed with ¹H NMR spectroscopy in deuterated DMSO.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) for the BE-HbPGL derivative 7.97-2H, 7.63-1H, 7.52-2H (phenyl), 5.26 (1H-CH-L_{1,4}-hydrophobic), 4.93–4.33 (1H-OH-L_{1,3}, L_{1,4}, T), 4.25 (1H-CH₂-L_{1,3}-hydrophobic), 4.01–2.98 (HbPGL-backbone).

2.5. Preparation of Viscous Liquid Drug Formulation. A series of HbPGL solutions with a core enriched in 4-biphenylurethane groups (0.065 g) were prepared and dissolved in 1 mL of methanol.

CLT in the amounts of 12.2, 23.0, 32.5, or 41.5 mg, respectively, was dissolved in 5 mL of methanol to obtain a series of drug solutions. In the next step, the polymer and drug solutions were mixed and stirred for 30 min. Methanol was then evaporated completely at 40 °C. Upon confirmation of complete removal of methanol, a series of transparent formulations were obtained, *i.e.*, mixtures of polymer and drug, to which 131 or 262 μL of deionized water was added and mechanically mixed. The chemical composition of the aqueous drug formulations of internally hydrophobized HbPGL with the phenyl and 4-biphenyl groups is presented in Table 1.

Table 1. Structural Characteristics of the Aryl-Enriched HbPGLs

hydrophobized HbPGL	molar fraction of hydrophobized constitutional units bearing monohydroxyl groups ($L_{13} + L_{14}$)	number of hydrophobized units per one macromolecule
BE57	57	35
PC66	66	41
BPh40	40	24

2.6. Rheology. Flow curves of prepared formulations were investigated at 25 and 37 °C on a MARS 40 rheometer (Thermo Scientific HAAKE) in the range of shear rate from 0.1 to 20.0 s^{-1} .

Temperature sweep tests of formulations in the range from 4 to 50 °C were performed in the mode of controlled deformation at a strain equal to 0.2% and a frequency of 0.16 Hz using the continuous heating program with a heating rate of 6.5 °C/min.

2.7. Differential Scanning Calorimetry, DSC. The thermal properties of the neat BPh-HbPGL copolymer, CLT, and BPh-HbPGL-based CLT formulations were evaluated using a DSC [TA Instruments (2500 Discovery series)]. A specific amount of sample was heated in a sealed aluminum pan from room temperature to 170 °C with a heating rate of 10 °C/min.

2.8. Size Exclusion Chromatography. To determine the molecular mass distribution, weight-average molecular mass (M_w) and dispersity (D) samples were analyzed by using gel permeation chromatography. The SEC system was provided Testa Analytical Solutions (Berlin, Germany) and consisted of an isocratic pump, automatic injector, and set of 2 separation columns (Suprema Lux analytical linear XL column) with Suprema Lux analytical SDV precolumn supplied by PSS Polymer Standards Service GmbH (Mainz, Germany) in a thermostatic column oven, as well as three detectors: multiangle laser light scattering detector (MALLS) (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, New York, USA), differential refractive index, and differential pressure viscosity detector, the last two combined in a single assembly with common sample path (Testa Analytical Solutions, Berlin, Germany). As an eluent, 0.1 M NaNO_3 was used, the flow rate and temperature were maintained at 1 mL min^{-1} and 30 °C, respectively, and the injection loop volume was 100 μL . Data were collected and processed with ParSEC SEC software (Brookhaven Instrument Corporation, Holtsville, New York, USA). All measurements were conducted in triplicate.

2.9. FT-IR Measurements. The FTIR spectra were measured on a Thermo Scientific Nicolet iS50 spectrometer using an ATR accessory equipped with a diamond crystal. The spectra were measured with a resolution of 2 cm^{-1} , and 64 scans were averaged to achieve a high signal-to-noise ratio, allowing for further mathematical treatment of the results. The polynomial baseline was extracted from each spectrum, and then the spectra were normalized. The normalization procedures were selected depending on the problem to be solved and are described in detail with the presentation of the results. Difference spectra were calculated in relation to spectra of the dry polymer, dry polymer with an encapsulated drug, polymer solution, or deionized water.

2.10. Skin Permeability Investigations. A formulation constructed of drug-loaded hydrophobized HbPGL containing equivalent 0.9 mg of CLT was placed on the Strat-M membrane

into a donor compartment of the Franz cell. For comparison, Clotidal Max, CLT 500 mg commercially available vaginal tablet, USP Health, and the suspension of pure CLT in the deionized water were investigated at the same drug concentration in the analyzed samples.

The receptor compartment was filled with 12.5 mL of simulated vaginal fluid at 37 ± 1 °C. Aliquots of 0.5 mL of the receptor solution were taken at different time intervals for around 145 h. Each withdrawn aliquot was immediately replaced with the same volume of the corresponding fresh portion of the simulated vaginal fluid.

CLT concentrations were determined by an ACQUITY UPLC I-Class chromatography system coupled with a SYNAPT G2-Si mass spectrometer equipped with an electrospray source and quadrupole time-of-flight mass analyzer (Waters Corp., Milford, MA, USA). An Acquity BEH C18 column (100×2.1 mm, 1.7 μm) maintained at 45 °C was used for the chromatographic separation of an analyte. The mobile phase was prepared by mixing 0.1% formic acid (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B). The elution gradient was: 32% B (0–1.0 min), 32–95% B (1.0–3.0 min), 95–95% B (3.0–3.5 min), 95–32% B (3.5–3.52 min), and 32–32% B (3.52–7.0 min). The flow rate was 0.45 mL/min , and the injection volume was 0.5 μL for CLT.

For mass spectrometric detection, the electrospray source was operated in a positive resolution mode. The optimized source parameters were: capillary voltage of 3.0 kV, cone voltage of 20 V, desolvation gas flow of 400 L/h at a temperature 350 °C, nebulizer gas pressure of 6.5 bar, and source temperature of 100 °C. Mass spectra were recorded over an m/z range of 100 to 1200. Mass spectrometer conditions were optimized by direct infusion of a standard solution. The system was controlled using MassLynx software (Version 4.1), and data processing (peak area integration and construction of the calibration curve) was performed by the TargetLynx software.

The initial stock calibration solution of CLT was created in simulated vaginal fluid. The stock solutions were serially diluted with 0.5 mL of simulated vaginal fluid and 0.5 mL of methanol to obtain working solutions at several concentration levels. The calibration curves were prepared at ten different concentrations of drug solutions and were linear in a concentration range from 0.1 to 20.0 $\mu\text{g/mL}$ for CLT with a correlation coefficient of >0.995 .

2.11. Antifungal Activity. The antifungal activity was investigated against *C. albicans* ATCC 90028 and *C. glabrata* ATCC 2001. Fungal cultures were stored at 4 °C and subcultured once a month. Prior to the inoculation of the strains with analyzed compounds containing CLT, the fungal strains were grown at 35 °C on Sabouraud agar.

Antifungal activity was evaluated by the disk diffusion assay according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). The fungal reference strains, such as *C. albicans* ATCC 90028 and *C. glabrata* ATCC 2001, were cultured on Sabouraud dextrose agar and incubated at 35 °C for 24 h. A single colony from an overnight fungal culture plate was seeded into 5 mL of an appropriate prewarmed growth medium broth (Sabouraud). Next, the cell density of the inocula was adjusted using a validated autocalibrated turbidimeter, assuring a 0.5 McFarland standard. Then the suspension was diluted 1:10 in sterile distilled water to yield $(1-5) \times 10^5$ CFU/mL. Using a sterile swab, cultures were spread evenly onto prewarmed 37 °C Sabouraud agar plates. Finally, the different disks (diameter 5 mm), previously impregnated with formulations E, M containing 1400 μg of CLT, and J containing 480 μg of CLT were placed in triplicate in the inoculated agar, and the dishes were left in an incubator at 37 °C. Standard disks of 480 and 1400 μg of tablet (Clotidal Max, CLT 500 mg vaginal tablet, USP Health) were used as a positive control. After 16, 24, and 42 h of incubation, in the case of J gel, additionally, after 7 days, the diameters of the inhibition zone presented by the tested substances were measured in millimeters, which are reported as inhibition halos.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Preparation of Aqueous Formulations of CLT with Aryl-Enriched HbPGLs. For our investigations, we

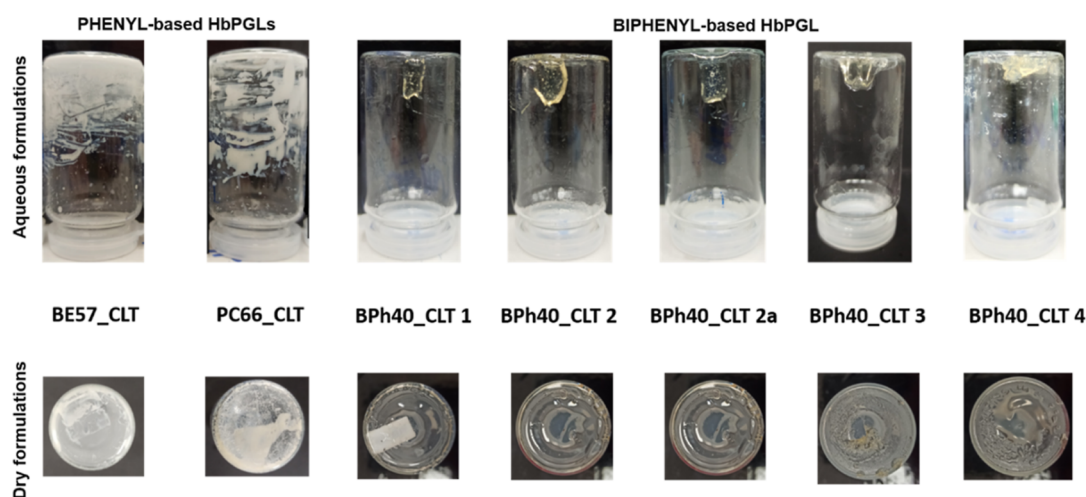


Figure 1. Pictures of the aqueous formulations of clotrimazole with internally aryl-enriched hyperbranched polyglycidols.

applied HbPGL ($M_w = 12,000$) of significantly hydrophobized monohydroxylated units present in the linear constitutional units, *i.e.*, L_{13} and L_{14} (Scheme 1), with benzoyl chloride, phenyl isocyanate, and biphenyl isocyanate at the degree equal to 57, 66, and 40 mol %, respectively, obtaining the following BE57, PC66, and BPh40 HbPGL derivatives (Table 1).

Our previous studies have shown that for the formation of hydrogels based on CLT-loaded HbPGL in monohydroxylated units that were hydrophobized at lower degrees, and suitable as drug carriers for intravaginal therapy, the usage of the second cross-linkable component was needed.²² The encapsulation of CLT in highly hydrophobized HbPGLs leads to an evident increase of the viscosity. Therefore, here, we focus on the explanation of cross-linking mechanisms observed for highly aryl-enriched HbPGLs *via* CLT encapsulation and acquaintance with the knowledge of the characteristics of the obtained drug formulations, such as the rheological properties, and antifungal activity, along with the determination of the CLT state. Understanding the nature of these constructs is extremely important because of their high potential for biomedical applications due to their simplicity of composition.

The hydrophobization of the HbPGL core required the protection of 1,2-diol moieties of terminal units (35 mol % of all repeating units) to avoid the modification of the HbPGL shell. It was achieved by the protection of diol groups in the form of acetals in the reaction with solketal catalyzed with PTSA. The protection of terminal units was verified using ^{13}C INVGATE NMR spectroscopy to ensure that the hydrophobization of HbPGL was performed in the core of macromolecules. The detailed spectroscopic analysis of each hydrophobized HbPGL at each reaction step is given in the Supporting Information (Figures S1–S12).

3.2. Preparation of Aqueous Drug–Polymer Formulations. CLT was encapsulated within aryl-enriched HbPGL using a solvent evaporation method²³ using methanol as a good solvent for both drug and polymer. Among all investigated formulations, a molar ratio of drug/macromolecule equal to 32 was optimal to obtain uniform gel-like structured fluids for all HbPGL derivatives of significantly reduced flow properties. The phenyl-HbPGL-based formulations were opaque (Figure 1). Surprisingly, the BPh40 derivative formed a homogeneous and transparent formulation (Figure 1) at the abovementioned drug–polymer molar ratio. The transparency of BPh40-based formulation inputs that the

applied polymer matrix is compatible with CLT, improving its solubility in the aqueous medium. In addition, we prepared the BPh40-based formulations by applying a lower molar fraction of drug molecules to a macromolecule (Table 2). Despite the

Table 2. Chemical Composition of the Aqueous Drug Formulations of Internally Hydrophobized Hyperbranched Polyglycidol with Phenyl and 4-Biphenyl Groups

formulation	molar ratio of CLT to $h\text{HbPGL}$	$m_{h\text{HbPGL}}/V_{\text{H}_2\text{O}}$, g/mL	$m_{\text{CLT}}/V_{\text{H}_2\text{O}}$, g/mL
BE57_CLT	32	0.496	0.317
PC66_CLT	32	0.496	0.317
BPh40_CLT_1	8	0.496	0.093
BPh40_CLT_2	16	0.496	0.176
BPh40_CLT_2a	16	0.248	0.088
BPh40_CLT_3	24	0.496	0.248
BPh40_CLT_4	32	0.496	0.317

significant reduction of the molar fraction of the drug in the formulations, the obtained systems also displayed a gel-like character. Even the significant dilution of both the polymer and drug (Table 2) resulted in the formation of a stable gel-like formulation.

3.3. Rheological Characterization of Aqueous Drug–Polymer Formulations. Aqueous solutions of the neat copolymers BE57, PC66, and BPh40 at a concentration of 500 mg/mL are low-viscosity Newtonian liquids (Figures 2 and S13). The incorporation of CLT within hydrophobized HbPGL derivatives (drug–polymer molar ratio = 32) *via* a solvent evaporation method resulted in an evident reduction of the flow properties of all hydrated drug–polymer formulations as an effect of the increased viscosity.

Rheological investigations of aqueous formulations of CLT with HbPGL internally hydrophobized with aryl moieties, *i.e.*, the benzoyl (BE57), phenylurethane (PC66), and 4-biphenylurethane (BPh40) groups, respectively, revealed the non-Newtonian behavior (Figures 2 and S13). Obtained aqueous clotrimazole– $h\text{HbPGL}$ formulations are structural fluids, *i.e.*, pseudoplastic or Bingham fluids.^{24,25}

It is noteworthy that all aqueous CLT formulations with aryl-based HbPGLs are shear-thinning (Figures S13, 2, and 3), which means that the viscosity of each fluid decreases with the increasing shear rate. The rheological properties of the liquid

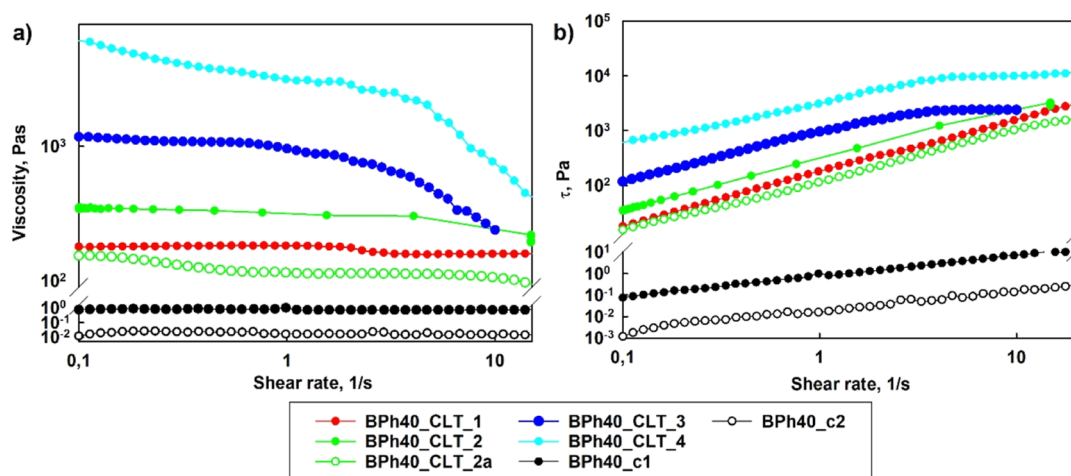


Figure 2. Dependence of viscosity (a) and stress (b) on the shear rate recorded at 37 °C for the aqueous solutions of BPh40 and aqueous formulations prepared of clotrimazole-loaded BPh40.

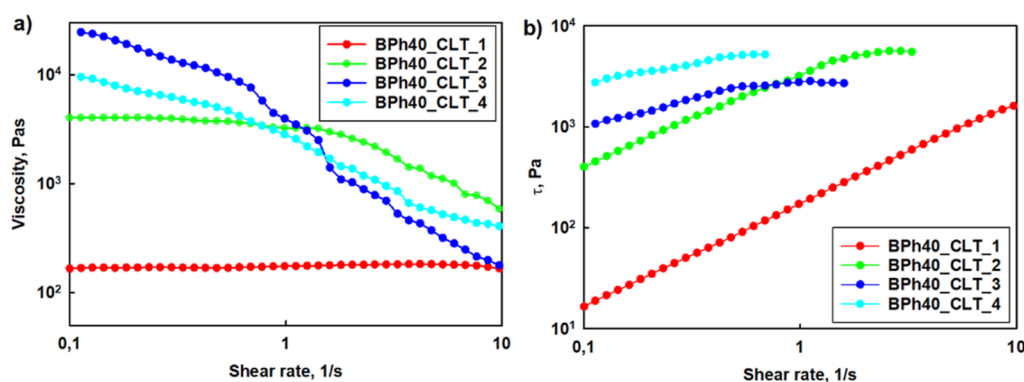


Figure 3. Dependence of viscosity (a) and stress (b) on the shear rate recorded at 25 °C for the aqueous solutions of BPh40 and aqueous formulations prepared with clotrimazole-loaded BPh40.

formulations indicated that they can be injected into the target site, and therefore these systems seem to be suitable for vaginal use, ensuring easy distribution of the preparation on the surface of the affected tissue.²⁶

In the case of phenyl-enriched HbPGL derivatives, a higher increase in the viscosity of the aqueous solution was observed for PC66 in comparison to that for BE57 (Figure S13). Zero shear viscosity (η_0), determined by the extrapolation of the viscosity vs shear rate dependence to the shear rate equal 0, was equal to 0.08 and 0.33 Pa s for the aqueous formulations based on BE57 and PC66 derivatives, respectively (Figure S13). Encapsulation of CLT led to an increase of viscosity to 0.77 and 49.50 Pa s for BE57-CLT and PC66-CLT, respectively. Compared to phenyl-enriched HbPGL derivatives, the increased viscosity effect of the aqueous solution of biphenyl-modified HbPGL upon CLT loading (at the same drug–polymer molar ratio) was even stronger, despite the lower degree of hydrophobization of monohydroxylated HbPGL units. These data indicate that for biphenyl-modified HbPGL, the intermolecular cross-linking ability of internally hydrophobized HbPGL macromolecules with CLT was enhanced.

It could be concluded that, in addition to the effect of CLT on the structural properties of the fluids obtained, the size of the aryl group incorporated into the core plays a key role in the formation of structured fluids. In addition, it seems that the higher the molar fraction of monohydroxylated units remaining

intact, the higher the fraction of absorbed water. We demonstrated that the usage of a lower amount of drug for the preparation of the BPh40 formulation, *i.e.*, BPh40-CLT_2, resulted in the formation of a stable, transparent drug carrier. In contrast to phenyl-based HbPGL derivatives, HbPGL hydrophobized with biphenyl moieties was able to maintain water in the formulation despite the decrease of the drug weight to water volume ratio, *i.e.*, from 0.317 g/mL (BPh40-CLT_4) to 0.093 g/mL (BPh40-CLT_1), respectively. The decrease in the concentrations of fluid components, *i.e.*, both polymer and drug, at the same drug–polymer ratio (BPh40-CLT_2a), resulted in the formation of a stable homogeneous formulation but of a lower viscosity. It has been shown that it is easier to obtain an optimal composition of the drug formulation. In addition, in contrast to the BPh40-CLT formulation, phase separation was observed for phenyl-HbPGL derivative-based drug formulations over long-time storage.

This extended stability makes biphenyl-HbPGL a very promising polymer for the construction of two-component CLT formulations. To demonstrate the effect of CLT on the behavior of aryl-modified HbPGL macromolecules in aqueous solutions, we prepared a series of formulations based on BPh40 in a constant polymer fraction, however, differing in the molar ratio of drug to polymer from 8 (BPh40-CLT_1) to 32 (BPh40-CLT_4). Zero shear viscosity of drug formulations based on BPh40 gradually increased from 183, 353, to 1080 Pa

s at body temperature for formulations with the drug at a molar fraction as follows: 8, 16, and 24, respectively (Table 3).

Table 3. Zero Viscosity Values (η_0) of Formulations Based on Clotrimazole-Loaded Aryl-Modified Hyperbranched Polyglycidols with the Indication of a Presence of the Yield Point (τ_c) Determined at 37 °C^a

aqueous formulation	molar ratio of CLT to copolymer	η_0 , Pa s (37 °C)	τ_c , Pa (37 °C)
BE57_c1	0	0.08	
PC66_c1	0	0.33	
BPh40_c1	0	0.79	
BPh40_c2	0	0.03	
BE57_CLT	32	0.77	
PC66_CLT	32	49.50	
BPh40_CLT 1	8	183	
BPh40_CLT 2	16	353	2.72 ± 0.22
BPh40_CLT 2a	16	156	2.16 ± 0.45
BPh40_CLT 3	24	1080	13.62 ± 0.49
BPh40_CLT 4	32		329 ± 5.0

^aBE57_c1 = PC66_c1 = BPh40_c1 = 500 mg/mL; BPh40_c2 = 250 mg/mL.

The dependence of stress (τ) on the shear rate revealed that the properties of the drug formulation can be modulated not only with the amount of drug used in the formulation but also on thermal conditions (Figures 2b, 3b, and S13 and Tables 3 and S1). Such CLT formulations as BPh40_CLT 2, BPh40_CLT 3, and BPh40_CLT 4 exhibit the yield point at room temperature, which was equal to as follows: 76, 653, and 2363 Pa. At 37 °C, the yield point decreases to 2.7, 13.6, and 329 Pa, respectively. The CLT fluid formulations showing the yield point are Bingham fluids. The other formulations based on aryl-hydrophobized HbPGLs behave as pseudoplastic fluids.

It is noteworthy that in the case of formulations being Bingham fluids at 37 °C, their flow can be merely triggered by exceeding the stress of the yield point, *i.e.*, a critical stress value that is needed to break the structure. It is assumed that

uncontrolled release of the drug formulation upon administration in the vagina is impossible, as is typical for used gynecological suppositories. The viscosity of other formulations, *i.e.*, fluids that did not exhibit the yield point, is high enough to maintain the drug carrier in the vagina. For example, the flow rate of the BPh40_CLT 2a formulation (zero shear viscosity $\approx$ 156 Pa s) of 2 mm thickness and 5 cm wide flowing on the surface inclined at $\theta = 90^\circ$ to the horizontal is approximately 1.2 $\mu\text{g}_{\text{fluid}}/\text{h}$.

The rheological properties of drug carriers based on the structured fluids point out that they can be maintained longer in the afflicted area of the vagina compared to traditional suppositories, which are required to be administered very often, as their content is very often removed in an uncontrolled manner. The prolonged residence time of an active substance with a diseased site is of great importance in ensuring the transport of drug molecules and thus increasing the efficiency of therapy.

A temperature sweep study performed for biphenyl-based formulations revealed the dominant nature of viscous properties in a wide range of temperatures ($G'' > G'$), Figure 4. Based on the fact that the viscosity of each formulation decreased with the increasing temperature, we stated that the CLT formulation with biphenyl-modified HbPGL displayed thermosensitive behavior. However, due to the fact that the slope of the dependence of the complex viscosity *versus* temperature determined for the neat BPh40 is similar compared to its formulation with the drug, it can be concluded that the thermosensitive character is governed by intra- and inter-molecular hydrogen bonds in which the polymer itself is involved.

3.4. FT-IR Study of Structured Fluids Based on CLT-Loaded Hydrophobized HbPGLs. To evaluate the distribution of CLT in internally aryl-enriched HbPGLs, we performed a detailed FTIR analysis, recording spectra of dry copolymers, dry CLT–copolymer mixtures, and their aqueous formulations, along with spectra of CLT in the crystalline form and dissolved in methanol. The FTIR spectrum of CLT in crystalline form differs significantly from that of CLT dissolved

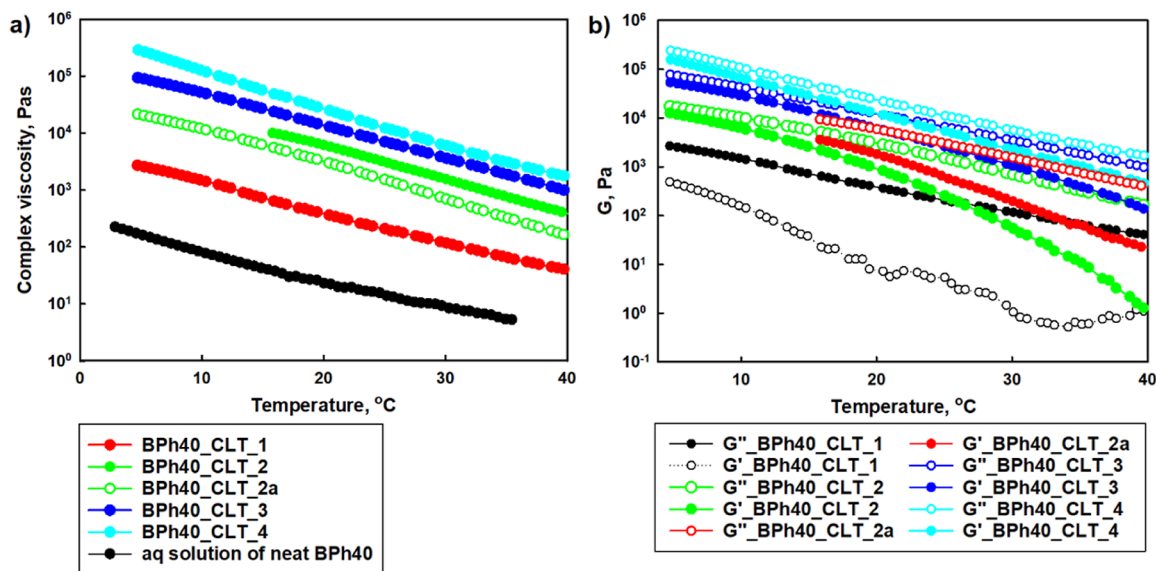


Figure 4. Dependence of storage (G') and loss modulus (G'') (a) and complex viscosity (b) on the temperature recorded for the aqueous formulations prepared of clotrimazole-loaded BPh40.

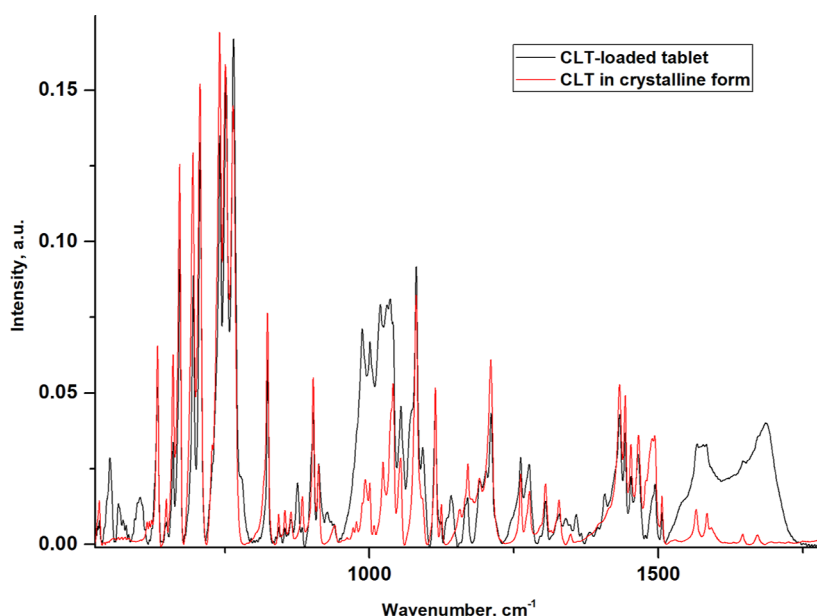


Figure 5. Comparison of the FTIR spectrum of a commercially available clotrimazole-loaded tablet (Clotidal MAX) and the FTIR spectrum collected for clotrimazole in the crystalline state.

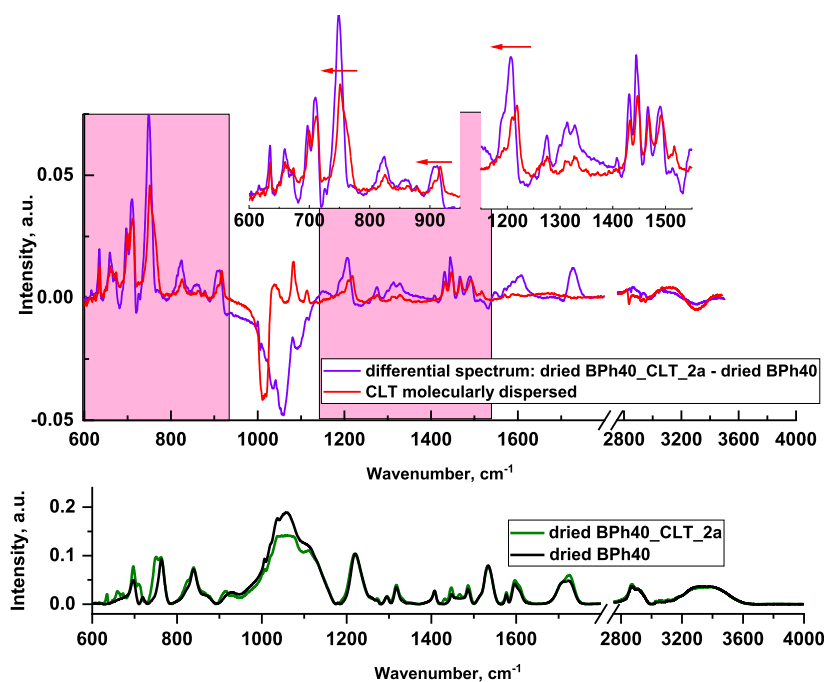


Figure 6. Comparison of FTIR spectra of dried, neat BPh40, and BPh40 loaded with clotrimazole (bottom). Differential spectrum of the FTIR spectra is shown in the bottom chart compared with the FTIR spectrum of clotrimazole in a molecularly dispersed state. Spectral regions where the clotrimazole lines sensitive to intermolecular interactions occur are zoomed in insets.

in methanol, *e.g.*, molecularly dispersed (Figure S14). We distinguished the difference in the spectra of CLT in the crystalline and in the dissolved state in the range of the wavenumbers from 720 to 780 cm^{-1} , *i.e.*, for crystalline CLT, a triple-band was observed in this range, whereas for dissolved CLT, a single broad band was typical. We established that subtracting the FTIR spectrum of the hydrophobized polymer from that of its mixture with the drug yields the extracted CLT spectrum, which can provide information about the state of the drug molecules in the investigated formulations, *i.e.*, whether drug molecules inside the polymer carrier exist in crystalline

form or are molecularly dispersed like in the solution. This approach can provide knowledge about the compatibility of the polymer with CLT. The extraction of the spectrum obtained for the aqueous solution of copolymer from the spectrum of the aqueous drug–copolymer formulation allows evaluation of the CLT state in the aqueous polymer-based formulations.

A comparison of the FTIR spectrum in the range of wavenumbers from 720 to 780 cm^{-1} of commercially available formulations containing CLT (Clotidal MAX) and the spectrum collected for CLT in powder (Figure 5) confirmed that the drug formed crystals in both. The FTIR differential

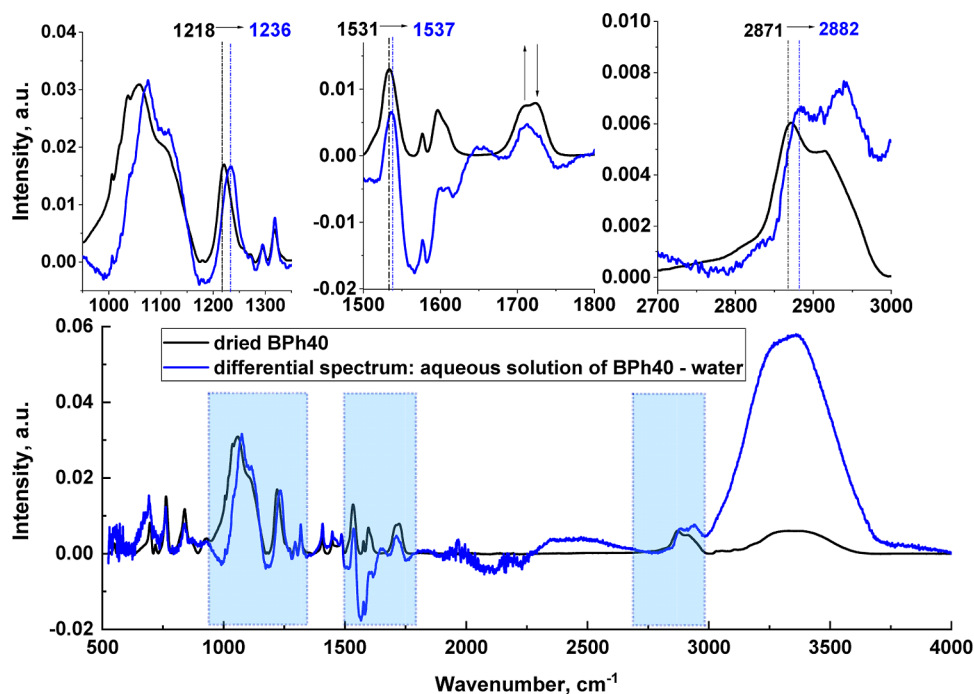


Figure 7. FTIR spectrum of BPh40 in dry and hydrated states. Insets show the spectral regions where the bands of the BPh40 polymer are sensitive to hydration.

spectra obtained for CLT formulations based on phenyl-HbPGLs, *i.e.*, BE57 (Figure S15) and PC66 (Figure S16) copolymers, also revealed that CLT occurs in the polycrystalline state in the matrix of both in dry and aqueous states. Despite the significant hydrophobization degree of internal monohydroxyl groups of HbPGL with the phenyl groups incorporated *via* ester (57 mol %, 35 of hydrophobized units per macromolecule) or urethane bonds (66 mol %, 41 of hydrophobized units per macromolecule), these amphiphilic constructs are not promising as solubilizing matrices for poorly water-soluble CLT. CLT formulations based on phenyl-enriched HbPGLs were opaque in both dry and aqueous conditions, which confirmed the lack of phenyl-enriched HbPGL compatibility with the drug in the investigated molar ratio of the drug to polymer, *i.e.*, 32:1. CLT formulations based on biphenyl-enriched HbPGL derivatives, that is, HbPGL whose monohydroxylated units in the core were hydrophobized to a lower degree, were transparent at room temperature regardless of the molar ratio of drug molecules per one macromolecule, *i.e.*, 8:1, 16:1, 24:1, and 32:1. Subtraction of the spectrum of biphenyl-enriched HbPGL from that of its mixture with CLT performed for dried BPh40_CLT_2a and BPh40_CLT_4 mixtures provided a spectrum of CLT characteristic for its well-solubilized form, *i.e.*, such as that obtained in the methanolic solution (Figures 6 and S17). Undoubtedly, it indicates that CLT was molecularly distributed in the dry BPh40 matrix despite the amount of encapsulated drug in the broad range of concentrations.

The comparison of the FTIR spectrum of CLT obtained after subtraction of the spectrum of methanol from the spectrum of CLT loaded in the dry BPh40 carrier shows very good agreement, and only the shifts are observed within the bands located around 750, 920, and 1200 cm^{-1} . These lines may be assigned to the stretching of C–Cl groups (750 cm^{-1})⁷ and C–H and C–N groups in the imidazole ring (917 and 1206 cm^{-1} , respectively).²⁷ These lines are sensitive to

interactions with the environment. Their shift is indirect evidence of the interaction of the polymer carrier with the drug through halogen bonds and probably through the imidazole ring. The shift toward lower wavenumbers of the bands originating from the C–Cl bond (750 cm^{-1}) is typical for the formation of halogen bonds between Cl and a nucleophile in the system (O, N, or Ph).^{28,29} The other CLT bands are located at the same wavenumbers independently of the environment, which confirms that the signal processing used is correct.

To study the behavior of BPh40 in the formulation with the drug, the vibrational spectra of dry BPh40 and dry BPh40 loaded with CLT were compared (Figure 6). The observed changes, *i.e.*, a shift of the bands 1540 and 1750 cm^{-1} (combination of N–H bending with C–N stretching and C=O stretching, respectively)^{30,31} toward higher wavenumbers indicate the breaking of intramolecular hydrogen bonds. Moreover, a shift of the band around 1220 cm^{-1} (C–O–C stretching)^{30,31} toward lower wavenumbers confirms the breaking of hydrogen bonds and the transfer of charge toward the chain, thus shortening the C=O bonds and lengthening the C–O–C located next to it.^{32,33}

In the next step, we focused on the behavior of both CLT and BPh40 in their aqueous formulations. The position of the bands assigned to CLT in the polymer formulation is independent of the presence of water in the environment. This proves that CLT molecules remain bound to the polymer carrier after the addition of water. Moreover, these aqueous drug formulations were stable without precipitated CLT being detected with the naked eye.

To monitor the polymer hydration, a comparison of the normalized FTIR absorption spectrum of neat BPh40 and the differential spectrum of its aqueous solution (the spectrum obtained by the extraction of the water spectrum from the spectrum related to the BPh40 aqueous solution), as shown in Figure 7 was needed. Vibrations of highly polar groups, such as

ether or carbonyl groups, should be the most sensitive to water. Their characteristic bands in the FTIR spectrum of neat BPh40 occur at 1218 (stretching of C–O–C groups), 1531 (combination of bending of N–H and C–N stretching vibrations), and 1750 cm^{-1} (stretching of C=O group).^{30,31} The first two signals shift toward higher wavenumbers, *i.e.*, to 1236 and 1537 cm^{-1} , respectively, which can be explained by the interaction of the ether and amide groups with water *via* hydrogen bonds.^{30,31} These observations are confirmed by the changes observed in the spectral regions related to the stretching of the C=O groups and the stretching of the CH_x groups (spectral region 2800–3000 cm^{-1}). In the first mentioned spectral region, changes in the relative intensities of bands located at 1710 cm^{-1} related to C=O groups involved in the H-bond formation and 1725 cm^{-1} assigned to free C=O groups, *i.e.*, which are not involved in the H-bonding, occur. In the high-wavenumber region, the so-called improper blue shift of line 2871 cm^{-1} (to 2882 cm^{-1}) is observed. This effect has been discussed previously.^{33–35}

For comparison, the FTIR spectra of BE57 and PC66 in both dry and hydrated states are given in Figures S18 and S19, respectively. In the case of BE57, its characteristic bands in the FTIR spectrum occur at 1272 (stretching of C–O–C) and 1713 cm^{-1} (stretching of C=O group).³⁶ The first signal shifts toward higher wavenumbers (1277 cm^{-1}), which can be explained by the interaction of the ether groups with water *via* hydrogen bonds. This observation is confirmed by the changes observed in the spectral regions related to the stretching of the C=O groups and the stretching of CH_x groups (spectral region 2800–3000 cm^{-1}). Analysis of the second characteristic band shows changes in the relative intensity of bands located at 1667 cm^{-1} assigned to C=O groups involved in the H-bond formation and at 1713 cm^{-1} characteristic for free C=O groups. The intensity of the first line increases, while the intensity of the second line decreases slightly. The FTIR spectrum of PC66 does not differ significantly from the FTIR spectrum of BPh40. The characteristic bands for phenylurethane derivative occur at 1220 (stretching C–O–C groups), 1544 (combination of bending of N–H and C–N stretching vibrations), and 1720 cm^{-1} (stretching of C=O group). In the case of PC66, the hydrogen bond formation between ether and amide groups with water is also, as mentioned above, proved by signals shift toward higher wavenumbers (1230 and 1548 cm^{-1}). Additional confirmation of this interaction is shown by the changes observed in the spectral region related to the stretching of the C=O groups and the stretching of CH_x groups (spectral region 2800–3000 cm^{-1}). Also, changes in relative intensities of bands located at 1708 cm^{-1} assigned to C=O groups involved in hydrogen bond formation and 1723 cm^{-1} ascribed to free C=O groups, which are not involved in H-bonding, confirm the presence of interaction between water and polymer.

In the final step, the spectrum of the aqueous formulation BPh40_CLT_2a with the spectra of the hydrated polymer, water, and dry BPh40 was compared (Figure S20). Such an approach allowed us to evaluate how the presence of the hydrophobic drug in the polymer structure influenced polymer hydration. The bands visible in the spectrum of the aqueous drug–polymer formulation at 1540 cm^{-1} (assigned to N–H and C–N groups) and 1240 cm^{-1} (C–O–C groups) are significantly shifted toward higher wavenumbers in relation to neat BPh40, which evidenced their good hydration.^{32,33} However, these shifts are smaller than those in the case of

the BPh40 aqueous solution. This observation leads to the conclusion that the polymer in the aqueous drug-BPh40 formulation exhibits a more hydrophobic behavior than the polymer itself in water. It means that the CLT interacting with the BPh40 affects the polymer carrier, making it more hydrophobic.

A comparison of the FTIR spectra of the aqueous solution of PC66 with the spectrum of its structured fluid with CLT, water, and dried PC66 is shown in Figure S21. It should be noticed that the bands sensitive to polymer hydration, namely, lines assigned to C–O–C stretching (at 1220 cm^{-1}), combinations of N–H bending with C–N stretching (1540 cm^{-1}), and C=O stretching (1720 cm^{-1}) occur at the same wavenumbers in the FTIR spectra of both the polymer solution and its structured fluid. It proved that PC66 hydration is not significantly affected by the presence of CLT. It is not surprising, taking into account that the CLT crystallizes inside this carrier. The FTIR spectra of the aqueous solution of BE57, its structured fluid with CLT, water, and dried BE57 were also compared (Figure S22). The structured fluid constructed of BE57 macromolecules exhibited a more hydrophobic behavior in comparison to PC66 and, as a result, contained a smaller water content. Line positions characteristic for C=O and C–O–C stretching (1720 and 1260 cm^{-1} , respectively) have maxima at the same wavenumber as for the dry polymer. It proved that BE57 is not well hydrated in the formulation.

The biphenyl-enriched HbPGL, due to the presence of a hydrophobic surface generated by two aryl rings in a single incorporated hydrophobic moiety compared to a single aryl group (in the case of phenyl-modified HbPGLs), was able to interact more effectively with CLT. In addition, a higher molar fraction of intact monohydroxyl groups in the HbPGL core and peripheral diol groups in the macromolecule's corona made BPh40 able to readily absorb water. From one side, structured fluid formulations based on BPh40 drug mixtures are well-swollen with water, and from another side, the polymer construct ensures effective encapsulation of CLT. It seems that in addition to the urethane group, which is prone to hydrogen bonding, aryl–aryl interactions between aromatic moieties of polymers and drugs can play an additional role in drug–polymer interactions.

Finally, the chemical structure of the polymer carrier significantly affects the ability of the drug to crystallize. Contrary to phenyl-based HbPGL, the biphenyl-based carrier protects CLT against crystallization, which is a strongly needed property, allowing for better drug release control, bioavailability, and, consequently, a better biological response.

This study shows that the balance between the degree of hydrophobization of HbPGL, the hydrophobic nature of the incorporated groups, such as the size of the aromatic surface, and the linkage *via* which a hydrophobic moiety is incorporated is of great importance in obtaining a promising therapeutic formulation.

Given that the solubility of CLT in water is 0.49 $\mu\text{g/mL}$,⁹ and the concentration of CLT in formulations with BPh40 varied from 0.062 to 0.211 g/mL, assuming that the entire amount of CLT is molecularly dispersed in the formulation, this means that we have increased the solubility of CLT by at least 127,000 times.

3.5. DSC Study of Formulations Based on Hydrophobized HbPGL with CLT. The DSC analysis performed for neat CLT showed a sharp endothermic peak at 145.5 °C on first heating, which corresponds to its melting point. Since neat

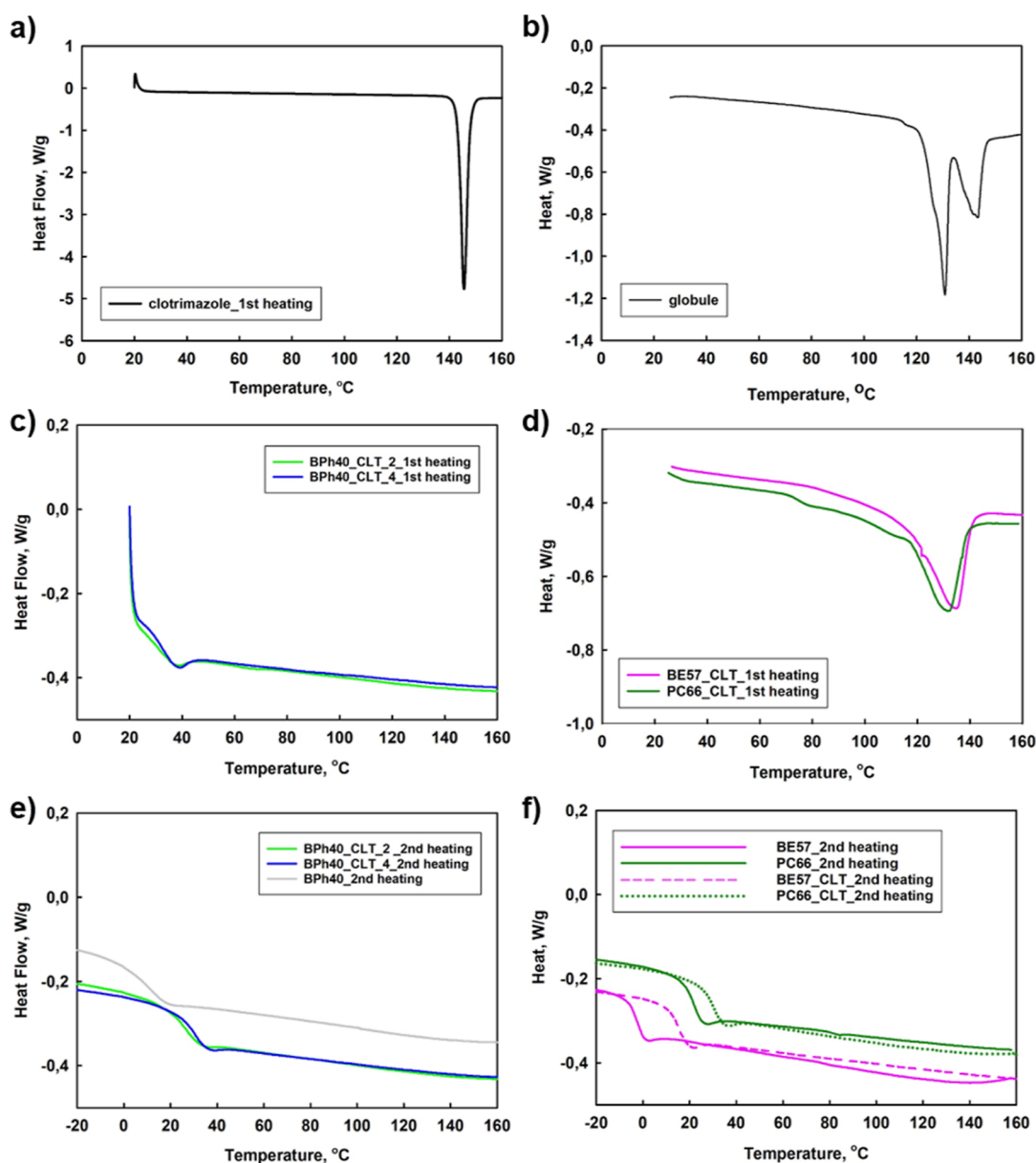


Figure 8. DSC thermograms at first heating recorded for neat clotrimazole (a), clotrimazole-loaded tablet (b), and clotrimazole-hydrophobized HbPGL formulations recorded at first (c,d) and at the second heating (e,f), respectively.

CLT was not able to crystallize at the applied cooling rate, *i.e.*, 10 °C/min, the state of CLT in polymer-based formulations with polymers was investigated in the first heating scan. Thermograms of CLT formulations based on HbPGL hydrophobized with phenyl groups incorporated *via* both ester and urethane bonds revealed the presence of the endothermic peak in the first heating scan starting from room temperature. In comparison to neat CLT, the endothermic peak was broader and shifted to a lower temperature, *i.e.*, 134 °C. DSC thermograms facilitated the determination of the degree of crystallinity of CLT in the formulations based on phenyl-enriched HbPGLs, which is equal to 84 and 93% for benzoyl ester and phenyl urethane HbPGL derivatives, respectively. The lack of an endothermal peak of CLT in DSC thermograms obtained for formulations based on biphenyl-enriched HbPGL confirmed the molecular distribution of encapsulated drug molecules within amphiphilic macromolecules, which is consistent with previously reported

results³⁷ and the FTIR results shown above. In addition, despite the amount of drug encapsulated within the construct BPh40, *i.e.*, 16 and 32 molecules per macromolecule, the drug was molecularly distributed.

The DSC study confirmed the enhanced solubilization of CLT in the hydrophobized HbPGLs enriched with aryl groups; however, the size of the biphenyl moiety was crucial in the proper distribution of drug molecules within the amphiphilic HbPGL's construct.

It is noteworthy that CLT incorporated into amphiphilic HbPGLs affected the glass transition of each of the copolymers used, which was investigated in the second heating scan (Figure 8). For example, for formulations in which the molar ratio of drug to macromolecule was 32, the T_g of BE57 and BPh40 increased from −2.8 to 15.6 °C and from 9.2 to 29.3 °C, respectively. The increase in T_g of each polymer upon CLT encapsulation is evidence of interactions between the drug and copolymer, and thus, the segmental mobility of macro-

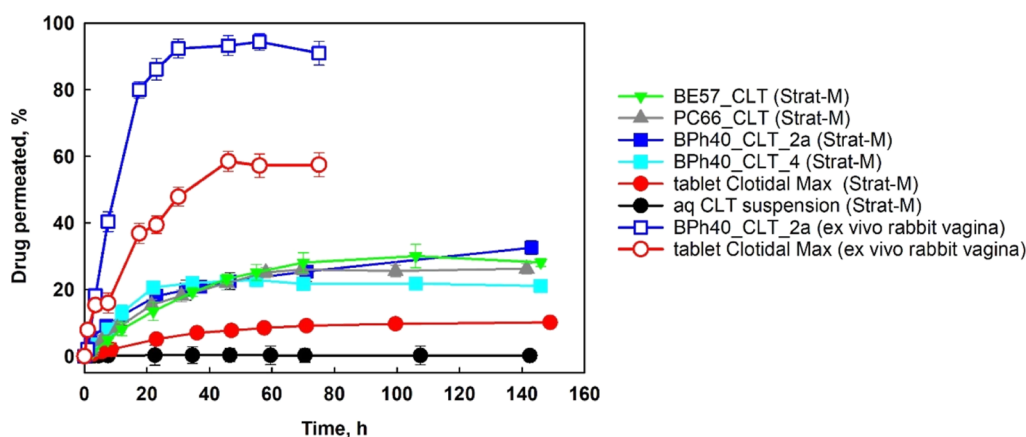


Figure 9. Results of a clotrimazole permeability study of various drug formulations using the Strat-M membrane or *ex vivo* rabbit vagina.

molecules in the prepared formulations is markedly slowed down.

3.6. In Vitro Transdermal Permeation Study. To estimate the bioavailability of CLT entrapped in the structured fluids in comparison to the commercially available CLT-loaded tablet, Clotidal Max, we performed *in vitro* permeability experiments of drug molecules from different carriers across the Strat-M membrane, *i.e.*, a synthetic nonanimal-based model for transdermal diffusion testing that is predictive of diffusion through the skin using the Franz diffusion cell. The study revealed that the level of CLT permeation through the membrane is significantly increased in the case of CLT incorporated into the matrix of aryl-enriched HbPGL-based structured fluids (Figure 9). These data indicate that hydrophobized HbPGLs are potential enhancers for the trans mucosal delivery of CLT, and therefore CLT loaded in structured fluids is more bioavailable and can increase the efficiency of antifungal therapy. To quantify the impact of the drug carrier on the ability of CLT permeation through the membrane related to the permeation of CLT suspended in water or loaded in the form of commercially available formulation, we calculated the permeability constant, K_p ($K_p = \frac{Q}{A \cdot t \cdot C_0}$, where Q is the amount of drug transported through the membrane in time t , A is the area exposed membrane, and C_0 —donor concentration). K_p for CLT entrapped in structured fluids was approximately 5 times higher than it was observed for CLT loaded into a commercially available over-the-counter tablet and 50 times higher compared to CLT suspended in water (Table 4). The highest values of K_p were detected for CLT, which was loaded in the formulations based on biphenyl-modified HbPGL, *i.e.*, 3.03×10^{-5} and 3.35×10^{-5} cm/min, respectively. The flux ($J = \frac{Q}{A \cdot t}$) of CLT enclosed in the PC66-based fluid was 2.24×10^{-4} mg/cm² min, whereas the flux of CLT from BPh40_CLT_4 was equal to 3.03×10^{-4} mg/cm² min. The flux of CLT was the lowest from the tablet and from the aqueous suspension and was equal to 6.16×10^{-5} and 1.62×10^{-6} mg/cm² min, respectively (Table 4).

Due to the fact that formulations based on biphenyl-hydrophobized HbPGL are the most prospective for the intravaginal therapy, we additionally performed an *ex vivo* permeability test for BPh40_CLT_2a as the representative sample among biphenyl-HbPGL formulations and a Clotidal MAX tablet using excised rabbit vaginal tissue. Similarly to the

Table 4. Comparison of the Permeability Constant (K_p) of CLT from Different Formulations Permeated through an *In Vitro* STRAT-M Membrane or *Ex Vivo* Rabbit Vagina

matrix	membrane	K_p clotrimazole ^a cm/min	J , mg/cm ² min
BE57_CLT	Strat-M	2.00×10^{-5}	1.76×10^{-4}
PC66_CLT	Strat-M	2.49×10^{-5}	2.24×10^{-4}
BPh40_CLT_2a	Strat-M	3.14×10^{-5}	2.83×10^{-4}
BPh40_CLT_2a	<i>ex vivo</i> rabbit vagina	1.30×10^{-4}	1.08×10^{-3}
BPh40_CLT_4	Strat-M	3.36×10^{-5}	3.03×10^{-4}
tablet (Clotidal Max)	Strat-M	6.85×10^{-6}	6.16×10^{-5}
tablet (Clotidal Max)	<i>ex vivo</i> rabbit vagina	5.08×10^{-5}	4.57×10^{-4}
aqueous suspension of clotrimazole	Strat-M	6.73×10^{-7}	1.62×10^{-6}

permeability results obtained with the STRAT-M membrane, the formulation based on biphenyl-HbPGL assured better drug permeability through rabbit vaginal mucosa compared to a commercially available tablet. It is noteworthy that higher trans mucosal transfer of CLT through the rabbit vagina was observed than through the Strat-M membrane for both drug formulations (Figure 9). The determined K_p of CLT permeated through rabbit mucosa from biphenyl-hydrophobized HbPGL-based structured fluid was approximately 3-fold higher than observed for CLT permeated from the tablet.

Permeability tests using both the artificial transdermal membrane and the *ex vivo* vagina mucosa undoubtedly show that structured fluids based on aryl-enriched HbPGLs unimolecular micelles with CLT can ensure sustained delivery of the bioactive compound to the afflicted area.

This behavior can be strictly ascribed to enhanced solubility of CLT in the aqueous medium using one polymer component for the construction of drug carriers.

3.7. Retention of Structured Fluids under Conditions of Simulated Vaginal Fluid. Among all investigated structured fluids constructed of hydrophobized HbPGLs, biphenyl urethane-based systems turned out to be the most perspective for intravaginal therapy in view of CLT solubility in the aqueous medium, rheological behavior, and permeability properties. Due to this fact, we investigated the retention of such constructed structured fluid in simulated vaginal fluid at 37 °C using the BPh40_CLT_2a sample, as a representative formulation. For this goal, a portion of gel-like formulation

(0.03 g) was placed on a plastic surface and then immersed in 1 mL of simulated vaginal fluid. The sample was incubated for 24 h, at which the permeability plateau was attained, and the maximum CLT permeability was observed at this period of time.

Monitoring the sample at different time intervals allowed for the visual detection of a gradual loss of polymer from the formulation along with obtaining the opacity (Figure 10). It

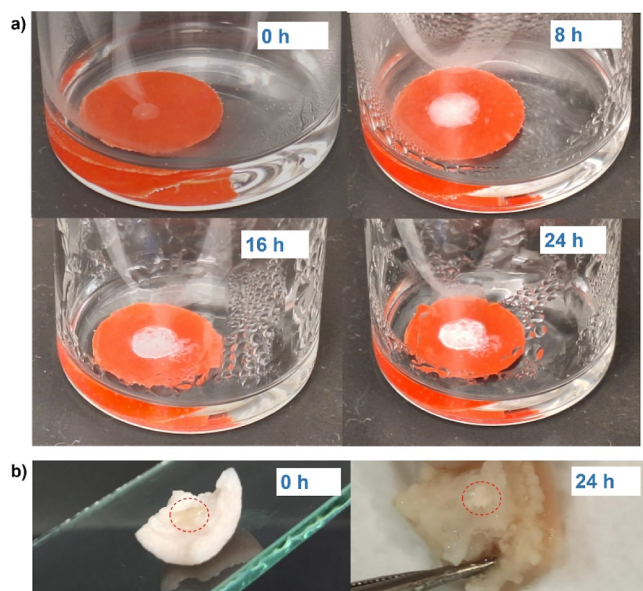


Figure 10. Retention of BPh40_CLT_2a formulation deposited on a plastic disc (a) and porcine skin immersed in simulated vaginal fluid at 37 °C (b).

was detected that the coverage of the disc with a sample doubled in several hours. However, the drug formulation

persisted as a continuous film on the surface. ^1H NMR analysis of the dried residue after 24 h of incubation in SVF showed that it consisted of both drug and polymer. The same behavior was observed for the formulation deposited on the porcine skin.

Due to the fact that *in vivo* vaginal mucosa undergoes recurring cycles of proliferation at the basal layer, maturation, and desquamation into the vaginal lumen, with a turnover time of about 96 h,³⁸ the drug-formulation based on structured fluids based on hydrophobized HbPGLs should be completely removable.

3.8. *In Vitro* Antifungal Activity. To estimate the antifungal potential of the synthesized structured fluids loaded with CLT, we compared their antifungal properties with the activity of over the counter commercially available CLT-loaded tablet, Clotidal MAX. The antifungal activity was validated by the presence of the zone of inhibition against *C. albicans* and *C. glabrata*. Based on the values of the halo zone diameter (Figure 11), it was demonstrated that the antifungal activity of CLT loaded into constructs BE57 and PC66 against both *C. albicans* and *C. glabrata* is comparable to the activity of a commercially available CLT-loaded tablet for the treatment of vaginal and vulvar fungal infections. The halo zone for all constructs and discs with controls remained statistically unchanged for up to 42 h. In the later period, both *C. albicans* and *C. glabrata* showed intensive growth around the discs saturated with constructs BE57_CLT, PC66_CLT containing 1400 μg of CLT, as well as with the commercially used CLT in the tablet in the amount equal to 480 μg as well as 1400 μg . Although at almost every measurement time point, the diameter of the halo zone was higher for *C. albicans*, no statistical significance was observed in relation to the values of the growth inhibition zones obtained for *C. glabrata*. Surprisingly high antifungal activity was observed against both *Candida* strains in the case of construct BPh40_CLT_2a, containing 65% less loaded CLT in comparison to phenyl-enriched HbPGLs, *i.e.*, the

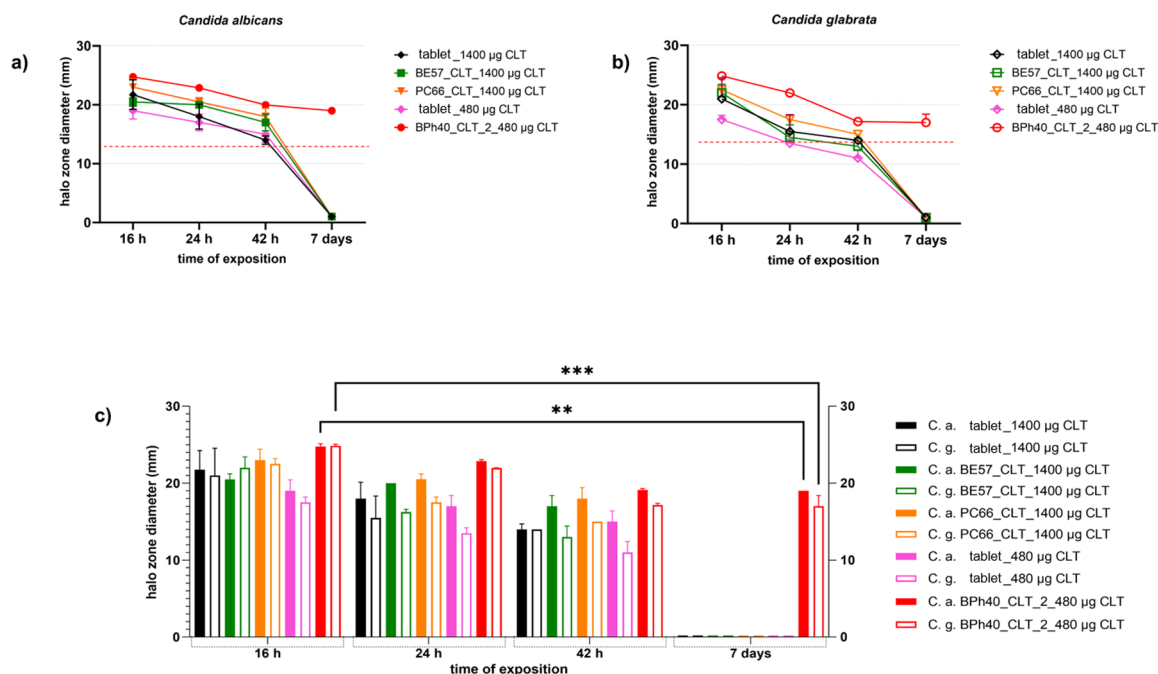


Figure 11. Halo zone diameters determined for clotrimazole-loaded in the tablet and clotrimazole formulations with aryl-modified HbPGLs against *C. albicans* (a) and *C. glabrata* (b) and comparison of anti-*C. albicans* and *C. glabrata* activity of clotrimazole formulations (c).

BES7_CLT and PC66_CLT formulations. Furthermore, it was demonstrated that the growth inhibition zones persisted until the seventh day of the conducted study, which was terminated due to the loss of nutritional properties of the growth medium itself (Sabouraud agar). In each time measurement point, *i.e.*, 16, 24, and 42 h, and 7 days, construct BPh40_CLT_2a exhibited the highest activity against both reference strains of *Candida* used in the experiment. Furthermore, this construct exhibited the highest growth inhibition zone (compared to BES7_CLT and PC66_CLT and the CLT control at both $c = 480 \mu\text{g}$ and $c = 1400 \mu\text{g}$), reaching a value of nearly 25 mm after 16 h. A statistically significant (for *C. albicans* $p = 0.01$ and *C. glabrata* $p = 0.001$) growth increase (22% for *C. albicans* and 32% for *C. glabrata*) around the discs saturated with the constructs BPh40_CLT_2a (approximately: 5.5 mm and 8 mm accordingly) was observed at 42 h in compared to the measurement from the initial time point and remained at an unchanged level until the seventh day of the conducted observation. Based on the obtained results, the construct BPh40_CLT_2a containing CLT at $c = 480 \mu\text{g}$ was selected as a promising agent against *C. albicans* and *C. glabrata*, maintaining a 7 day activity against fungal used strains, which is highly significant in disease management, particularly in female genital tract infections.

4. CONCLUSIONS

In this paper, we have elaborated the method of efficient CLT solubilization in water in the form of structured fluids using HbPGLs of a hydrophobized core with aryl moieties, such as benzoyl ester, phenyl urethane, and biphenyl urethane. The properties of structured fluids were strictly dependent on the type of aryl-HbPGL derivative used. The biphenyl-HbPGL derivative showed the most significantly enhanced CLT solubilization in the aqueous media among the investigated amphiphilic constructs. All CLT formulations constructed of biphenyl-HbPGL derivatives, independently of drug to polymer molar ratio varying from 8 to 32, provided transparent, molecularly dissolved formulations, which was confirmed with FTIR and DSC investigations. In the case of phenyl-based HbPGL derivatives, a minor fraction of the drug was only molecularly dispersed, and most of its amount was in crystalline form. In addition, aqueous formulations of CLT with biphenyl-HbPGL derivatives showed more favorable rheological properties in contrast to those of phenyl-HbPGL derivatives and were more stable under storage conditions. Depending on the molar ratio of the drug to the polymer, the formulation exhibited a yield limit at body temperature or a viscosity that ensured film formation on the vaginal tissue, and therefore, the flow of the drug carrier was limited. Thus, these formulations ensure prolonged action of the active substance with the afflicted site. The percutaneous permeability of CLT loaded in aryl-enriched HbPGLs was significantly increased compared to CLT from its aqueous suspension and CLT present in commercially available tablets, but with no apparent difference between aryl-HbPGL-based systems. The antifungal test showed increased activity of the aqueous biphenyl-HbPGL formulation against *C. albicans* and *C. glabrata* species, but also prolonged activity for up to 7 days of activity with a single dose of the formulation. In this work, we demonstrated a first aqueous formulation requiring the usage of a single polymer component to attain both high drug solubility and rheological properties suitable for intravaginal applications.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.3c19388>.

^1H and ^{13}C NMR spectra of aryl-enriched HbPGLs and intermediate products, additional rheological results, FTIR spectra of aryl-enriched HbPGLs, CLT in both crystalline and in solubilized forms (in methanolic solution), and CLT-loaded in amphiphilic polymers (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Monika Gosecka – Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, 90-363 Lodz, Poland; orcid.org/0000-0002-4358-0987; Email: mdybko@cbmm.lodz.pl

Authors

Daria Jaworska-Krych – Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, 90-363 Lodz, Poland

Mateusz Gosecki – Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, 90-363 Lodz, Poland; orcid.org/0000-0002-4901-4687

Malgorzata Urbaniak – Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, 90-363 Lodz, Poland

Katarzyna Dzitko – Department of Molecular Microbiology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 90-237 Lodz, Poland

Anita Ciesielska – Department of Molecular Microbiology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 90-237 Lodz, Poland

Ewelina Wielgus – Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, 90-363 Lodz, Poland

Slawomir Kadlubowski – Institute of Applied Radiation Chemistry, Lodz University of Technology, 93-590 Lodz, Poland

Marcin Kozanecki – Department of Molecular Physics, Faculty of Chemistry, Lodz University of Technology, 90-924 Lodz, Poland; orcid.org/0000-0001-7400-6315

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.3c19388>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the National Science Centre, Poland (project no. UMO-2018/30/E/ST5/00576). This article was completed while D.J.-K. was the Doctoral Candidate in the Interdisciplinary Doctoral School at the Lodz University of Technology, Poland.

■ REFERENCES

- (1) Parazzini, F.; Di Cintio, E.; Chiantera, V.; Guaschino, S.; Grp, S. S. Determinants of different *Candida* species infections of the genital tract in women. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2000**, 93 (2), 141–145.
- (2) Sun, Z. W.; Ge, X. N.; Qiu, B.; Xiang, Z.; Jiang, C.; Wu, J.; Li, Y. Vulvovaginal candidiasis and vaginal microflora interaction: Micro-

flora changes and probiotic therapy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2023**, *13*, 1123026.

(3) Hassan, Y.; Chew, S. Y.; Than, L. T. L. *Candida glabrata*: Pathogenicity and Resistance Mechanisms for Adaptation and Survival. *J. Fungi* **2021**, *7* (8), 667.

(4) Rodrigues, C. F.; Silva, S.; Henriques, M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **2014**, *33* (5), 673–688.

(5) Yassin, M. T.; Mostafa, A. A.; Al-Askar, A. A.; Bdeer, R. In vitro antifungal resistance profile of *Candida* strains isolated from Saudi women suffering from vulvovaginitis. *Eur. J. Med. Res.* **2020**, *25* (1), 1.

(6) Czechowicz, P.; Nowicka, J.; Gosciniak, G. Virulence Factors of *Candida* spp. and Host Immune Response Important in the Pathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23* (11), 5895.

(7) Mohammed, N. N.; Pandey, P.; Khan, N. S.; Elokely, K. M.; Liu, H.; Doerksen, R. J.; Repka, M. A. Clotrimazole-cyclodextrin based approach for the management and treatment of Candidiasis - A formulation and chemistry-based evaluation. *Pharm. Dev. Technol.* **2016**, *21* (5), 619–629.

(8) Grimling, B.; Karolewicz, B.; Nawrot, U.; Wlodarczyk, K.; Górniak, A. Physicochemical and Antifungal Properties of Clotrimazole in Combination with High-Molecular Weight Chitosan as a Multifunctional Excipient. *Mar. Drugs* **2020**, *18* (12), 591.

(9) Saadatfar, F.; Shayanfar, A.; Rahimpour, E.; Barzegar-Jalali, M.; Martinez, F.; Bolourtchian, M.; Jouyban, A. Measurement and correlation of clotrimazole solubility in ethanol + water mixtures at $T = (293.2 \text{ to } 313.2) \text{ K}$. *J. Mol. Liq.* **2018**, *256*, 527–532.

(10) dos Santos, A. M.; Carvalho, S. G.; Araujo, V. H. S.; Carvalho, G. C.; Gremiao, M. P. D.; Chorilli, M. Recent advances in hydrogels as strategy for drug delivery intended to vaginal infections. *Int. J. Pharm.* **2020**, *590*, 119867.

(11) Pai, M. O.; Venkatesh, S.; Gupta, P. The role of infections in infertility: A review. *Int. J. Acad. Med.* **2020**, *6* (3), 189–196.

(12) McDermott, A. Drug-resistant fungi on the rise. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2022**, *119* (48), No. e2217948119.

(13) Logan, A.; Wolfe, A.; Williamson, J. C. Antifungal Resistance and the Role of New Therapeutic Agents. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **2022**, *24* (9), 105–116.

(14) Cui, X.; Wang, L.; Lu, Y.; Yue, C. Development and research progress of anti-drug resistant fungal drugs. *J. Infect. Public Health* **2022**, *15* (9), 986–1000.

(15) Gosecka, M.; Gosecki, M.; Jaworska-Krych, D. Hydrophobized Hydrogels: Construction Strategies, Properties, and Biomedical Applications. *Adv. Funct. Mater.* **2023**, *33* (25), 2212302.

(16) Song, S. H.; Lee, K. M.; Kang, J. B.; Lee, S. G.; Kang, M. J.; Choi, Y. W. Improved Skin Delivery of Voriconazole with a Nanostructured Lipid Carrier-Based Hydrogel Formulation. *Chem. Pharm. Bull.* **2014**, *62* (8), 793–798.

(17) Wang, F. Y.; Zhao, L.; Song, F. Y.; Wu, J. Y.; Zhou, Q. J.; Xie, L. X. Hybrid natural hydrogels integrated with voriconazole-loaded microspheres for ocular antifungal applications. *J. Mater. Chem. B* **2021**, *9* (15), 3377–3388.

(18) Abdellatif, A. A. H.; El-Telbany, D. F. A.; Zayed, G.; Al-Sawahli, M. M. Hydrogel Containing PEG-Coated Fluconazole Nanoparticles with Enhanced Solubility and Antifungal Activity. *J. Pharm. Innov.* **2019**, *14* (2), 112–122.

(19) de Lima, J. A.; Paines, T. C.; Motta, M. H.; Weber, W. B.; Dos Santos, S. S.; Cruz, L.; da Silva, C. d. B. Novel Pemulen/Pullulan blended hydrogel containing clotrimazole-loaded cationic nanocapsules: Evaluation of mucoadhesion and vaginal permeation. *Mater. Sci. Eng., C* **2017**, *79*, 886–893.

(20) I. Abdul, B.; A. Rajab, N. Preparation and in-vitro evaluation of mucoadhesive clotrimazole vaginal hydrogel. *Iraqi J. Pharm. Sci.* **2017**, *23*, 19–25.

(21) Ziemczonek, P.; Gosecka, M.; Gosecki, M.; Marcinkowska, M.; Janaszewska, A.; Klajnert-Maculewicz, B. Star-Shaped Poly(furfuryl glycidyl ether)-Block-Poly(glycerol glycerol ether) as an Efficient Agent for the Enhancement of Nifuratel Solubility and for the

Formation of Injectable and Self-Healable Hydrogel Platforms for the Gynaecological Therapies. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (16), 8386.

(22) Gosecka, M.; Jaworska-Krych, D.; Gosecki, M.; Wielgus, E.; Marcinkowska, M.; Janaszewska, A.; Klajnert-Maculewicz, B. Self-Healable, Injectable Hydrogel with Enhanced Clotrimazole Solubilization as a Potential Therapeutic Platform for Gynecology. *Biomacromolecules* **2022**, *23* (10), 4203–4219.

(23) Gosecki, M.; Ziemczonek, P.; Gosecka, M.; Urbaniak, M.; Wielgus, E.; Marcinkowska, M.; Janaszewska, A.; Klajnert-Maculewicz, B. Cross-linkable star-hyperbranched unimolecular micelles for the enhancement of the anticancer activity of clotrimazole. *J. Mater. Chem. B* **2023**, *11* (24), 5552–5564.

(24) Macosko, C. W. *Rheology: Principles, Measurements and Applications*; Wiley VCH, 1994.

(25) Ma, L.; Barbosa-Cánovas, G. Rheological characterization of mayonnaise. Part II: Flow and viscoelastic properties at different oil and xanthan gum concentrations. *J. Food Eng.* **1995**, *25*, 409–425.

(26) Kwak, M. S.; Ahn, H. J.; Song, K. W. Rheological investigation of body cream and body lotion in actual application conditions. *Korea Aust. Rheol. J.* **2015**, *27*, 241–251.

(27) Tonglairoum, P.; Ngawhirunpat, T.; Rojanarata, T.; Panomsuk, S.; Kaomongkolgit, R.; Opanasopit, P. Fabrication of mucoadhesive chitosan coated polyvinylpyrrolidone/cyclodextrin/clotrimazole sandwich patches for oral candidiasis. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *132*, 173–179.

(28) Cavallo, G.; Metrangolo, P.; Milani, R.; Pilati, T.; Priimagi, A.; Resnati, G.; Terraneo, G. The Halogen Bond. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (4), 2478–2601.

(29) Vasylyeva, V.; Catalano, L.; Nervi, C.; Gobetto, R.; Metrangolo, P.; Resnati, G. Characteristic redshift and intensity enhancement as far-IR fingerprints of the halogen bond involving aromatic donors. *CrystEngComm* **2016**, *18* (13), 2247–2250.

(30) Teo, L. S.; Chen, C. Y.; Kuo, J. F. Fourier transform infrared spectroscopy study on effects of temperature on hydrogen bonding in amine-containing polyurethanes and poly(urethane-urea)s. *Macromolecules* **1997**, *30* (6), 1793–1799.

(31) Bahadur, A.; Shoaib, M.; Saeed, A.; Iqbal, S. FT-IR spectroscopic and thermal study of waterborne polyurethane-acrylate leather coatings using tartaric acid as an ionomer. *e-Polymers* **2016**, *16* (6), 463–474.

(32) Maeda, Y.; Kubota, T.; Yamauchi, H.; Nakaji, T.; Kitano, H. Hydration changes of poly(2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate) during thermosensitive phase separation in water. *Langmuir* **2007**, *23* (22), 11259–11265.

(33) Piechocki, K.; Kozanecki, M.; Saramak, J. Water structure and hydration of polymer network in PMEO2MA hydrogels. *Polymer* **2020**, *210*, 122974.

(34) Hobza, P.; Havlas, Z. Blue-Shifting Hydrogen Bonds. *Chem. Rev.* **2000**, *100* (11), 4253–4264.

(35) Zierkiewicz, W.; Jurecka, P.; Hobza, P. On differences between hydrogen bonding and improper blue-shifting hydrogen bonding. *ChemPhysChem* **2005**, *6* (4), 609–617.

(36) Shikhaliyev, K. S.; Stolpovskaya, N. V.; Krysin, M. Y.; Zorina, A. V.; Lyapun, D. V.; Zubkov, F. I.; Yankina, K. Y. Production and Emulsifying Effect of Polyglycerol and Fatty Acid Esters with Varying Degrees of Esterification. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2016**, *93* (10), 1429–1440.

(37) Osmani, R. A. M.; Kulkarni, P. K.; Shanmuganathan, S.; Hani, U.; Srivastava, A.; Prerana, M.; Shinde, C. G.; Bhosale, R. R. A 3^2 full factorial design for development and characterization of a nano-sponge-based intravaginal in situ gelling system for vulvovaginal candidiasis. *RSC Adv.* **2016**, *6* (23), 18737–18750.

(38) Linhares, I. M.; Summers, P. R.; Larsen, B.; Giraldo, P. C.; Witkin, S. S. Contemporary perspectives on vaginal pH and lactobacilli. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2011**, *204* (2), 120.e1–120.e5.

Supporting Information

Enhanced solubility and bioavailability of clotrimazole in aqueous solutions with hydrophobized hyperbranched polyglycidol for improved antifungal activity

Daria Jaworska-Krych^a, Monika Gosecka^{a*}, Mateusz Gosecki^a, Malgorzata Urbaniak^a, Katarzyna Dzitko^b, Anita Ciesielska^b, Ewelina Wielgus^a, Slawomir Kadlubowski^c, Marcin Kozanecki^d

a. Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, Sienkiewicza 112, 90-363 Lodz, Poland

b. University of Lodz, Department of Molecular Microbiology, Faculty of Biology and Environmental Protection, Banacha 12/16, 90-237, Lodz, Poland

c. Lodz University of Technology, Institute of Applied Radiation Chemistry, Wroblewskiego 15 93-590 Lodz, Poland

d. Department of Molecular Physics, Faculty of Chemistry, Lodz University of Technology, Zeromskiego 116, 90-924 Lodz, Poland

Corresponding Author: Monika Gosecka* - Email: mdybko@cbmm.lodz.pl

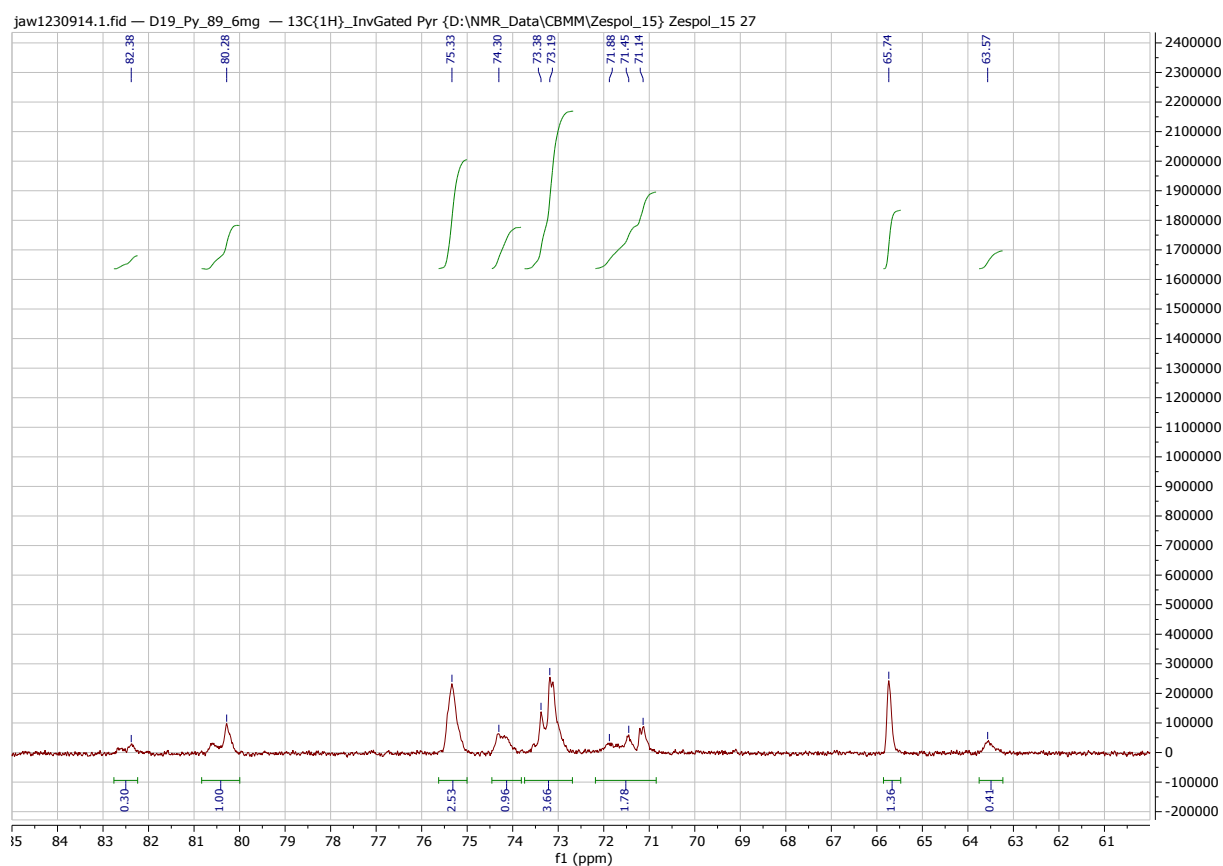


Figure S1. ^{13}C INV GATED NMR spectrum of HbPGL recorded in Pyridine- d_5 .

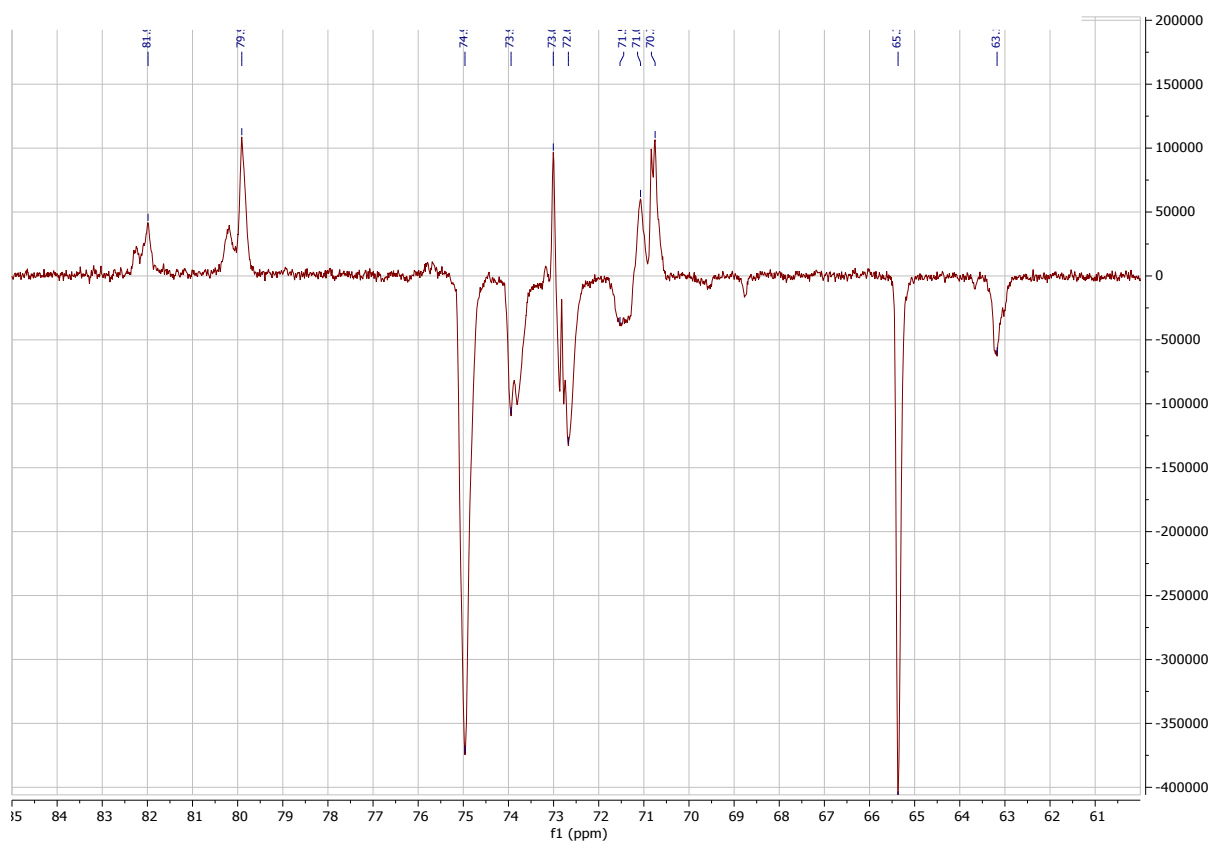


Figure S2. ^{13}C DEPT NMR spectrum of HbPGL recorded in Pyridine- d_5 .

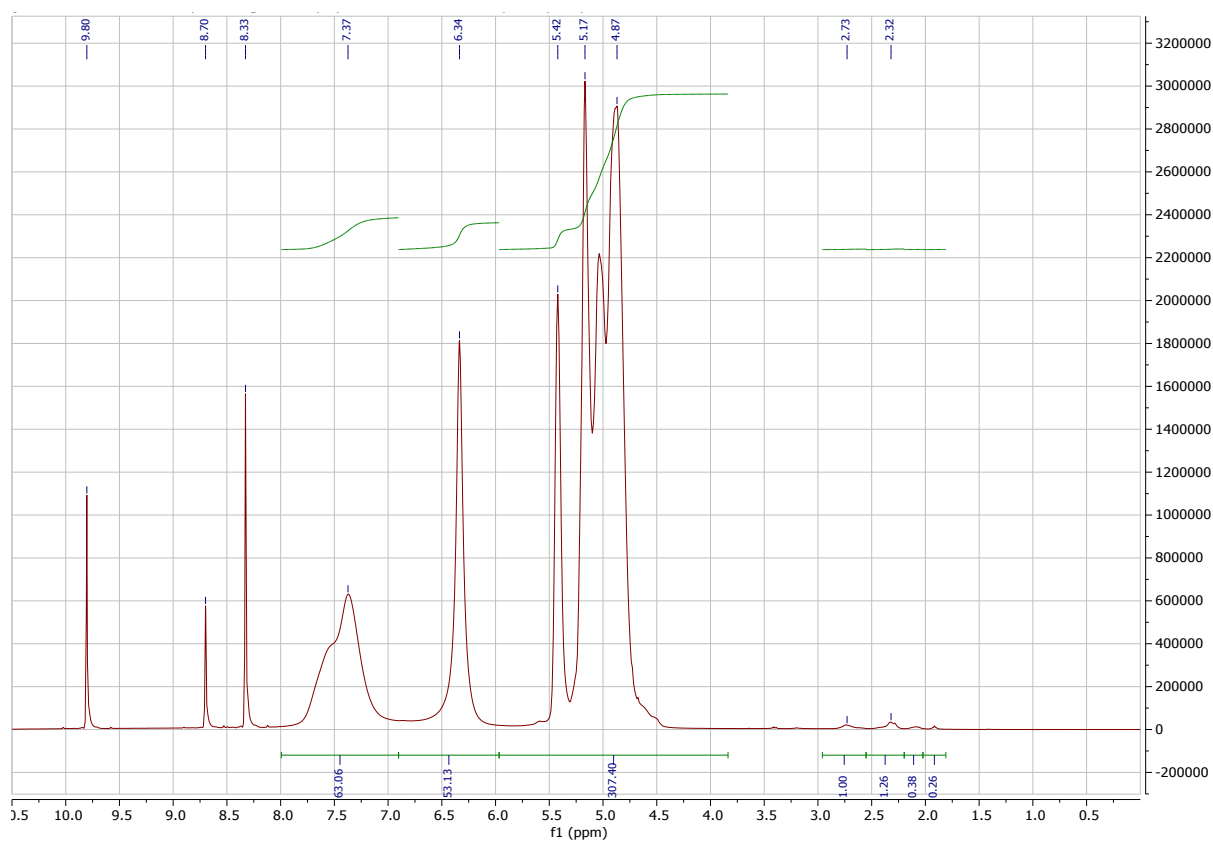


Figure S3. ^1H NMR spectrum of HbPGL recorded in Pyridine- d_5 .

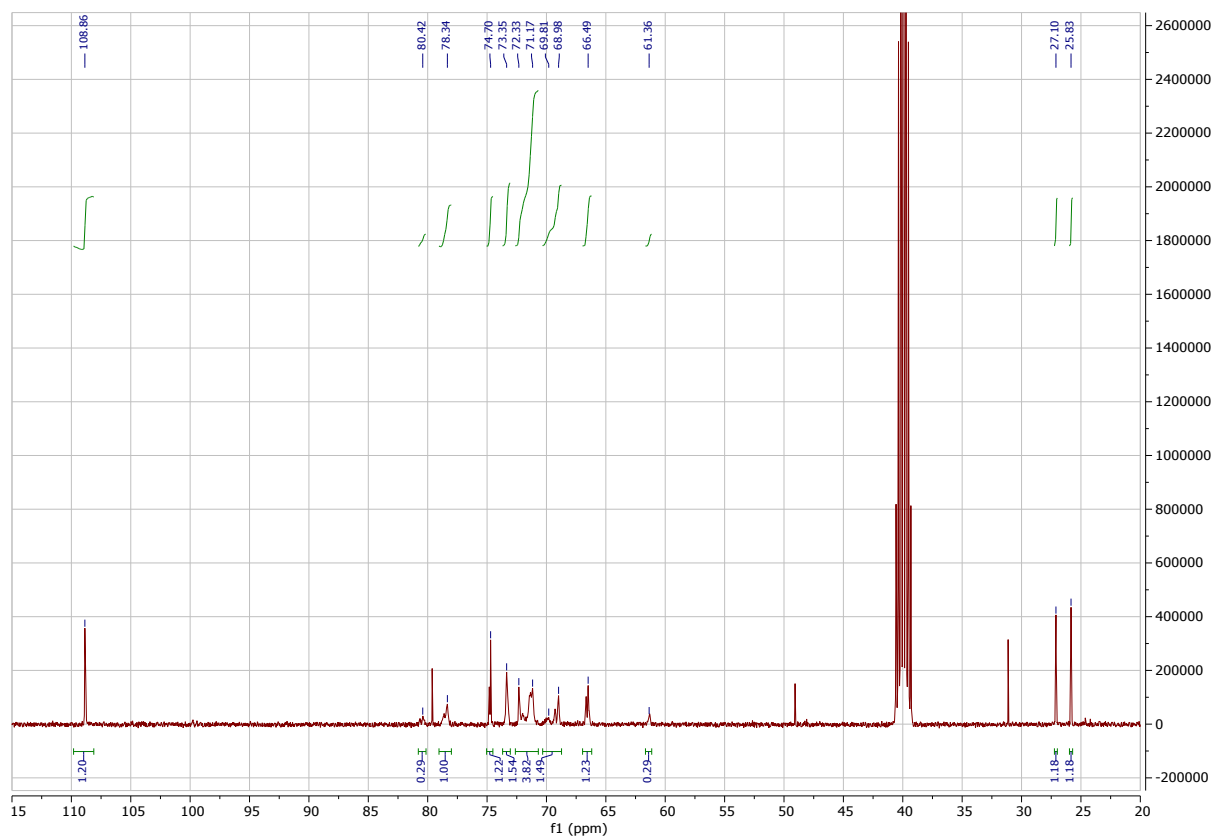


Figure S4. ^{13}C INVGATED NMR spectrum of AC-HbPGL recorded in DMSO- d_6 .

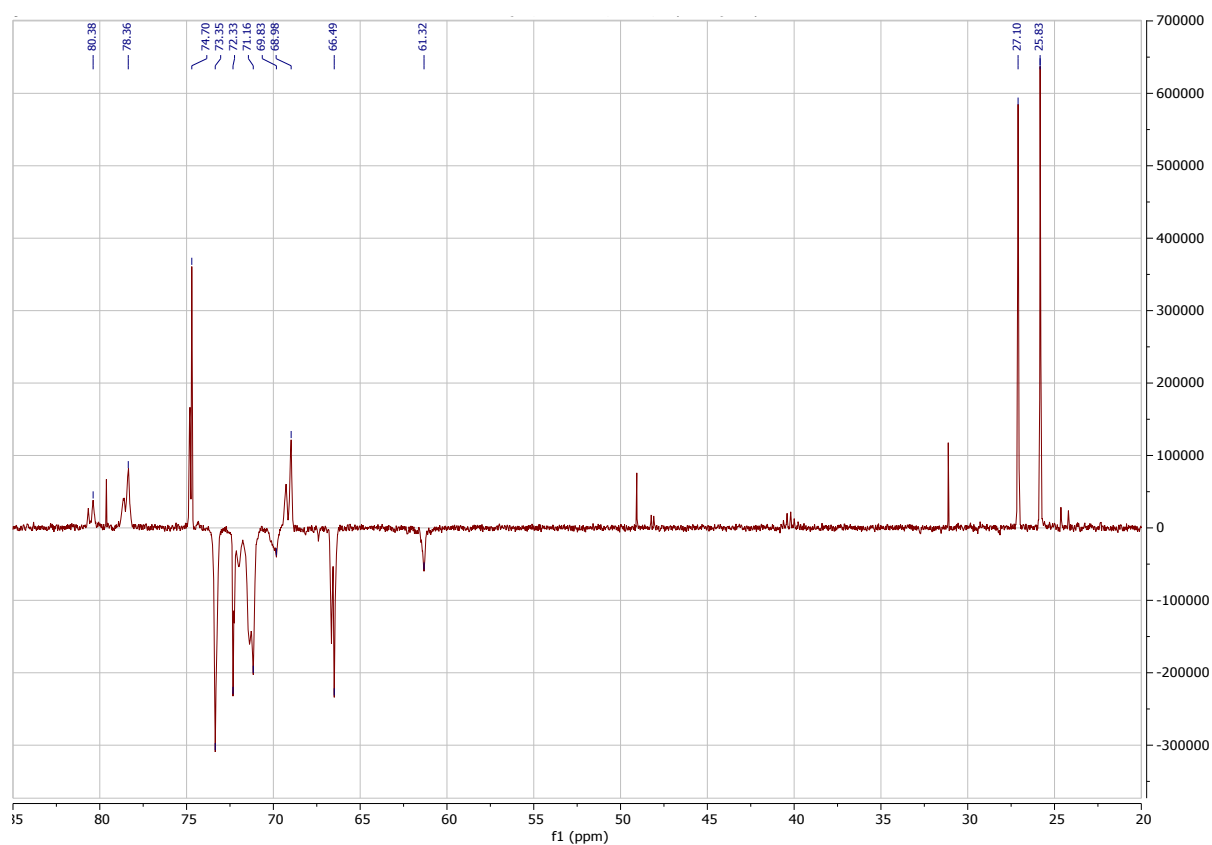


Figure S5. ^{13}C DEPT NMR spectrum of AC-HbPGL recorded in DMSO-d_6 .

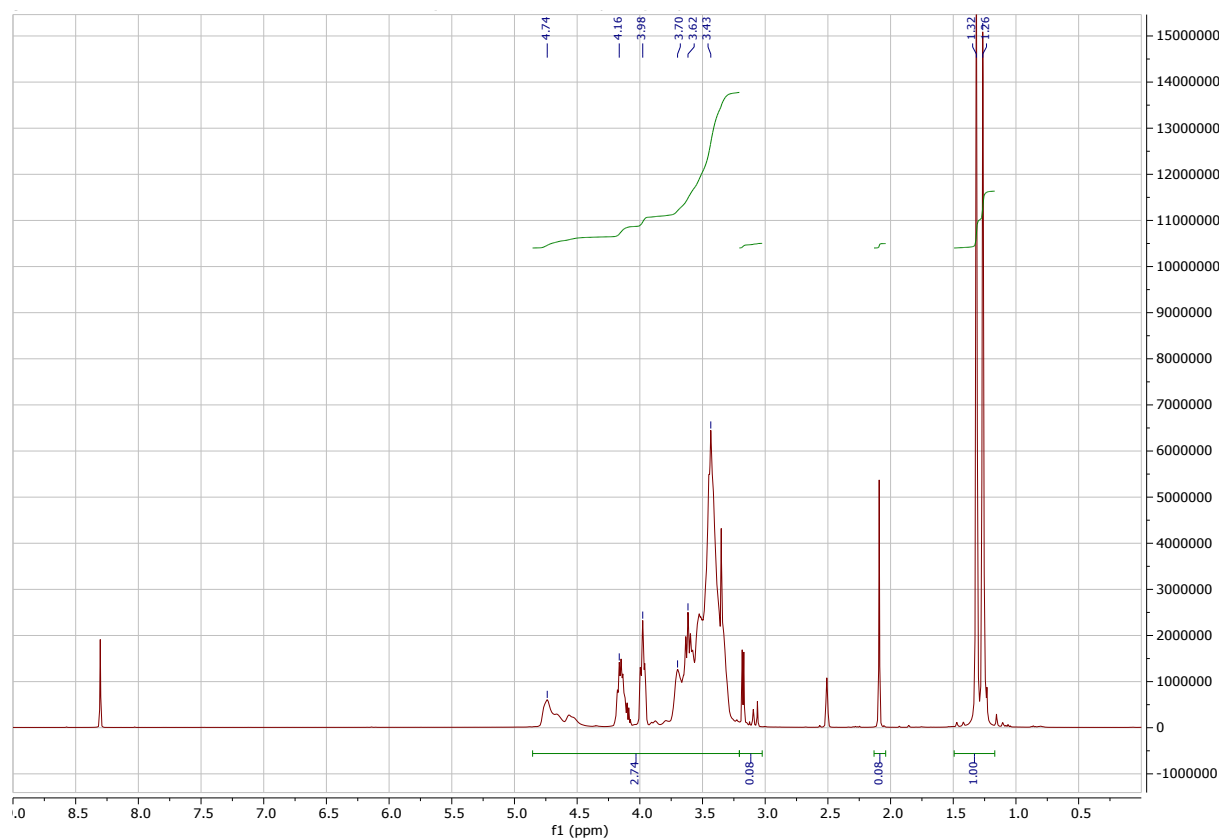


Figure S6. ^1H NMR spectrum of AC-HbPGL recorded in DMSO-d_6 .

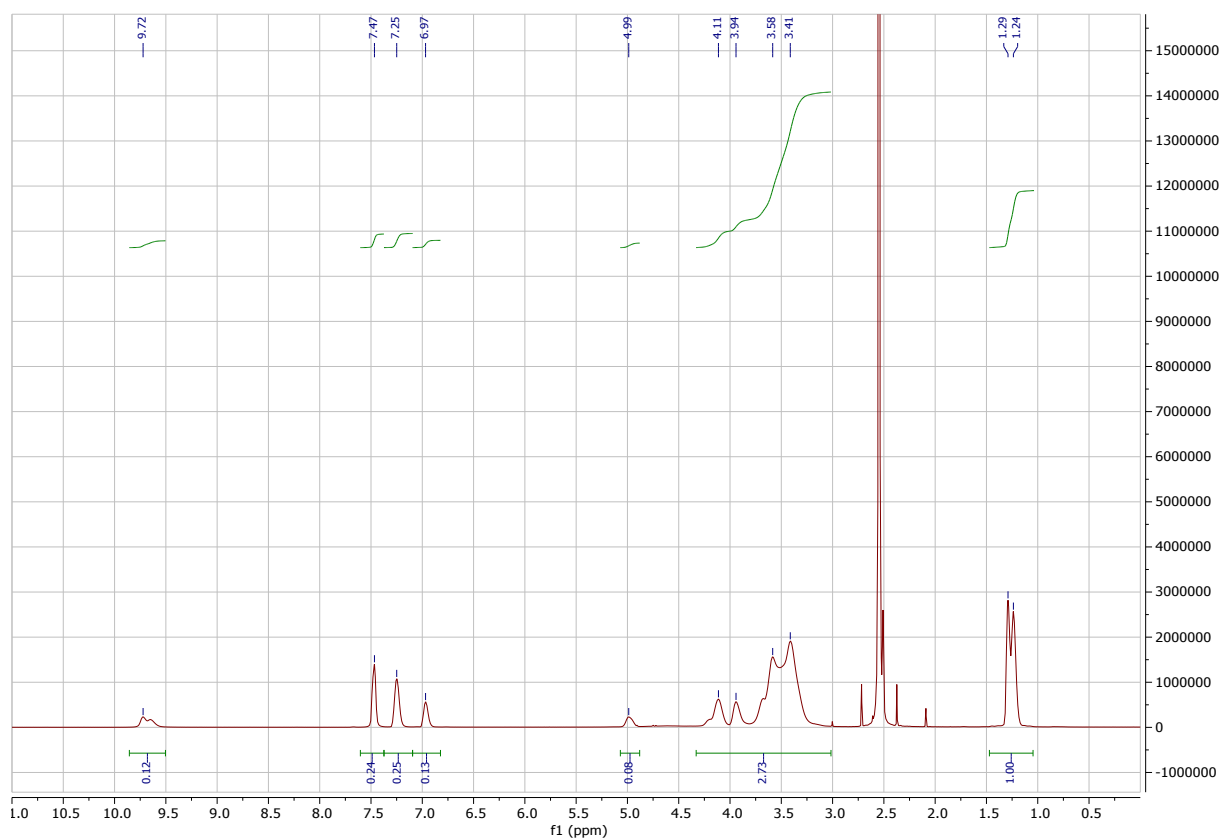


Figure S7. ¹H NMR spectrum of AC-HbPGL₁ PC66 recorded in DMSO-d₆.

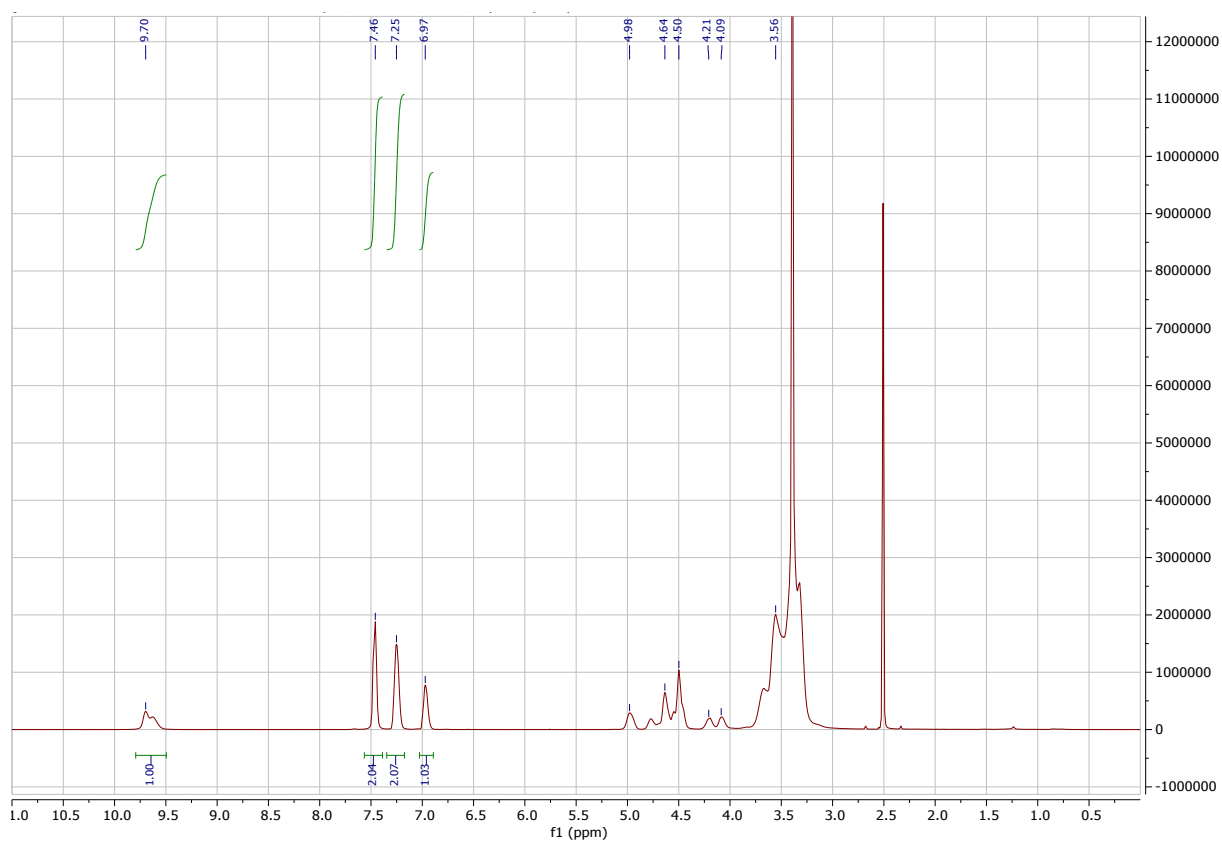


Figure S8. ¹H NMR spectrum of HbPGL₁ PC66 recorded in DMSO-d₆.

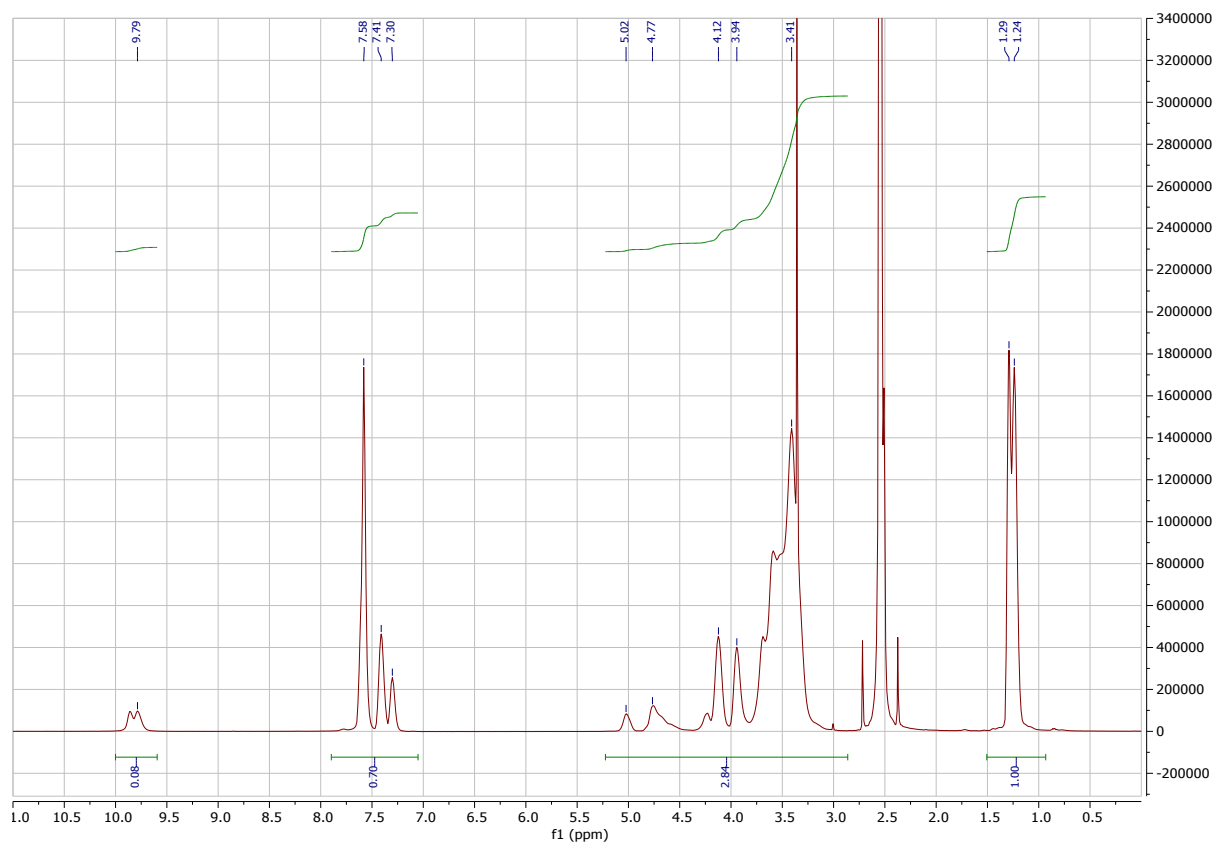


Figure S9. ¹H NMR spectrum of AC-HbPGL_{BPh40} recorded in DMSO-d₆.

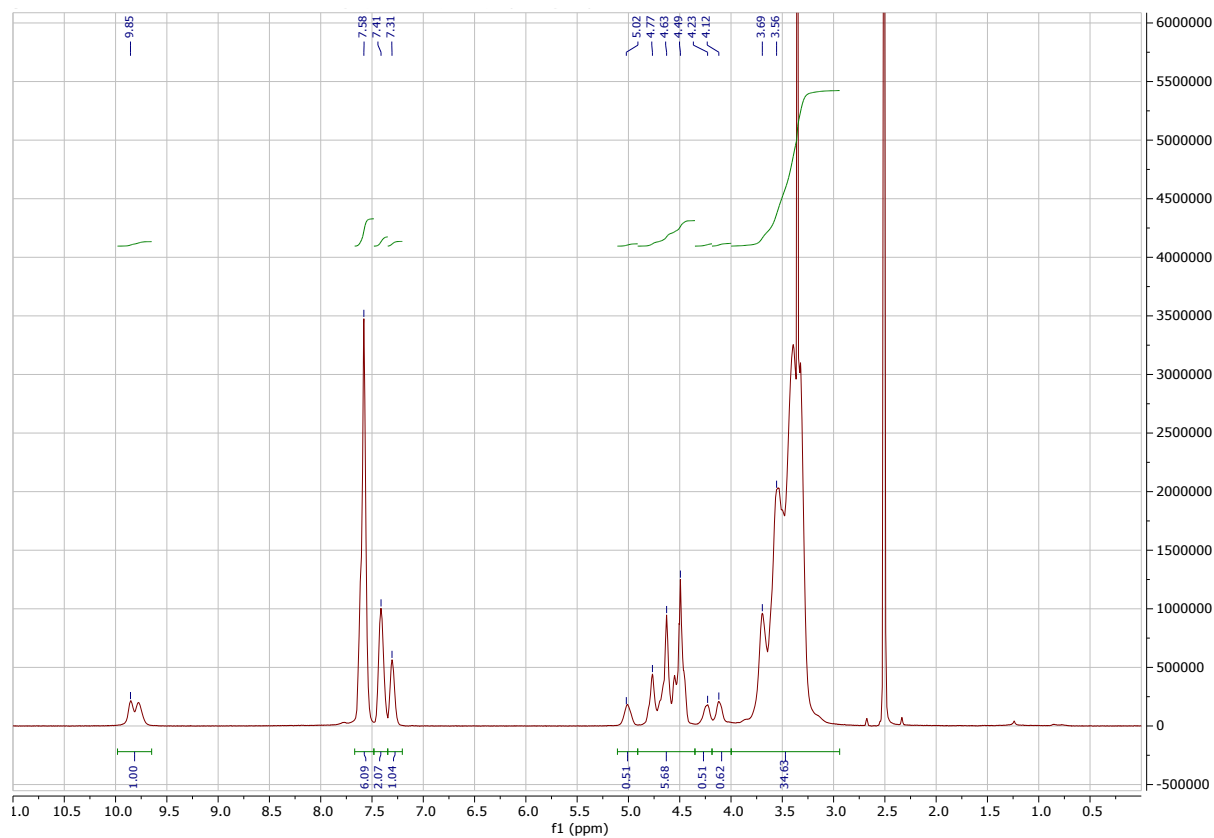


Figure S10. ¹H NMR spectrum of HbPGL_{BPh40} recorded in DMSO-d₆.

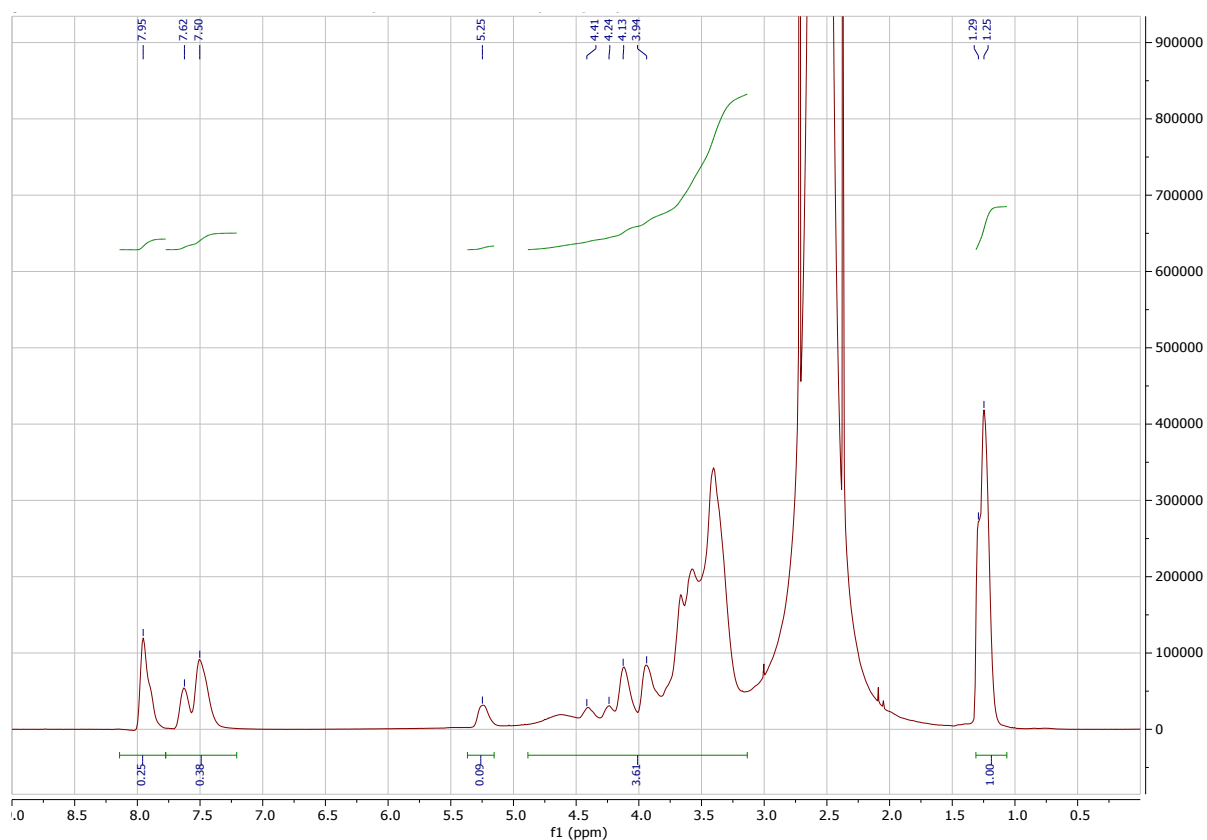


Figure S11. ¹H NMR spectrum of AC-HbPGL_BE57 recorded in DMSO-d₆.

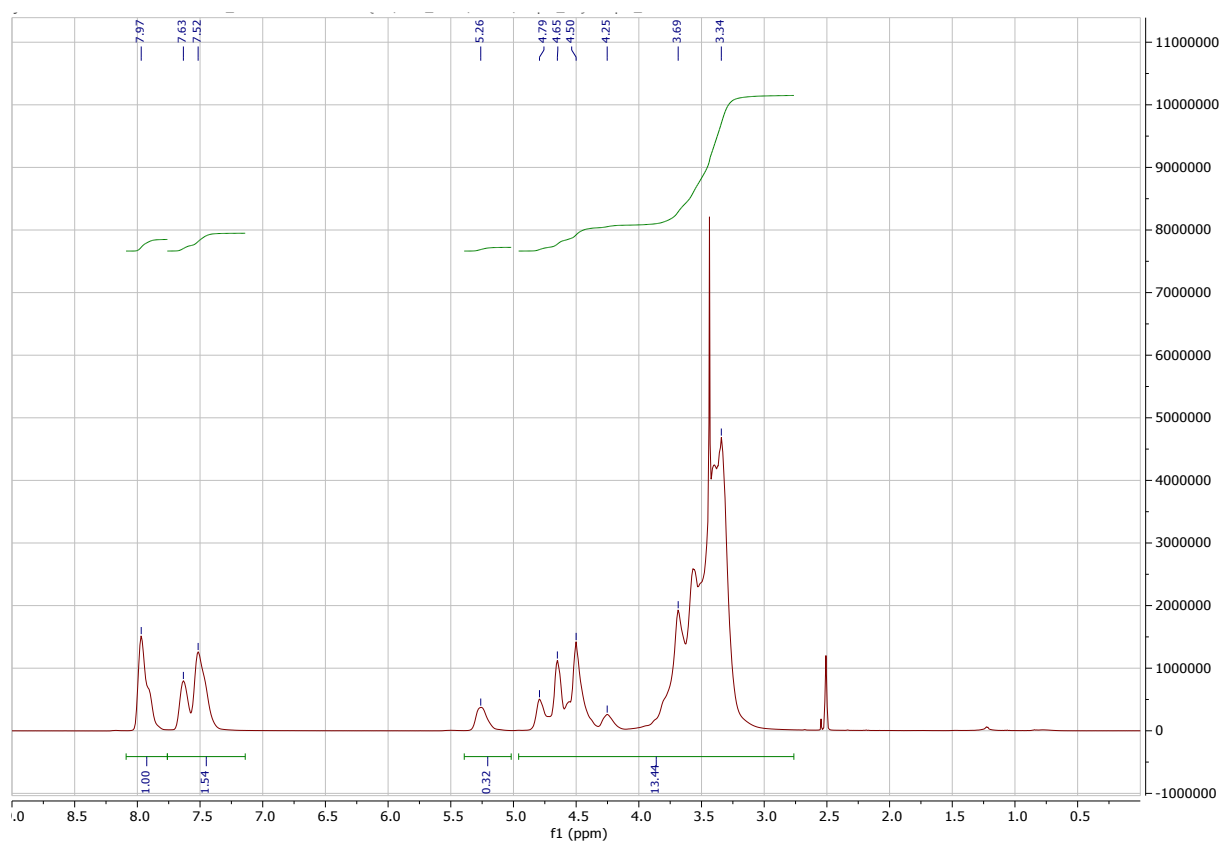


Figure S12. ^1H NMR spectrum of HbPGL_BE57 recorded in DMSO-d_6 .

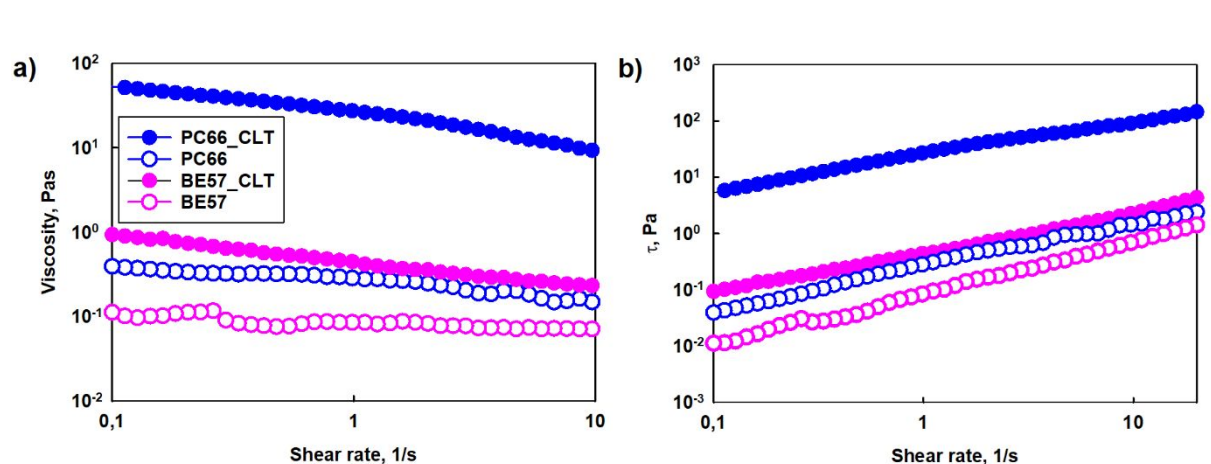


Figure S13. The dependence of viscosity (a) and stress (b) on the shear rate recorded at 37°C for the aqueous solutions of phenyl-based HbPGLs and aqueous formulations prepared of clotrimazole-loaded phenyl-based HbPGLs.

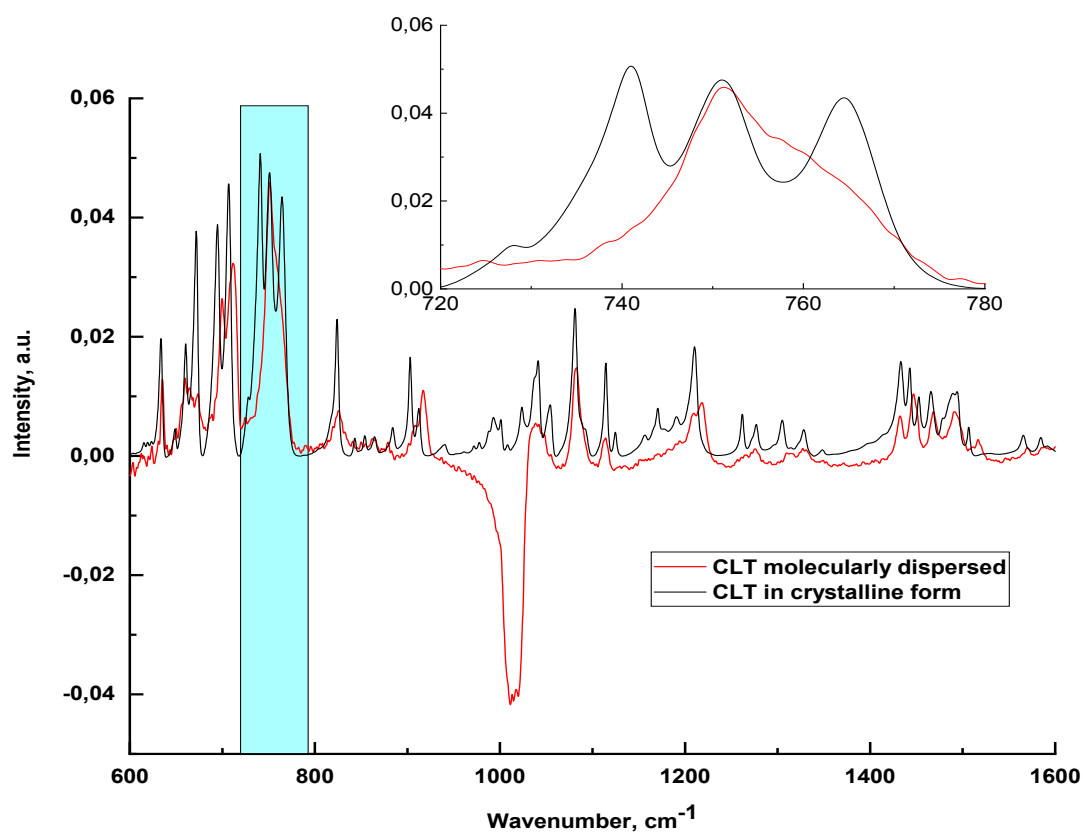


Figure S14. The comparison of FTIR spectrum of clotrimazole in crystalline form and differential spectrum of the FTIR spectra of methanolic solution of clotrimazole and methanol. Inset shows the spectral region 720-780 cm^{-1} sensitive to clotrimazole crystallinity.

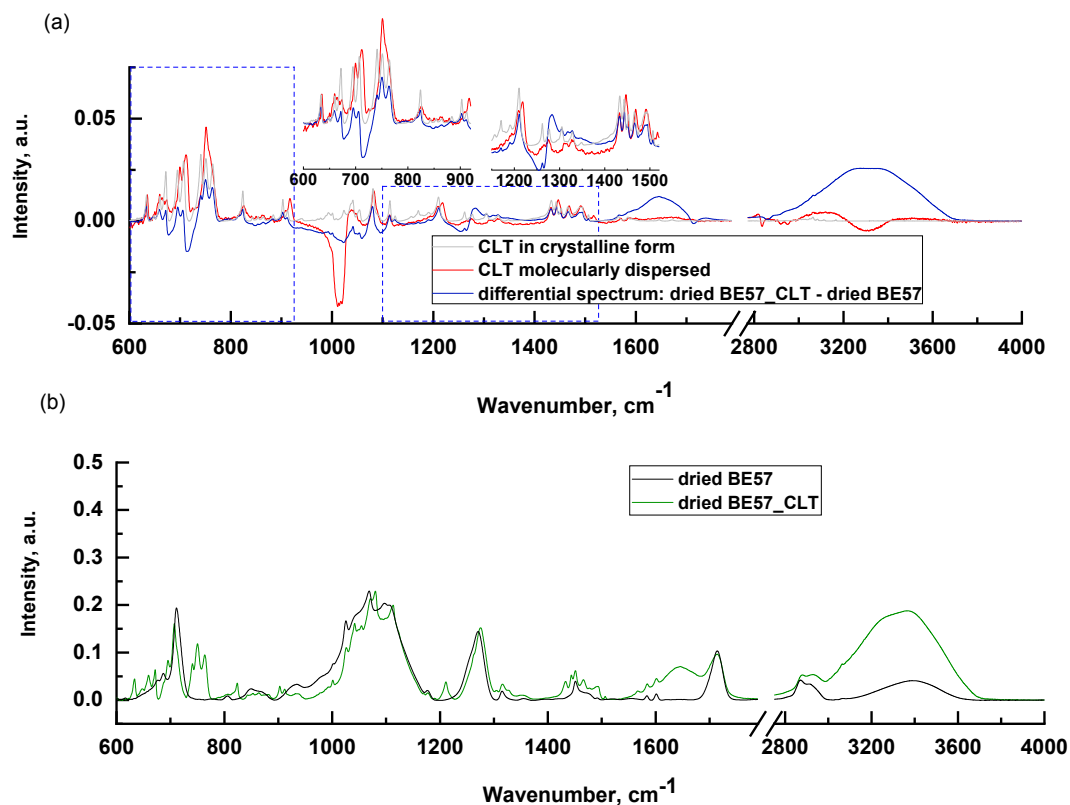


Figure S15. The comparison of FTIR spectra of clotrimazole in crystalline form, a differential spectrum of the FTIR spectra of methanolic solution of clotrimazole and methanol, and clotrimazole encapsulated in polymer (a). FTIR spectra of dried neat BE57 and BE57 loaded with clotrimazole (b).

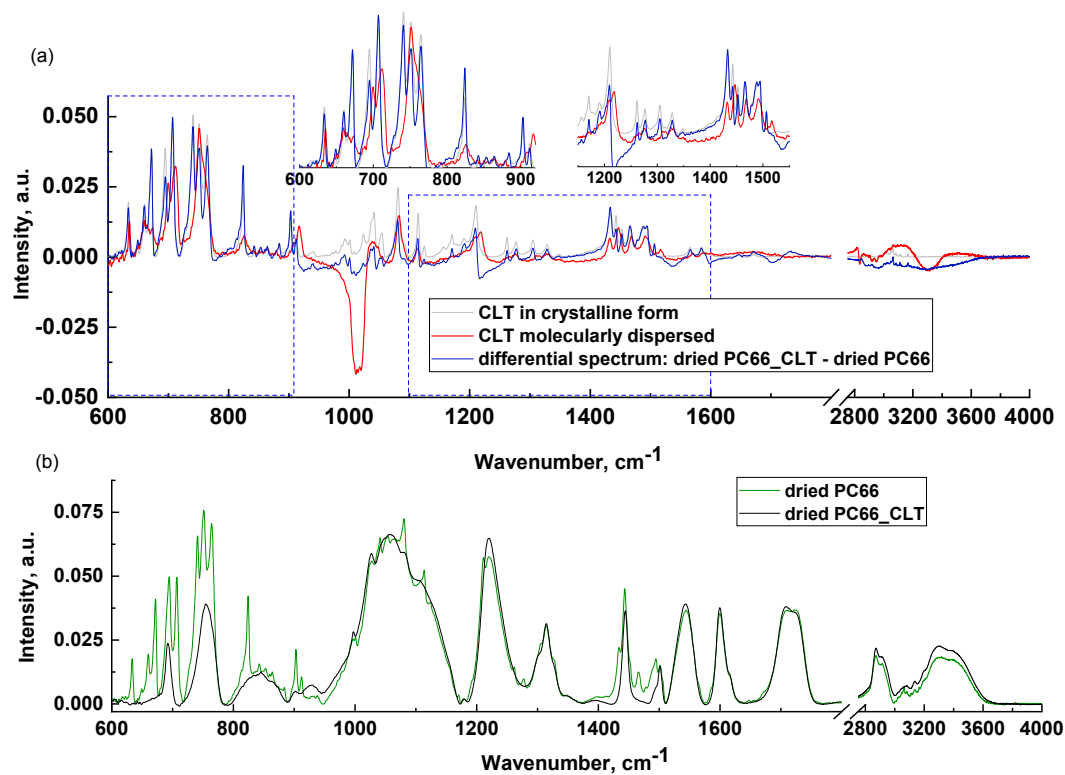


Figure S16. The comparison of FTIR spectra of clotrimazole in crystalline form, differential spectrum of the FTIR spectra of methanolic solution of clotrimazole and methanol and clotrimazole encapsulated in polymer (a). FTIR spectra of dried neat PC66 and PC66 loaded with clotrimazole (b).

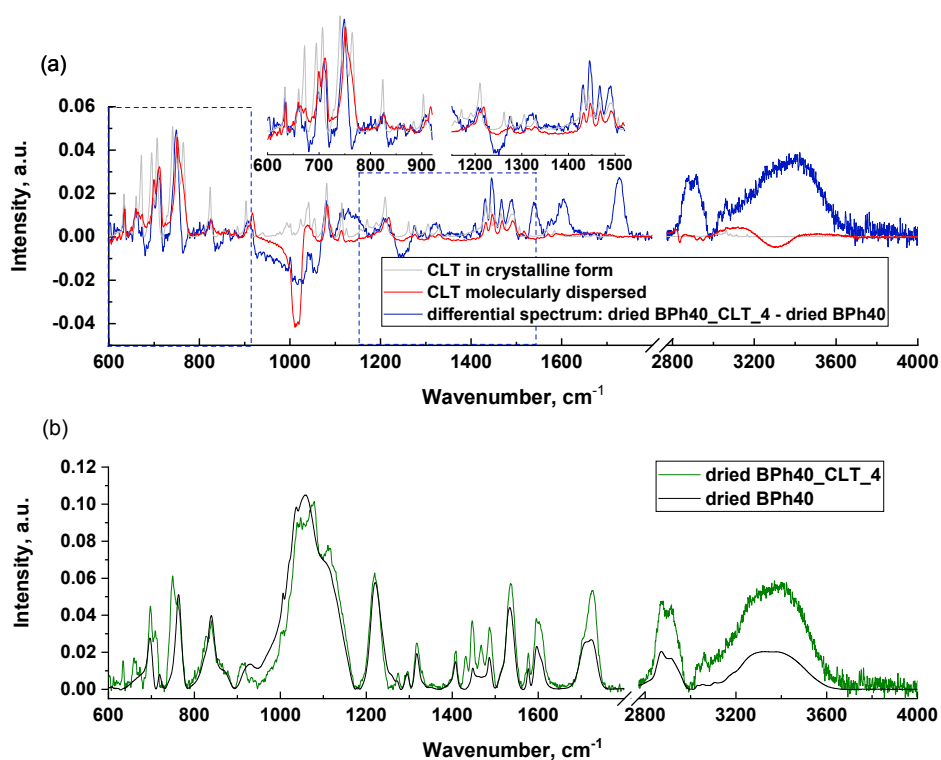


Figure S17. The comparison of FTIR spectra of clotrimazole in crystalline form, differential spectrum of the FTIR spectra of methanolic solution of clotrimazole and methanol and clotrimazole encapsulated in polymer (a). FTIR spectra of dried neat BPh40 and BPh40 loaded with clotrimazole in the molar ratio equal to 32 (b).

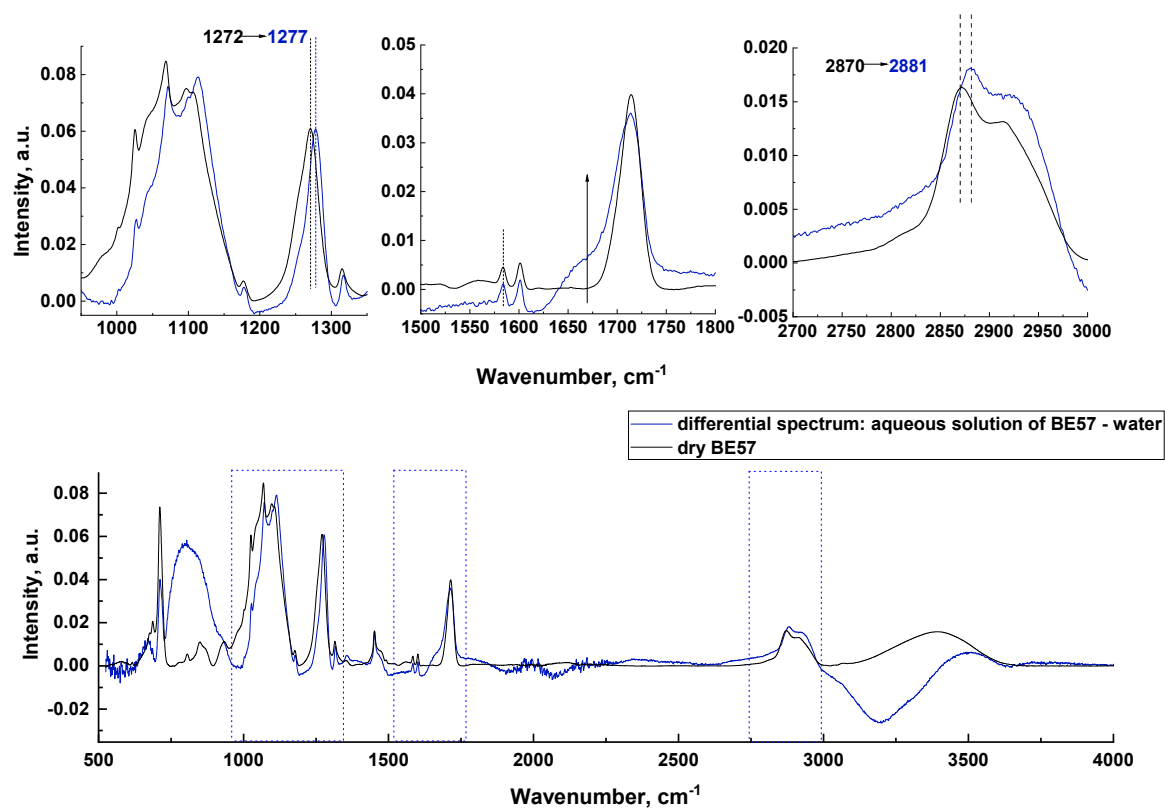


Figure S18. FTIR spectrum of BE57 in dry and hydrated states. The insets show the spectral regions where the bands of the BE57 sensitive to hydration occur.

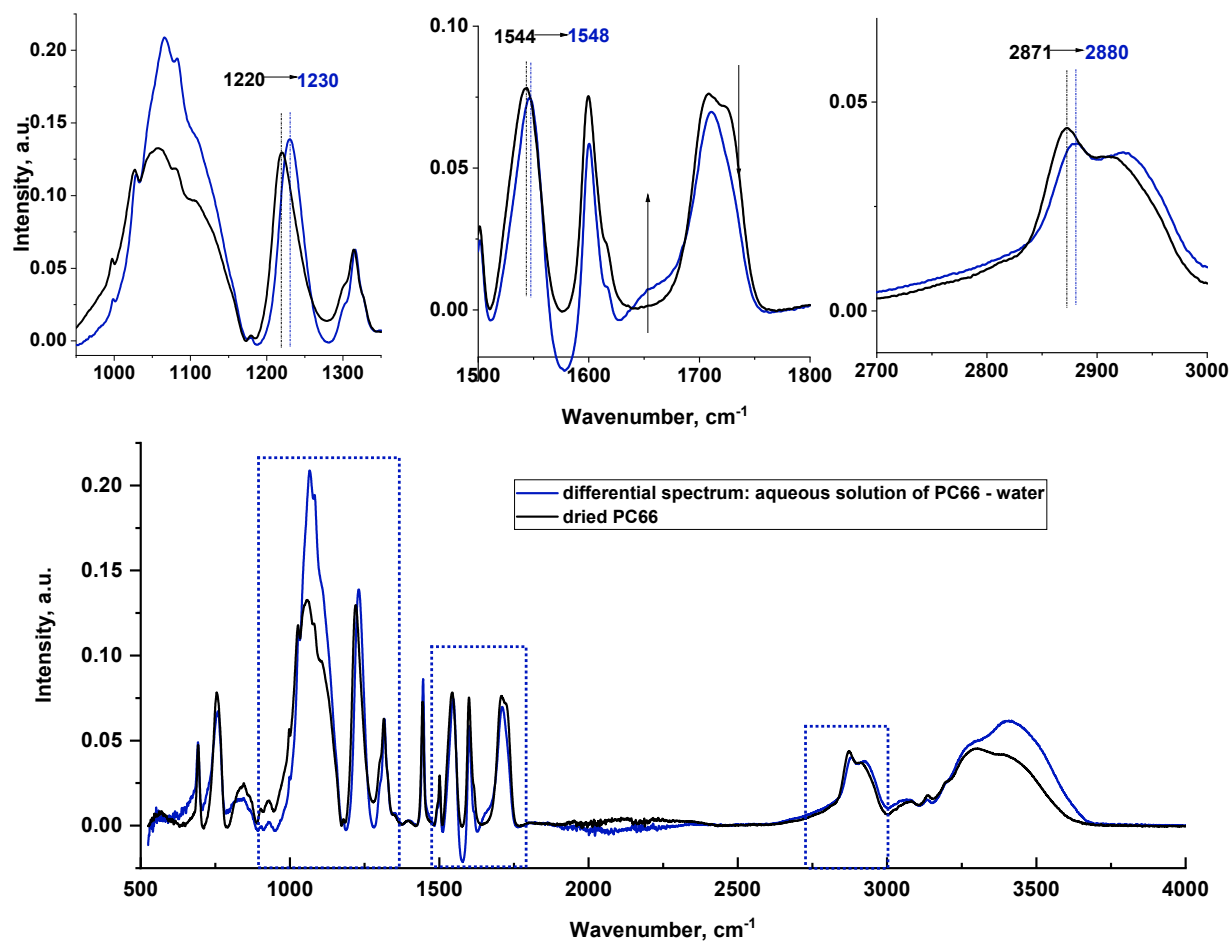


Figure S19. FTIR spectra of PC66 in dried and hydrated states. Insets show the spectral regions where the bands of the PC66 polymer are sensitive to hydration occur.

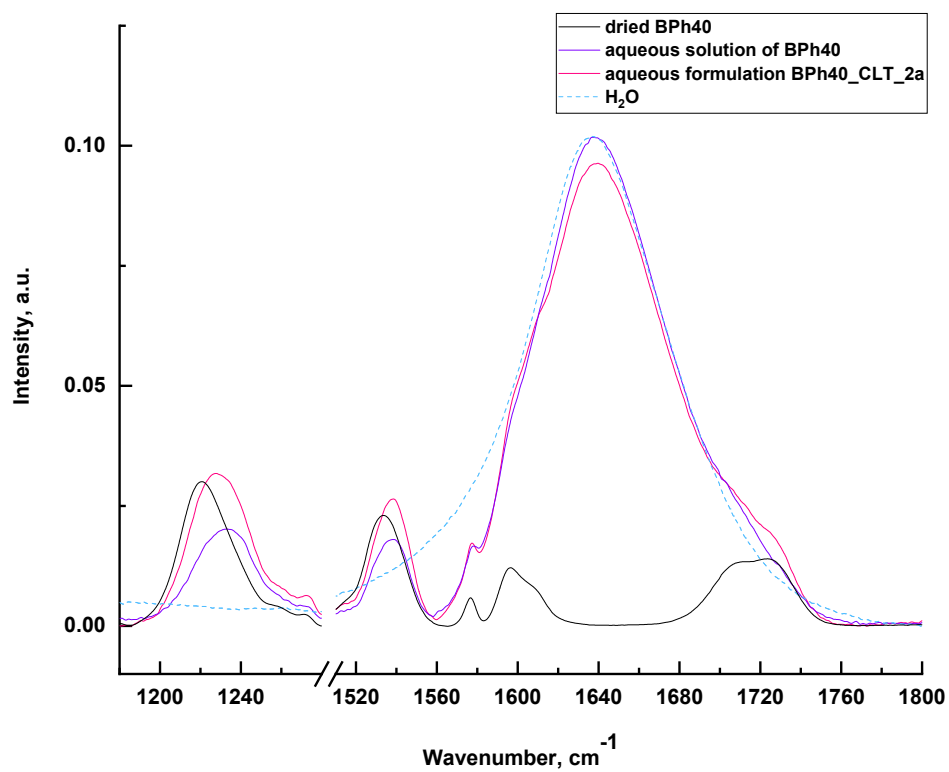


Figure S20. Comparison of FTIR spectra of dried neat BPh40, aqueous solution of BPh40, and aqueous formulation of BPh40 loaded with clotrimazole and water.

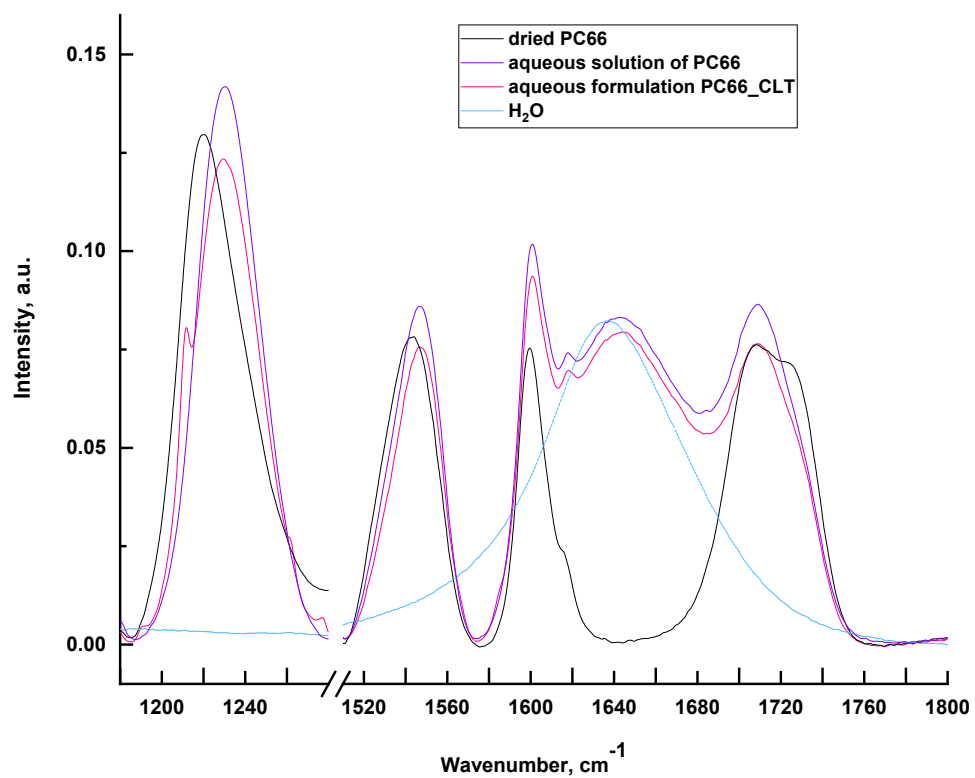


Figure S21. Comparison of FTIR spectra of dried neat PC66, aqueous solution of PC66, aqueous formulation of PC66 loaded with clotrimazole and water.

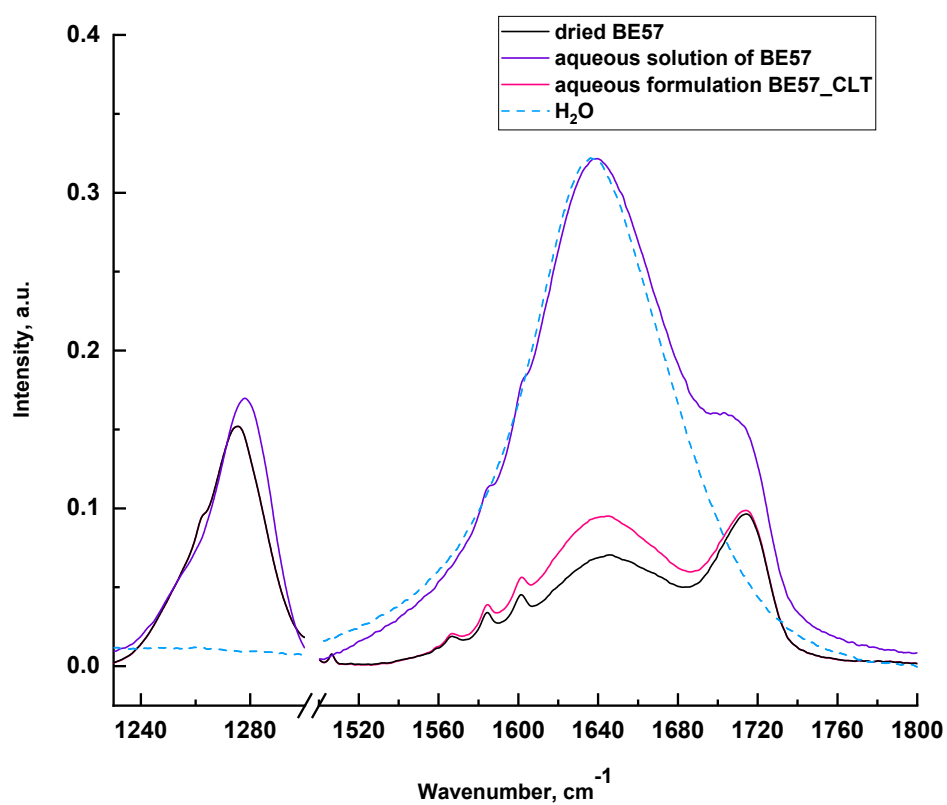


Figure S22. Comparison of the FTIR spectra of dried neat BE57, aqueous solution of BE57, aqueous formulation of BE57 loaded with clotrimazole and water.

Table 1. Zero viscosity values (η_0) of formulations based on clotrimazole-loaded aryl-modified hyperbranched polyglycidols with the indication of a presence of the yield point (τ_c).

Aqueous formulation	Molar ratio of clotrimazole to copolymer	η_0, Pas (25 °C)	τ_c, Pa (25 °C)
BE57_c1	0		-
PC66_c1	0		-
BPh40_c1	0	-	-
BPh40_c2	0	-	-
BPh40_CLT 1	8	177	-
BPh40_CLT 2	16	4016	76 ± 13
BPh40_CLT 3	24	-	654 ± 16
BPh40_CLT 4	32	-	2363 ± 46

BE57_c1= PC66_c1=BPh40_c1 = 500 mg/mL; BPh40_c2 = 250 mg/mL

Łódź, dn. 23.10.2024r.

Mgr inż. Daria Jaworska-Krych
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk
ul. Sienkiewicza 112
90-363 Łódź

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że mój udział w pracy „Enhanced solubility and bioavailability of clotrimazole in aqueous solutions with hydrophobized hyperbranched polyglycidol for improved antifungal activity” (Jaworska-Krych D., Gosecka M., Gosecki M., Urbaniak M., Dzitko K., Ciesielska A., Wielgus E., Kadłubowski S., Kozanecki M., Applied Materials and Interfaces, 2024, 16, 15, 18434–18448) polegał na przeprowadzeniu syntez polimerów, przygotowaniu enkapsulacji leku, analizie otrzymanych struktur, pomiarach i analizie widm otrzymanych metodą spektroskopii podczerwieni oraz przygotowaniu próbek do badań mikrobiologicznych.

D. Jaworska-Krych

Łódź, dn. 23.10.2024r.

Dr hab. Monika Gosecka, prof. CBMiM
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk
ul. Sienkiewicza 112
90-363 Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracy „Enhanced solubility and bioavailability of clotrimazole in aqueous solutions with hydrophobized hyperbranched polyglycidol for improved antifungal activity” (Jaworska-Krych D., Gosecka M., Gosecki M., Urbaniak M., Dzitko K., Ciesielska A., Wielgus E., Kadłubowski S., Kozanecki M., Applied Materials and Interfaces, 2024, 16, 15, 18434–18448) polegał na przygotowaniu koncepcji badawczej, przeprowadzeniu pomiarów reologicznych, analizie i interpretacji wyników, oraz napisaniu artykułu i przygotowaniu odpowiedzi na recenzje.

MGosecka

Łódź, dn. 23.10.2024r.

Dr Mateusz Gosecki
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk
ul. Sienkiewicza 112
90-363 Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracy „Enhanced solubility and bioavailability of clotrimazole in aqueous solutions with hydrophobized hyperbranched polyglycidol for improved antifungal activity” (Jaworska-Krych D., Gosecka M., Gosecki M., Urbaniak M., Dzitko K., Ciesielska A., Wielgus E., Kadłubowski S., Kozanecki M., Applied Materials and Interfaces, 2024, 16, 15, 18434–18448) polegał na przeprowadzeniu pilotażowych reakcji polimeryzacji.

Gosecki

Łódź, dn. 23.10.2024r.

Inż. Małgorzata Urbaniak
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk
ul. Sienkiewicza 112
90-363 Łódź

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że mój udział w pracy „Enhanced solubility and bioavailability of clotrimazole in aqueous solutions with hydrophobized hyperbranched polyglycidol for improved antifungal activity” (Jaworska-Krych D., Gosecka M., Gosecki M., Urbaniak M., Dzitko K., Ciesielska A., Wielgus E., Kadłubowski S., Kozanecki M., Applied Materials and Interfaces, 2024, 16, 15, 18434–18448) polegał na oczyszczaniu polimerów i przygotowaniu próbek na badania mikrobiologiczne.



Łódź, dn. 23.10.2024r.

Dr hab. Katarzyna Dzitko, prof. UŁ
Katedra Mikrobiologii Molekularnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
ul. Banacha 12/16
90-237 Łódź

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że mój udział w pracy „Enhanced solubility and bioavailability of clotrimazole in aqueous solutions with hydrophobized hyperbranched polyglycidol for improved antifungal activity” (Jaworska-Krych D., Gosecka M., Gosecki M., Urbaniak M., Dzitko K., Ciesielska A., Wielgus E., Kadłubowski S., Kozanecki M., *Applied Materials and Interfaces*, 2024, 16, 15, 18434–18448) polegał na zaproponowaniu badań mikrobiologicznych, doborze metod badawczych, przeprowadzeniu badań oraz analizie, interpretacji i opisie metod a także uzyskanych wyników.

Katarzyna Dzitko

Signature Not Verified

Dokument podpisany przez
Katarzyna Dzitko

Data: 2024.10.29 10:34:13 CET

Łódź, dn. 23.10.2024r.

dr hab. Anita Ciesielska, prof. UŁ
Katedra Mikrobiologii Molekularnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
ul. Banacha 12/16
90-237 Łódź

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że mój udział w pracy „Enhanced solubility and bioavailability of clotrimazole in aqueous solutions with hydrophobized hyperbranched polyglycidol for improved antifungal activity” (Jaworska-Krych D., Gosecka M., Gosecki M., Urbaniak M., Dzitko K., Ciesielska A., Wielgus E., Kadłubowski S., Kozanecki M., Applied Materials and Interfaces, 2024, 16, 15, 18434–18448) polegał na przeprowadzeniu badań mikrobiologicznych, analizie i interpretacji otrzymanych wyników.

Anita Ciesielska

Łódź, dn. 23.10.2024r.

Dr Ewelina Wielgus
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk
ul. Sienkiewicza 112
90-363 Łódź

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że mój udział w pracy „Enhanced solubility and bioavailability of clotrimazole in aqueous solutions with hydrophobized hyperbranched polyglycidol for improved antifungal activity” (Jaworska-Krych D., Gosecka M., Gosecki M., Urbaniak M., Dzitko K., Ciesielska A., Wielgus E., Kadłubowski S., Kozanecki M., Applied Materials and Interfaces, 2024, 16, 15, 18434–18448) polegał na przeprowadzeniu analizy ilościowej leku, który przeniknął przez membranę.





PODPIS ZAUFANY

SŁAWOMIR SEBASTIAN
KADŁUBOWSKI

31.10.2024 14:24:56 [GMT+1]

Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

Łódź, dn. 23.10.2024r.

Dr hab. inż. Sławomir Kadłubowski
Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej
Wydział Chemiczny
Politechnika Łódzka
ul. Wróblewskiego 15
93-590 Łódź

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że mój udział w pracy „Enhanced solubility and bioavailability of clotrimazole in aqueous solutions with hydrophobized hyperbranched polyglycidol for improved antifungal activity” (Jaworska-Krych D., Gosecka M., Gosecki M., Urbaniak M., Dzitko K., Ciesielska A., Wielgus E., Kadłubowski S., Kozanecki M., Applied Materials and Interfaces, 2024, 16, 15, 18434–18448) polegał na przeprowadzeniu i analizie pomiarów metodą chromatografii żelowej.

Łódź, dn. 30.10.2024r.

Prof. dr hab. inż. Marcin Kozanecki
Katedra Fizyki Molekularnej
Wydział Chemiczny
Politechnika Łódzka
ul. Żeromskiego 116
90-543 Łódź

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że mój udział w pracy „Enhanced solubility and bioavailability of clotrimazole in aqueous solutions with hydrophobized hyperbranched polyglycidol for improved antifungal activity” (Jaworska-Krych D., Gosecka M., Gosecki M., Urbaniak M., Dzitko K., Ciesielska A., Wielgus E., Kadłubowski S., Kozanecki M., Applied Materials and Interfaces, 2024, 16, 15, 18434–18448) polegał na analizie widm wykonanych przy pomocy spektroskopii podczerwieni.



Signed by /
Podpisano przez:

Marcin Ziemowit
Kozanecki
Politechnika Łódzka

Date / Data: 2024-
10-31 09:31

Thermosensitive Behavior of Internally Phenyl-Enriched Hyperbranched Polyglycidols in Water—The Influence of a Covalent Bond Used for the Hydrophobization

Daria Jaworska-Krych, Monika Gosecka,* Paulina Maczugowska, Krzysztof Hałagan, Kosma Szutkowski, Mateusz Gosecki, Małgorzata Urbaniak, and Marcin Kozanecki



Cite This: *Macromolecules* 2024, 57, 9135–9156



Read Online

ACCESS |

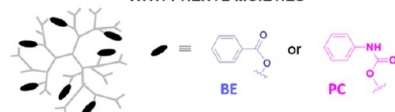
Metrics & More

Article Recommendations

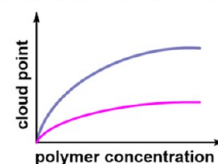
Supporting Information

ABSTRACT: Unimolecular micelles based on selectively hydrophobized hyperbranched polyglycidols, *h*HbPGLs, in the macromolecule's interior are used for the enhancement of hydrophobic drug solubility in aqueous media and as a major component of hydrophobized hydrogel-based drug delivery systems. In this article, we have investigated the thermosensitive behavior of amphiphilic hyperbranched polyglycidol obtained by the hydrophobization of the core with phenyl moieties, i.e., by modification of monohydroxyls of linear constitutional repeating units (L_{13} and L_{14}) of hyperbranched polyglycidol, HbPGL, incorporating benzoyl ester or phenylurethane groups, with terminal 1,2-diols in the corona remaining intact. A turbidimetric study revealed that *h*HbPGLs equipped with benzoyl ester (BE) groups with the degree of substitution of linear units ranging from 42 to 56 mol % and phenylurethane moieties (PC) in the range from 32 to 55 mol % in water showed lower critical solution temperature (LCST) behavior. The critical point was, however, observed at a very low concentration, approximately 3.75 mg/mL, for both HbPGL derivatives. Thus, an increase of T_{cp} based on the concentration was observed in the broad concentration range. In addition, a significant difference in T_{cp} reaching up to 40 °C for aqueous solutions of PC and BE derivatives of HbPGL of a comparable degree of substitution of monohydroxylated groups (DS ~ 50%) at a concentration equal to 150 mg/mL was detected. Raman spectra recorded for polymer-rich phases obtained upon phase separation for PC and BE derivatives revealed lower hydration of the PC derivative, indicating its higher tendency to intermolecular interactions and thus lower T_{cp} . Computational modeling methods, such as density functional theory, DFT, and molecular dynamics, MD, showed that in the case of the BE derivative, unlike the PC derivative, the phenyl rings were effectively surrounded by hydrated polyether branches, which hindered the aggregation of phenyl rings. Both Raman spectroscopy and computational investigations revealed the difference in the hydration state of the aromatic group depending on the used covalent linkage. Moreover, BE and PC derivatives displayed an asymmetric phase diagram, i.e., the dependence of T_{cp} on the polymer concentration. In general, for polymers at very broad concentrations ranging from 15 to 275 mg/mL BE and PC derivatives, respectively, an increase of T_{cp} with the increase of the polymer concentration was observed. Only in a very low concentration range from 0.12 to 3.75 mg/mL did polymers exhibit a decrease of T_{cp} with the increase of the polymer concentration. It results from the screening of the hydrophobic groups within highly water-swollen polyether branches upon the increase of the polymer concentration. The phase separation of higher-concentrated solutions required a further increase in temperature, resulting in partial dehydration of the polyether branches, which increased the hydrophobicity of the macromolecules, and the separation of the polymer from the aqueous solution was attained.

INTERNALLY HYDROPHOBIZED HYPERBRANCHED POLYGLYCIDOL WITH PHENYL MOIETIES



THERMRESPONSIVE PROPERTIES



INTRODUCTION

Polymers displaying thermosensitive behavior in aqueous media represent the most extensive group of stimuli-responsive systems and are of significant interest in biomedical applications such as drug delivery systems,^{1,2} bioseparation,³ tissue engineering,⁴ etc. They are usually divided into two main subclasses, i.e., polymers having a lower critical solution temperature, LCST,^{5–17} and an upper critical solution temperature, UCST,^{18–22} respectively. Thermosensitive polymers are well-soluble in water and form a single phase above the UCST or below the LCST, while exceeding the critical

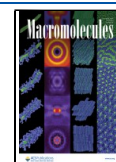
solution temperature results in phase separation. Until now, the thermosensitive behavior of polymers with linear topology has been the most extensively investigated. Poly(*N*-isopropy-

Received: July 19, 2024

Revised: September 2, 2024

Accepted: September 16, 2024

Published: September 24, 2024



lacrylamide), PNIPAM, with a cloud point at 32 °C, has been recognized as a golden standard of LCST thermosensitive polymers.^{23–29} The mechanism of the thermosensitive response of PNIPAM in water is related to coil-to-globule transition; i.e., below LCST the chains are in the form of coils due to the hydrophilicity of amide groups and their participation in hydrogen bonding with the surrounding water molecules. Heating the PNIPAM aqueous solution above its LCST results in phase separation based on the globular macromolecule aggregation via hydrophobic interactions between the hydrophobic backbone and isopropyl groups as an effect of breaking the hydrogen bonds between the polymer and water. Many studies have been focused on the LCST adjustment of PNIPAM to body temperature.³⁰ The phase separation temperature of PNIPAM can be modulated by the engineering NIPAM copolymers, specifically by changing the ratio of hydrophilic and hydrophobic units.^{27–29,31,32} In general, the incorporation of hydrophilic units causes an increase of the LCST, whereas hydrophobic comonomers lead to a decrease of the LCST. Moreover, it is well-known that the change of pH, the presence of inorganic salts,³³ host–guest complexation,³⁴ etc., also influence the LCST values. The LCST of a polymer can also differ with a change in its molecular weight.³⁵

The thermosensitivity of hydrophilic polymers can be achieved by modification with thermosensitive groups, such as NIPAM,^{36,37} or through hydrophobization by incorporating hydrophobic groups by postpolymerization modification^{35,38} or direct copolymerization of hydrophilic and hydrophobic comonomers.^{39,40} The higher the degree of hydrophobization, the lower the phase separation temperature in aqueous solutions.⁴⁰ The thermosensitive behavior of polymers is reversible; i.e., lowering the temperature below LCST leads to the formation of a single phase. However, the composition of the copolymer can evoke hysteresis,^{41,42} or even inverse hysteresis⁴³ in the heating/cooling cycle. Polymers with LCST typically display normal thermosensitive behavior, i.e., the temperature of the phase separation decreases with an increase of the polymer concentration.^{44–48} However, recently, abnormal concentration-dependence of the phase separation temperature (T_{cp}) has been reported for a few amphiphilic polymers of hyperbranched topologies, such as polyethylenimine with a degree of substitution of terminal units with phenylalanine in the range from 50 to 82%.⁴⁹ The analogous abnormal thermosensitive behavior has also been reported for hyperbranched polyglycidol, in which terminal units in the corona were decorated with alkyl chains composed of five to eight carbon atoms (C5–C8).⁵⁰ Surprisingly, HbPGL hydrophobized with C4 alkyl chains exhibited normal thermosensitive behavior, whereas HbPGLs modified with C10–C12 alkyl chains were not soluble in water despite the low degree of hydrophobization of terminal units.⁵⁰ The normal concentration thermosensitive behavior has also been reported by Sun et al. for HbPGL in which terminal units were modified with adamantane moieties at a degree equal to 16%.³⁴ The thermosensitivity of this derivative was easily modulated by the addition of β -cyclodextrins, as a result of host–guest complexation.

Schömer et al. reported the thermosensitive behavior of aqueous solutions of hyperbranched copolyethers of glycidol with propylene oxide. Their behavior was explained by the interplay of the hydrophilic groups, especially the hydrophilic terminal diol groups, and the hydrophobic methyl groups in

the apolar poly(propylene oxide) segments.⁵¹ The LCST values of these copolymers were readily adjusted by varying the comonomer ratio. By increasing the fraction of glycidol, the LCST of hyperbranched copolyethers increased.

Due to the fact that even a small change in the molecular structure of the amphiphilic polymer can markedly affect its thermosensitive properties, the characteristics of each polymer need to be determined separately. To date, there are no reports on the thermosensitive properties of core–shell amphiphilic hyperbranched polyglycidols, i.e., macromolecules with a selectively hydrophobized core obtained by the modification of linear constitutional repeating units. Such systems, among hyperbranched polyglycidol-based amphiphilic constructs, are of great interest as they play the role of an efficient solubilizing agent of hydrophobic drugs⁵² and the main building block of hydrophobized hydrogels.⁵⁸ Recently, drug-loaded amphiphilic HbPGLs were used to produce injectable and self-healable hydrogels based on boronic ester cross-links for the intravaginal administration in anticervical cancer therapies.^{39,53} The biomedical interest of HbPGL-based constructs results from excellent biocompatibility,^{54–57} low toxicity,⁵⁸ and high thermal and oxidative stability⁵⁹ of hyperbranched polyglycidol. The thermosensitive properties of polymers can directly influence the properties of constructed materials and their behavior when in contact with body fluids. Considering the construction of biomaterials based on HbPGL macromolecules it is crucial to understand their thermal behavior in aqueous media. For this goal, in this article, we studied thermosensitive behavior of HbPGLs with a selectively hydrophobized core. We selected phenyl-enriched HbPGLs, as these derivatives are crucial in the enhancement of solubilization of aryl-containing bioactive compounds in aqueous media.³⁸

We strictly focused on the relationship between the degree of hydrophobization of monohydroxylated constitutional repeating units of hyperbranched polyglycidols, the bond used for the aromatic ring immobilization, and the cloud point of the aqueous solutions of polymers. We detected a strong influence of chemical bonds, i.e., ester or urethane bonds, used to immobilize the aromatic group on the cloud point of the investigated systems.

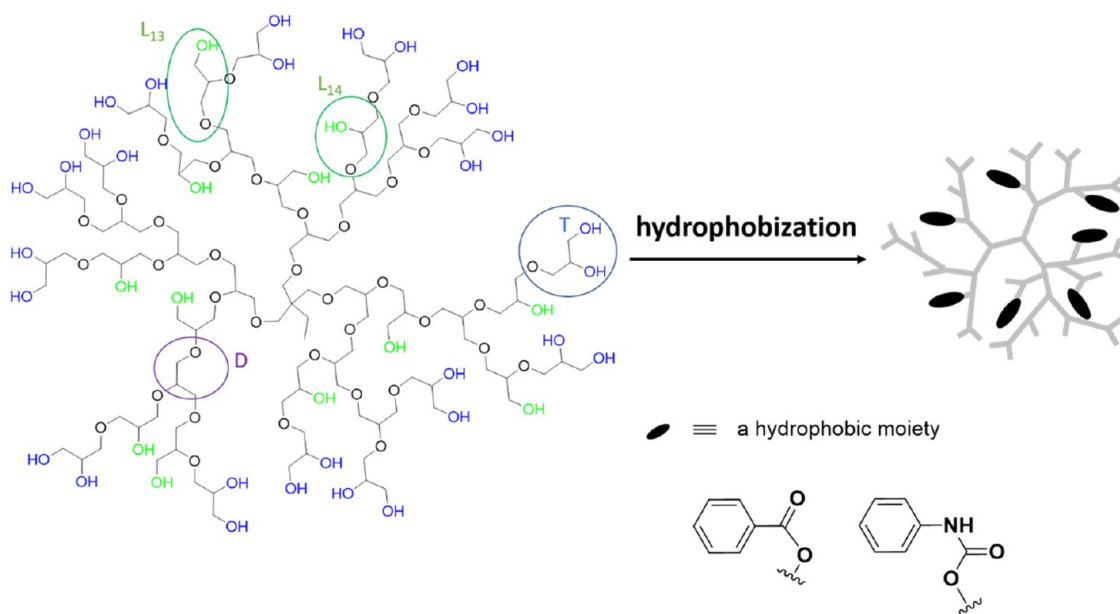
For the study of the temperature-dependent behavior of amphiphilic core–shell HbPGLs, ultraviolet/visible (UV/vis) spectroscopy, Raman spectroscopy, and optical microscopy were used. In addition, to explain the difference in the thermosensitive behavior of urethane and ester HbPGL derivatives, experimental investigations were supported by quantum mechanics calculations with the use of density functional theory, DFT method, and by simulations with the use of molecular dynamics, MD, methods.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials. Glycidol and 1,1,1-tris(hydroxymethyl)propane were purchased from Sigma-Aldrich. 2,2-Dimethoxypropane, benzoyl chloride, and phenyl isocyanate were purchased from Alfa Aesar. Anhydrous pyridine was purchased from Acros Organics. PTSA (Sigma-Aldrich) was dried with benzene. Glycidol was dried with 4 Å molecular sieves and distilled under reduced pressure.

Synthesis of Hyperbranched Polyglycidol (HbPGL). Hyperbranched polyglycidol was obtained according to the procedure described previously.⁶⁰ The structure of the synthesized polymer was characterized by ¹H and ¹³C INVGATE NMR spectroscopy (Figures S1–S2). The degree of branching (DB) of the synthesized neat HbPGL was 0.55. The molar fraction of dendritic (D) and total linear constitutional units L₁₃ and L₁₄ bearing monohydroxyl groups was

Scheme 1. Synthetic Route of the Internally Phenyl-Enriched Hyperbranched Polyglycidol, Where D = Dendritic, T = Terminal, L_{13} and L_{14} = Linear Constitutional Repeating Units (Monohydroxylated Units)



0.25 and 0.40, respectively, whereas the molar fraction of terminal units (T) containing diol moieties was 0.35. D, L_{13} , L_{14} , and T units are denoted in Scheme 1. The weight-average molecular mass M_w was determined based on GPC results using water as an eluent and is equal to 12,000 g/mol, while dispersity $\bar{D}$ = 1.8.

^{13}C NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): $L_{13}(\text{CH}_2)$ 61.44; T (CH_2) 63.50; $L_{13}(\text{CH})$ 68.81–69.50; $L_{13}(\text{CH}_2)$ 69.83; T (CH) 70.91, 2D (CH_2) 71.28; T (CH_2) 72.04; $2L_{14}(\text{CH}_2)$ 73.26; D (CH) 77.96–78.97; $L_{13}(\text{CH})$ 80.00–80.73

NMR Spectroscopy. All ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded at 295 K on a Bruker Avance NEO 400 spectrometer. Spectra were recorded in $\text{DMSO}-d_6$ or pyridine- d_5 .

For the ^1H DOSY measurements, each sample dissolved in $\text{DMSO}-d_6$ was stabilized at 295 K for at least 5 min before data accumulation, and the ^1H $\pi/2$ pulse length was checked and adjusted carefully for each sample. The standard Bruker pulse program `dstebpgp3s` was selected for measurements using double stimulated echo for convection compensation, longitudinal eddy current delay using bipolar gradient pulses for diffusion, and 3 spoil gradients. The gradient pulse (d) was set to 3.2 ms, and the diffusion time (Δ) was set to 350 ms. The gradient spoil pulse was set to 0.6 ms, the eddy current delay was set to 5.0 ms, and the delay for gradient recovery was set to 0.2 ms. The δ and Δ values were checked and adjusted for each sample to obtain appropriate signal attenuation across the DOSY measurement. The DOSY experiments were run in pseudo two-dimensional (2D) mode with gradients varied linearly from 5 to 95% in 16 steps with 16 scans per step. Spectra were processed using TopSpin 4.1 software supplied by the manufacturer. A 1 Hz line broadening Lorentzian function was applied, and each row was phased and baseline corrected before Fourier transformation in the F2 dimension. The diffusion coefficients for the resolved ^1H signals were extracted using the T_1/T_2 analyze module of the TopSpin program.

Synthesis of HbPGL with Protected 1,2-Diol Groups in Terminal Constitutional Repeating Units. Hyperbranched polyglycidol (40 g) was chemically modified by the protection of 1,2-diol groups in reaction with 2,2-dimethoxypropane (192 mL, 1.56 mol) in the presence of *p*-toluene sulfonic acid, PTSA, (0.384 g, 2.22 mmol) by ultrasonication at 40 °C for 3 h. The crude product was diluted with chloroform and extracted 3 times with a saturated Na_2CO_3 solution to remove PTSA. The organic phase was dried over MgSO_4 and dialyzed in chloroform for 24 h. The product was then dried under high vacuum and analyzed by ^1H NMR spectroscopy in

deuterated DMSO to confirm the complete conversion of terminal 1,2-diol groups to acetals (Acetal), Figure S3.

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ (ppm): 4.84–4.36 (OH- L_{13} , L_{14}); 4.14 m, 1H, CH-PG (T_{Acetal}); 3.97 (m, 1H), CH(H)-PG (T_{Acetal}); 3.80–3.20 (5H-HbPGL backbone, m, 1H, CH(H)-PG (T_{Acetal})); 1.30 (3H-CH₃ T_{Acetal}), 1.26 (3H-CH₃ T_{Acetal})

Synthesis of Internally Hydrophobized Hyperbranched Polyglycidols, hHbPGLs with Phenylurethane Moieties, PC Derivatives. A series of hyperbranched polyglycidol with protected terminal 1,2-diol groups (3.5 g) was dried with benzene, each dissolved in pyridine (20 mL) under argon conditions, and heated to 50 °C. Then, different amounts of phenyl isocyanate were added dropwise. The reactions were carried out for 24 h. After each reaction, a mixture was dialyzed against DMSO. After evaporation of the solvent, the degree of hydrophobization of all monohydroxyl units was determined based on the ^1H NMR spectra recorded in deuterated $\text{DMSO}-d_6$, comparing the integration of methyl protons from acetal groups in terminal units (1.15 and 1.35 ppm) and aromatic protons from phenyl groups in the chemical shift in the range from 6.8 to 7.6 ppm. (Figures S4–S10).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) for the Ph-HbPGL derivative: 9.78–9.55 (1H-NH); 7.46–2H, 7.25–2H, 6.97 (1H-phenyl); 4.97 (1H-CH- $L_{1,4}$ -hydrophobic); 4.86–4.38 (1H-OH- $L_{1,3}$, $L_{1,4}$); 4.20 (1H-CH₂- $L_{1,3}$ -hydrophobic); 4.11 (1H-CH₂-T_{Acetal}); 3.94 (1H-CH₂-T_{Acetal}); 3.82–3.02 (HbPGL backbone); 1.29 (3H-CH₃ T_{Acetal}); 1.23 (3H-CH₃ T_{Acetal}).

Subsequently, 1,2-diol groups of each polymer in terminal units were deprotected by the addition of an aqueous solution of 0.1 M HCl to the polymer solution in DMSO and stirred overnight at room temperature. The mixtures were dialyzed against deionized water for 24 h, changing the solvent until a neutral pH. The products were lyophilized and characterized by using ^1H NMR spectroscopy in deuterated $\text{DMSO}-d_6$ and pyridine- d_5 (Figures S11–S17).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) for Ph-HbPGL derivative: 9.80–9.49 (1H-NH); 7.45–2H, 7.25–2H, 6.97–(1H-phenyl); 4.98 (1H-CH- $L_{1,4}$ -hydrophobic); 4.86–4.36 (1H-OH- $L_{1,3}$, $L_{1,4}$, T); 4.21 (1H-CH₂- $L_{1,3}$ -hydrophobic); 4.09 (1H-CH₂- $L_{1,3}$ -hydrophobic); 3.90–3.00 (HbPGL-backbone).

^1H NMR (400 MHz, pyridine- d_5) δ (ppm) for Ph-HbPGL derivative: 10.78 (1H-NH); 7.91–2H, 7.36–2H, 7.06 (1H-phenyl); 5.48 (1H-CH- $L_{1,4}$ -hydrophobic); 4.57 (1H-CH₂- $L_{1,3}$ -hydrophobic); 4.46 (1H-CH₂- $L_{1,3}$ -hydrophobic); 4.40–3.25 (HbPGL-backbone)

Synthesis of Internally Hydrophobized Hyperbranched Polyglycidols, hHbPGLs with Benzoyl Ester Groups, BE Derivatives. A series of hyperbranched polyglycidol with protected terminal 1,2-diol groups (3.5 g) was dried with benzene, each dissolved in pyridine (20 mL) under argon conditions and cooled in an ice bath to 0 °C. Then, different amounts of benzoyl chloride were added dropwise. Each reaction was carried out for 24 h. Then the reaction mixture was dialyzed against DMSO. After evaporation of the solvent, the degree of hydrophobization of all monohydroxyl units was determined for each polymer based on the ^1H NMR spectra recorded in deuterated DMSO- d_6 (Figures S18–S24), by comparing the integration of methyl protons from acetal groups in terminal units (1.15 and 1.35 ppm) and aromatic protons from phenyl groups in the chemical shift from 7.4 to 8.1 ppm.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) for the BE derivative: 7.95–2H, 7.62–1H, 7.50–2H (phenyl); 5.25 (1H–CH- $L_{1,4}$ -hydrophobic); 5.01–4.31 (1H–OH- $L_{1,3}$, $L_{1,4}$); 4.24 (1H–CH $_2$ - $L_{1,3}$ -hydrophobic); 4.13 (1H–CH $_2$ -T $_{\text{Acetal}}$); 3.94 (1H–CH $_2$ -T $_{\text{Acetal}}$); 3.82–3.14 (HbPGL–backbone); 1.29 (3H–CH $_3$ T $_{\text{Acetal}}$); 1.25 (3H–CH $_3$ T $_{\text{Acetal}}$).

After the determination of the degree of hydrophobization, the diol groups were deprotected by adding 0.1 M HCl aqueous solution to the polymer solution in DMSO and stirred overnight. Finally, the mixture was dialyzed against deionized water and analyzed with ^1H NMR spectroscopy in deuterated DMSO- d_6 and pyridine- d_5 (Figures S25–S31).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) for the BE-hbPGL derivative: 7.97–2H, 7.63–1H, 7.52–2H (phenyl); 5.26 (1H–CH- $L_{1,4}$ -hydrophobic); 4.93–4.33 (1H–OH- $L_{1,3}$, $L_{1,4}$, T); 4.25 (1H–CH $_2$ - $L_{1,3}$ -hydrophobic); 4.01–2.98 (HbPGL–backbone)

^1H NMR (400 MHz, pyridine- d_5) δ (ppm) for the BE derivative: 8.21–2H, 7.48–1H, 7.39–2H (phenyl); 5.73 (1H–CH- $L_{1,4}$ -hydrophobic); 4.72 (1H–CH $_2$ - $L_{1,3}$ -hydrophobic); 4.60 (1H–CH $_2$ - $L_{1,3}$ -hydrophobic); 4.45–3.25 (HbPGL–backbone).

Differential Scanning Calorimetry (DSC). The temperature of glass transition of polymers (T_g) was determined by DSC analysis, which was performed on a 2920 modulated DSC (TA Instruments) at a heating and cooling rate of 10 K/min. Samples were dried before sealing in an aluminum pan, and then a heating/cooling loop was applied.

Characterization of Thermosensitive Behavior. Turbidimetry Study of the Phase Transition of Internally Hydrophobized Hyperbranched Polyglycidols. The phase behavior of the aqueous solutions of the hydrophobized hyperbranched polyglycidols, i.e., their coil-to-globule transition was monitored optically by the change of transmittance at the following wavelengths: λ 400, 600, and 800 nm, respectively, by changing the temperature from 276 to 363 K with a 5 K increment using a UV/vis spectrophotometer (Analytik Jena Specord S600) equipped with a Peltier temperature-controlled 8-cell sample changer. Samples were continuously stirred with a magnetic stirring bar. At each temperature, a sample was held for 120 s before the measurement to ensure thermal equilibrium. The cloud point, T_{cp} was recorded as the temperature at which the onset of transmittance decreased.

Raman Measurements. Raman spectra were recorded with a MultiRAM FT Raman spectrometer (Bruker GmbH) equipped with a Nd:YAG diode laser (1064 nm; nominal power 500 mW) as an excitation light source. The spectra were collected with a spectral resolution of 4 cm^{-1} . To obtain the high-quality spectra required for further mathematical treatment, 1064 scans were averaged. Investigated solutions were placed in a quartz cuvette (optical pathway 10 mm). Next, the cuvette was placed into the Peltier accessory adapted to the macrochamber of the MultiRAM spectrometer, and the required temperature was set up with an accuracy of ± 0.1 °C. Mathematical operations such as baseline correction and differential spectra calculations were performed using Origin PRO software (OriginLab Corporation).

Optical Microscopy Investigations. The (polarized) optical microscopy images were obtained with a Digital Microscope Keyence VHX-S7000.

Quantum Mechanics (QM) Studies. Optimization of the geometry of studied systems was performed using the density functional theory (DFT), specifically the B3LYP method with the 6-311G(d,p) basis set in Gaussian 16 software (version ES64L-G16RevA.03). Electric charges were calculated using Merz–Singh–Kollman scheme^{61,62} with the total charge as zero. Because of the technical limitation, only one, exemplary, branch of studied structures was modeled (the branch under study contained ~ 100 atoms without and with water molecules; see Scheme 1). The cutoff distance for the distinction of hydrogen bond (H-bond) was set to 3.5 Å while the cutoff angle was 140°. Data visualization was performed using Avogadro 1.2.0 and GaussView 6.0.12 software.

Molecular Dynamics (MD) Studies. Molecular dynamics simulations for a single HbPGL macromolecule were performed with the use of LAMMPS software, version 02.08.23. Two variants of the simulations were applied. For both, the 1 fs time step was selected. The simulated systems contained 5741 and 5778 water molecules for ester and urethane derivatives, respectively. The simulation boxes had periodic boundary conditions. The cutoff for the Lennard–Jones interactions was 9 Å, and for the Coulomb interactions 8.5 Å. Above 8.5 Å, the PPPM (Particle–Particle Particle–Mesh) algorithm^{63,64} was used to reproduce electrostatic interactions. The OPLS-AA force field was applied for polymer and for water TIP4P/2005 model, while in the second variant, the polymer was described with Amber 18 force field and water with TIP3P model⁶⁵ (results included in Supporting Data). Before the simulation was started, an energy minimization was performed. The first 50,000 time steps (50 ps) were conducted in NVT mode (thermalization), while the next 5,000,000 steps (5 ns) were conducted in NPT mode. The selected temperature was set at the beginning of the main simulation run. Time averaging was taken from a time interval of 1 ns with a 5 ps interval in an equilibrium state (defined based on the stabilization of the system density). Data visualization was performed using software Ovito 2.9.0, Avogadro 1.2.0, and GaussView 6.0.12 software.

A series of large-scale molecular dynamics (MD) simulations were conducted using Yasara software, version 23.12.24. Ten HbPGL macromolecules were placed in a $100 \times 100 \times 100 \text{ Å}^3$ simulation box. The initial positions and orientations of the polymer molecules were random. Subsequently, the system was populated with water molecules at a density ranging from 0.994 g/mL at 308 K to 0.97 g/mL at 353 K (TIP3P). The water density calculator, accessible via the Web site www.engineeringtoolbox.com, was employed to determine the density of water in the system. In the simulations, there were 5741 or 5778 water molecules per one HbPGL macromolecule for the ester and urethane derivatives, respectively. The Amber14 force field was employed with periodic boundary conditions, and the Coulomb interactions were averaged using the Lagrange–Coulomb method with a cutoff distance of 14 Å. Prior to the molecular dynamics (MD) run, energy minimization was performed using the steepest descent method to remove energy bumps, and then simulated annealing was applied. The bonded and nonbonded interactions were calculated at a rate of one ps. The frames were recorded at a rate of 10 ps. The data visualization was conducted using the Avogadro 1.2.0 software. The trajectory of carbon atoms was monitored and the mean-squared displacement (MSD) was calculated for all C atoms using the Python library MD Analysis. The MSD is the squared difference between the initial and actual position, averaged over all C atoms. After approximately 4 ns, the HbPGL macromolecules started to aggregate (Figure 12A,B). The diffusion coefficients were obtained for times below 4 ns. The analysis of intermolecular phenyl ring interactions was conducted during the aggregated stage.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis of Internally Hydrophobized Hyperbranched Polyglycidols with Phenyl Moieties. Internally hydrophobized hyperbranched polyglycidols with phenyl moieties were obtained by selective modification of monohydroxylated linear constitutional repeating units (L_{13} and L_{14})

in HbPGL in the reaction with benzoyl chloride and phenyl isocyanate, respectively, remaining intact 1,2-diol groups in terminal constitutional repeating units (T), Scheme 1. This approach required, however, the protection of 1,2-diols, which was attained by their protection in the form of acetals according to the procedure described by Türk et al.⁵² A series of hydrophobized HbPGLs differing in the number of phenyl moieties were obtained by changing the benzoyl chloride/phenyl isocyanate molar ratio to linear constitutional repeating units in the macromolecule. The degree of substitution of monohydroxylated constitutional repeating units was estimated based on ¹H NMR spectra recorded for each hydrophobized HbPGL in pyridine-*d*₅ comparing the integration of aromatic protons with the integration of CH and CH₂ protons present in all repeating units (D, T, L₁₃, L₁₄), hydrophobized L₁₃ and hydrophobized L₁₄, relative to the molar fraction of all linear constitutional repeating units known based on the ¹³C INVATE NMR spectrum recorded for the neat HbPGL macromolecule. The degree of substitution ranged from 14 to 64 mol %, and from 19 to 71 mol %, for phenylurethane, PC, and benzoyl ester, BE derivatives of HbPGL, respectively (Table 1). In addition, ¹H DOSY NMR spectroscopy

Table 1. Structural Characteristics of the Synthesized Internally Phenyl-Enriched HbPGLs Performed Based on ¹H NMR Spectra Recorded for Hydrophobized HbPGLs in Pyridine-*d*₅ and the ¹³C INVATE NMR Spectrum of Neat HbPGL Recorded in DMSO-*d*₆

linkage	hydrophobized HbPGL	molar fraction of hydrophobized constitutional units bearing monohydroxyl groups (L ₁₃ + L ₁₄)	average number of hydrophobized units per one macromolecule	<i>T</i> _g , °C
urethane	PC14	0.137	5	−16.6
	PC26	0.260	8	−8.2
	PC32	0.321	13.7	3.4
	PC38	0.38	17.8	9.2
	PC46	0.46	17.9	13.0
	PC55	0.550	22.0	21.2
	PC64	0.640	23.1	21.6
ester	BE19	0.186	6.9	−26.4
	BE33	0.333	12.6	−22.3
	BE42	0.416	16.0	−10.2
	BE46	0.454	19.9	1.9
	BE54	0.544	25.3	1.7
	BE56	0.561	27.0	0.4
	BE71	0.706	30	−1.2

confirmed the immobilization of phenyl moieties with hyperbranched polyglycidol (Figures S32–S45). The hydrophobization of HbPGL increased its glass transition, *T*_g (Table 1). A higher degree of HbPGL hydrophobization with the phenylurethane groups led to a further increase in the *T*_g of the synthesized polymers. It is noteworthy that for PC derivatives the higher increase of *T*_g was, however, observed in comparison to BE derivatives of HbPGL. For example, *T*_g of PC46 derivative was equal to 13.0 °C, whereas *T*_g of its ester counterpart of a comparable degree of hydrophobization (BE46) was 1.9 °C. Such significant difference can be ascribed to the fact that urethane linkages are prone to form hydrogen bonds, which is especially favorable in the low-temperature range and thus leads to the restriction of segmental motions in

a wider temperature range and thus stiffening of PC macromolecules.

Phase Transition of the Aqueous Solutions of Internally Hydrophobized Hyperbranched Polyglycidol with Phenyl Moieties. The phase behavior of the aqueous solutions of the synthesized hydrophobized hyperbranched polyethers was investigated with turbidimetry using UV–vis spectroscopy by determining the cloud point of different concentrated samples (Figures S46–S90). The change of the light transmittance upon the heating was monitored. The cloud points were determined at the temperature at the onset of the transmittance decreased. The onset was chosen since at low polymer concentration the transmittance drop did not reach 50%. The transmittance was measured at three wavelengths, i.e., 400, 600, and 800 nm to be able to observe precipitated objects of different sizes. Because no significant difference in results for most samples was observed, *T*_{cp} was determined based on the transmittance dependence on temperature at the 400 nm wavelength.

The aqueous solutions of HbPGLs, in which all linear units were modified with phenylurethane groups up to approximately 30 mol % did not display thermosensitive behavior, whereas the modification of these units equal to 64 mol % makes this polymer insoluble in water. The aqueous solutions of PC derivatives with linear units modified in the range from 32 to 55 mol % only displayed thermosensitive properties. In the case of benzoyl-modified HbPGLs (BE) derivatives, the thermosensitive behavior was detected for the aqueous solutions of polymers in which linear units were hydrophobized in the range from 42 to 56 mol %. BE derivatives with linear units modified below 33 mol % did not display thermosensitive behavior, whereas BE derivatives with linear units were modified at 71 mol % were insoluble in water.

In general, the aqueous solutions of hydrophobized hyperbranched polyglycidols, i.e., PC32–PC55, and BE42–BE56 in the concentration range from 50 to 275 mg/mL displayed the phase transition upon heating (Figure 1A,B), however, characterizing the increase of the cloud point with the increase of the polymer concentration. Generally, the higher the concentration of hHbPGL was, the better solubility in water was observed.

In addition, the significant difference in the cloud point for both ester and urethane HbPGL's derivatives of a comparable degree of substitution was detected. HbPGLs modified with phenylurethane groups turned out to be more hydrophobic as their phase transition was observed at lower temperatures (Figure 1). For instance, the cloud point, *T*_{cp} of the aqueous solution of PC46 (*c* = 50 mg/mL) was equal to 287.7 K, whereas *T*_{cp} of BE46 aqueous solution at the same concentration was equal to 322.8 K. In Figure 1C, the visualization of concentration-dependent thermosensitive behavior of BE and PC HbPGL's derivatives of a comparable degree of substitution (BE46 and PC46) is presented. BE46 formed transparent solutions at room temperature in the concentration range from 25 to 275 g/mL. For PC46 samples, better solubility was observed for more concentrated solutions at room temperature. The increase of solubility of PC46 samples at the concentration in the range from 50 to 275 g/mL was, however, achieved upon cooling to 283 K. The heating of BE46 solutions to 338 K resulted in the reduction of their solubility, as an effect of their phase transition, however, the clouding was more evident for less concentrated samples.

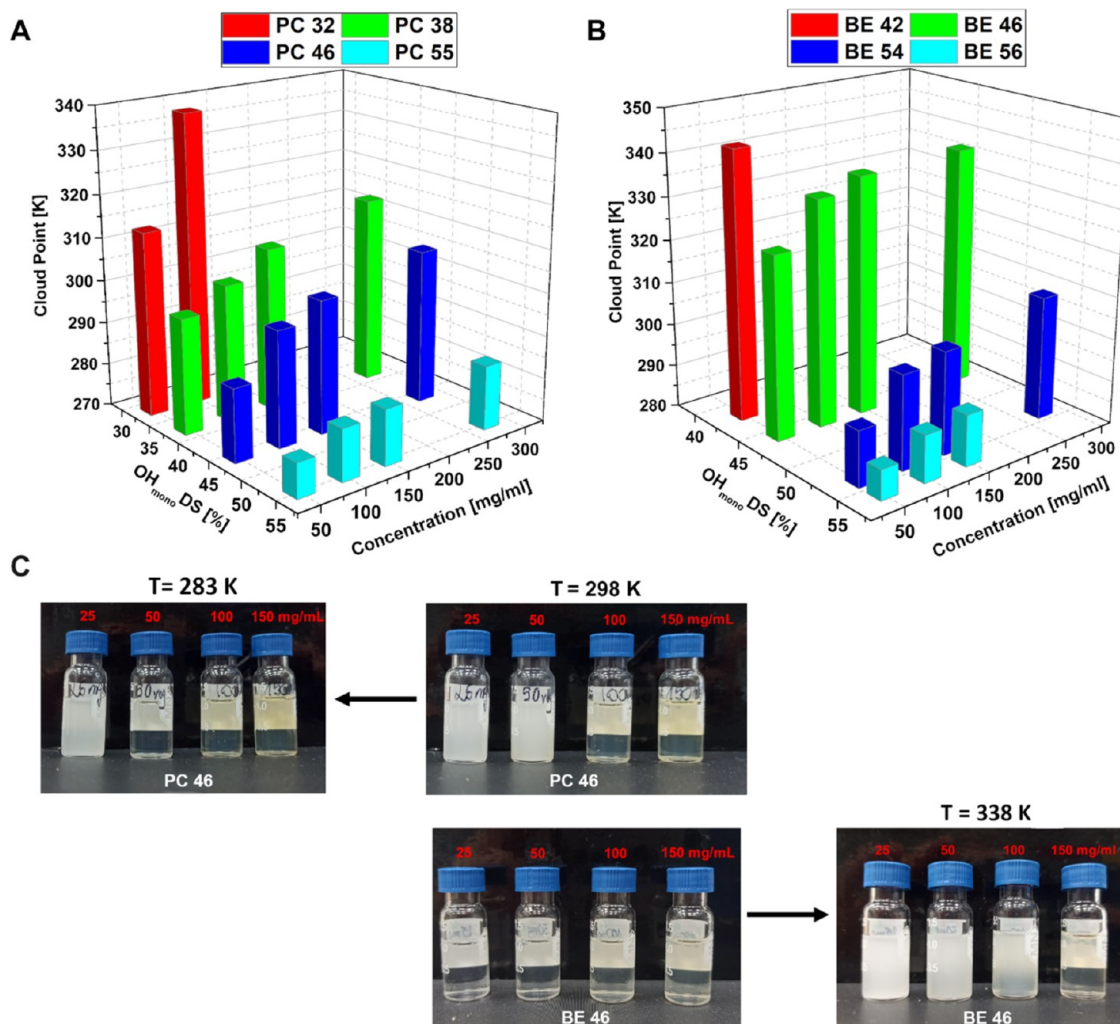


Figure 1. Dependence of the cloud point on the degree of substitution of monohydroxylated linear constitutional repeating units of HbPGL with phenylurethane (A) and benzoyl ester (B) groups, respectively, and the concentration of hydrophobized HbPGLs. Visualization of concentration-dependent aqueous solutions of PC46 and BE46 at different temperatures (C).

The study of thermosensitive behavior of all investigated hydrophobized HbPGLs revealed the decrease of the cloud point along with the gradual increase of the degree of hydrophobization of HbPGL's core despite the concentration of the polymer (Figure 1A,B). For instance, at a polymer concentration equal to 50 mg/mL, T_{cp} for BE42 was 343 K, whereas for BE56 T_{cp} was decreased to 287.4 K. The comparable trend was observed for phenylurethane derivatives T_{cp} , i.e., for PC32 was 313 K, whereas for PC55 T_{cp} dropped to 278 K ($c = 50$ mg/mL). More hydrophobic HbPGL derivatives displayed lower cloud points.

The analysis of thermosensitive behavior of phenyl-enriched HbPGL derivatives (PC46 and BE46) in a very wide concentration range revealed that the dependence of the cloud point on the polymer concentration is asymmetric with the critical point observed in a very low concentration (Figure 2). Thus, in a very wide range of concentrations, i.e., from 15 to 275 mg/mL both derivatives displayed the increase of the cloud point with their concentrations. Only at the low range of concentrations, i.e., from 0.12 to 3.75 mg/mL the cloud points of both polymers were increasing along with the increase of their contents in the solution. Approximately in the range of polymer concentration from 3.75 to 15 mg/mL, the cloud

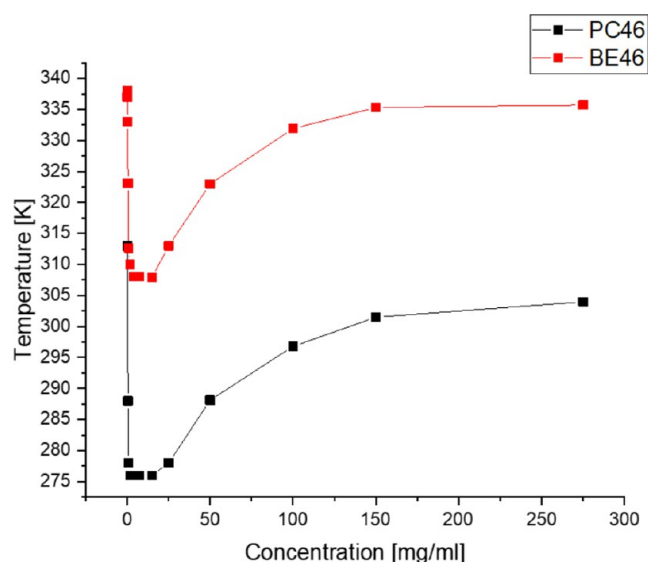


Figure 2. Dependence of the cloud point on the polymer concentration. T_{cp} values are taken from turbidimetry experiments using UV-vis spectroscopy.

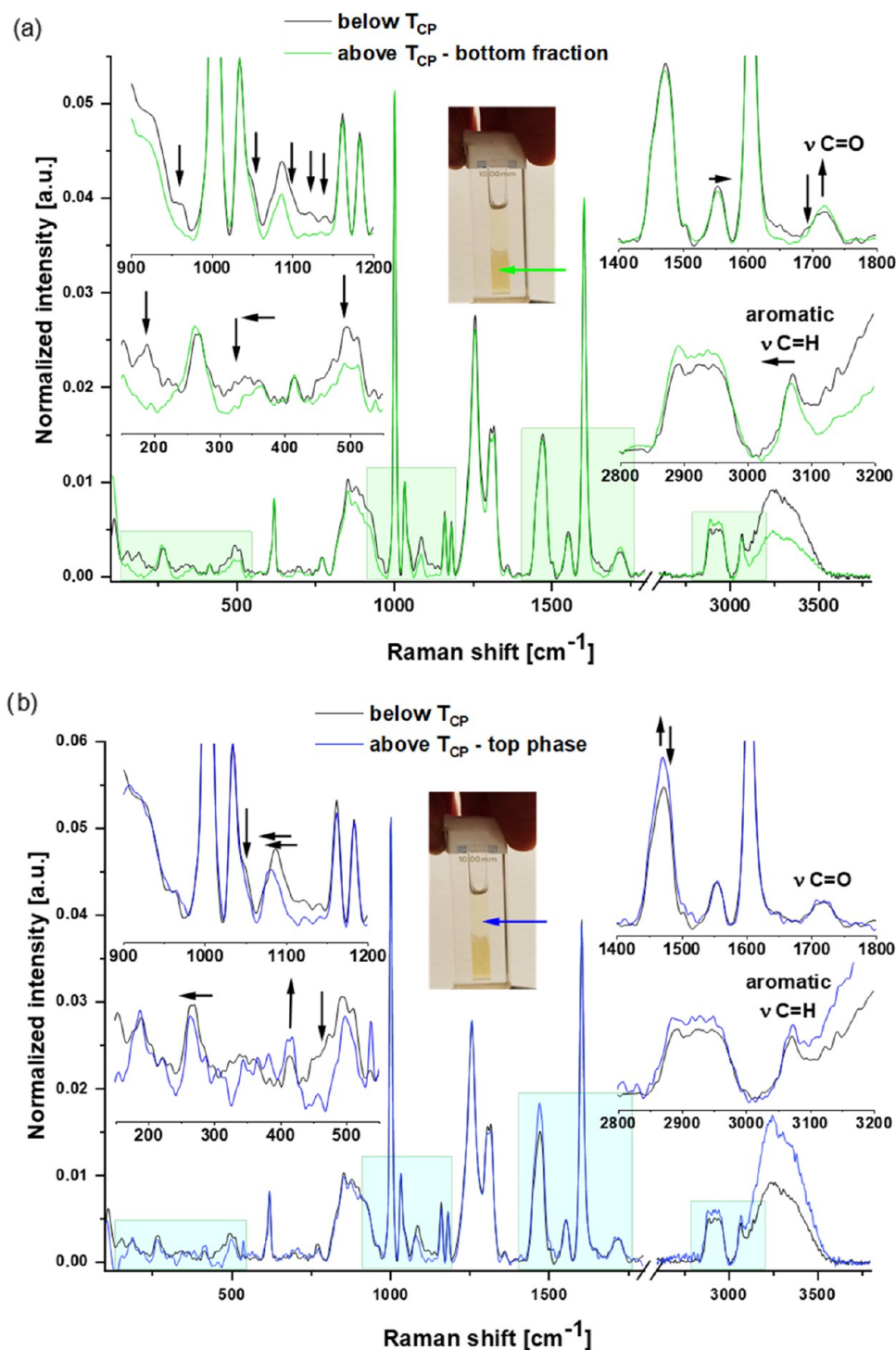


Figure 3. Comparison of the Raman spectra recorded at room temperature for the bottom layer (a) (polymer-rich phase) and the top layer (b) in the cuvette, i.e., water-rich phase, obtained above the cloud point for the aqueous solution of PC46 with the spectrum of PC46 aqueous solution below the phase transition.

point values did not change. It can be concluded that during the construction of the cross-linked materials based on hydrophobized HbPGLs the dominant behavior of the increase of T_{CP} with the increase of the polymer concentration should be taken into account, as this may affect their properties. Dynamic light scattering (DLS) investigations performed for BE46 derivative and PC46 in the range of concentrations from 0.24 to 30 mg/mL revealed that macromolecules at a temperature below T_{CP} exist in the form of unimolecular

micelles of the volume size below 10 nm (Figures S91–S101). Heating the aqueous solutions above T_{CP} resulted in a sudden increase in the particle size.

Heating concentrated aqueous solutions of *h*HbPGLs resulted in the formation of a coacervate in a cuvette (Figure 3), i.e., an aqueous phase rich in polymer obtained by liquid–liquid separation occurring above the cloud point. Due to the low T_g of all hydrophobized HbPGL macromolecules (Table 1) polymer droplets were isolated from the water phase in the

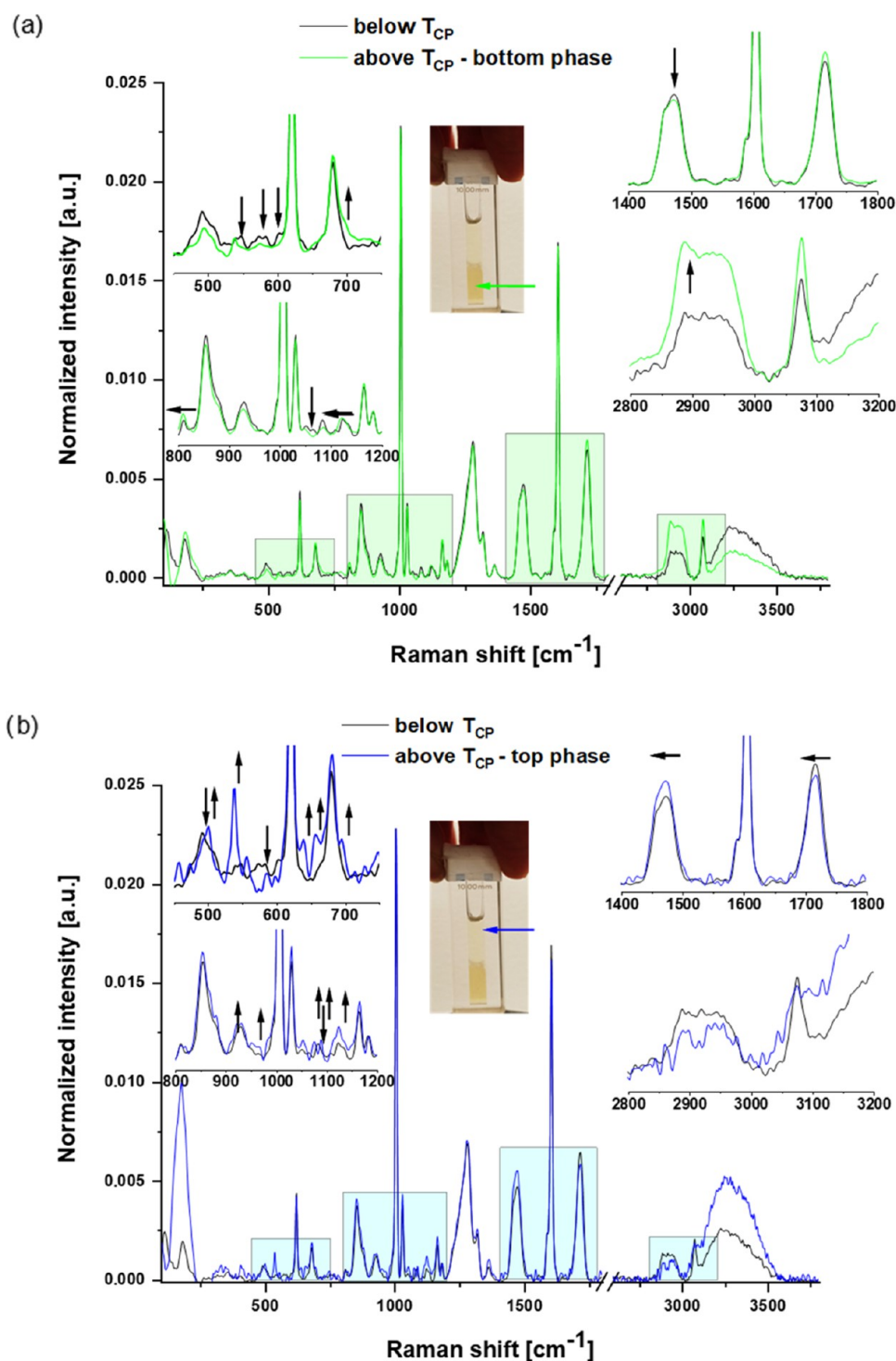


Figure 4. Comparison of the Raman spectra recorded at room temperature for the bottom layer (a) (polymer-rich phase) and the top layer (b) in the cuvette (water-rich phase) obtained above the cloud point for the aqueous solution of BE46 with the spectrum of the BE46 aqueous solution recorded below the phase transition.

form of an oil phase. The higher density of each hydrophobized HbPGL in comparison to water density causes the polymer-enriched phase to be collected at the bottom of the cuvette. In addition, the images recorded for heated aqueous solutions of hydrophobized HbPGLs at a concentration equal to 150 mg/mL under the optical microscope revealed the formation of the polymer droplets at the temperature corresponding to the cloud point which upon further heating gradually condensed into bigger droplets (Figure S102).

Raman Spectroscopy Investigations of Thermosensitive Behavior of the Internally Hydrophobized Hyperbranched Polyglycidols with Phenyl Moieties. Raman spectroscopy was used to compare the behavior of *h*HbPGLs macromolecules in the aqueous solution below the cloud point and in phases obtained after the phase separation, i.e., above the cloud point to explain the difference in the thermosensitive behavior of BE and PC HbPGL derivatives (Figures 3 and 4). For the study, we used the aqueous solutions of BE46 and

PC46 derivatives, respectively, at a concentration equal to 150 mg/mL. The bottom yellow-colored phase was polymer-rich, whereas the top phase was water-rich and transparent. Raman spectroscopy confirmed the presence of a given polymer in the top phase, which was also confirmed with ^1H NMR spectroscopy. Figures 3A and 4A showed that the polymer concentration was significantly higher in the bottom phase than in the top phase (because the broadband related to OH stretching was significantly less intense in the bottom phase than in the top phase). However, both water and polymer contributed to the OH stretching band, and the undoubted determination of the contribution of water (analysis of water structure) and hydroxyl groups of polymer (analysis of inter- and intramolecular interactions of these groups with the environment) to this band turned out to be impossible.

The comparison of the Raman spectra recorded for the bottom phases of BE46 and PC46, respectively, with the spectra of their aqueous solutions revealed the significant difference in the behavior of macromolecules. In the case of PC46 sample, the significant changes in the ratio of intensities of Raman lines at 1690 and 1720 cm^{-1} were visible in comparison to the aqueous solution (before heating). The intensity of the line at 1690 cm^{-1} corresponding to hydrated carbonyl groups decreased, while the intensity of the line at 1720 cm^{-1} assigned to nonhydrated $\text{C}=\text{O}$ groups increased.^{66–68} Observed changes indicated partial dehydration of the carbonyl groups of the macromolecule in the bottom phase. Also, the shift of the band related to $\text{C}-\text{H}$ stretching in aromatic rings (line at ca. 3060 cm^{-1}) to the lower wavenumbers was visible. This shift may be explained by the dehydration of the aromatic rings and the increase in the $\pi-\pi$ interactions between phenyl rings. The most pronounced changes were visible in the wavelength ranges from 1100 to 1150 cm^{-1} and from 150 to 550 cm^{-1} where the bands sensitive to hydration and conformation of polyether segments occur.^{69,70} Detailed analysis of these changes is, however, difficult because of the complexity of the investigated systems resulting from irregular hyperbranched structures of macromolecules, random localization of phenyl moieties, and numerous accessible conformations, especially in the aqueous phase. Therefore, the vibrational bands are broad and strongly overlap each other. In addition, the intensity of Raman bands corresponding to the vibration of polar groups, i.e., the intensity of the bands related to ether $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ bridges, is relatively weak in comparison to lines assigned to the phenyl ring. However, the decrease in the intensity of lines 960 and 1040 cm^{-1} proved the changes in the hydration of polyether backbones.⁷¹

The Raman investigations of the bottom phase of BE46 obtained from the solution concentrated at $c = 150$ mg/mL, contrary to its aqueous solution (below the cloud point) and the bottom phase of PC46, showed no changes in CH stretching in the aromatic range. Contrary to the PC46 behavior, in the Raman spectrum of the bottom phase of BE46 sample the intensity of the line 2880 cm^{-1} increased which can be ascribed to the dehydration of the glycidyl parts.⁶⁸ The differences in the behavior of PC and BE derivatives of HbPGL cannot be explained considering only the different temperature conditions to which the samples were heated, which was dictated by the cloud points of both polymers. It is visible that the hydrogen bonds between the BE derivative and water molecules are more stable at higher temperatures than those observed for the PC derivative, in which phase separation

occurred at lower temperatures. These results undoubtedly showed that the BE derivative is more hydrophilic, in comparison to the PC one.

The analysis of the top phase of PC46 showed that macromolecules are comparably hydrated as they were in the aqueous solution (before the phase separation) because no significant changes in vibration of $\text{C}-\text{H}$ of the aromatic ring and in $\text{C}=\text{O}$ stretching were observed. Strong conformational changes in aliphatic segments were however visible based on the changes in intensities ratio for lines 1450 and 1470 cm^{-1} corresponding to bending of CH_2 groups.⁶⁸ Similarly to the bottom phase, the decrease of the intensity of the line 1040 cm^{-1} was observed. Moreover, the shift of the line from 1085 to 1075 cm^{-1} , and complex changes in the intensities of bands between 150–550 cm^{-1} – ascribed as sensitive to macromolecule conformation were observed. These variations indicated the changes in both the hydration and the conformation of the ether segments; however, they are different in the top and bottom phases. Macromolecules in the top phase remained hydrated, as in the neat aqueous solutions of both polymers. This leads to the conclusion that the polyether/polyglycidyl parts play an important role in the mechanism of the thermosensitivity of hydrophobized HbPGLs.

It is also important to notice that in the case of BE46, the position of the Raman line corresponding to CH stretching in phenyl rings shifted neither in the bottom nor in the top phase in comparison to the neat aqueous solution (before the phase separation). In addition, the changes in the vibration of $\text{C}=\text{O}$ groups are subtle in the BE46 sample in both phases, suggesting a high degree of macromolecule hydration even above the cloud point. Only a very slight shift of the line 1720 cm^{-1} to the lower wavenumber was found for the top phase proving a partial dehydration of $\text{C}=\text{O}$ groups. In the spectrum of the top phase of BE46, the most pronounced changes are noticed in intensities of the bands sensitive to hydration and conformation of ether parts, i.e., in the ranges 450–700 and 1440–1490 cm^{-1} . It means that the conformational changes in the polyether branches of the macromolecule are an important effect of the cloud point.

In summary, the Raman spectroscopy data indicate that the difference in T_{cp} detected for the aqueous solutions of PC46 and BE46 derivatives at the same concentration results from the stronger interactions of the BE46 sample with water molecules than those observed for the PC46 derivative. This was revealed by weak temperature-induced changes in the hydration of both the $\text{C}=\text{O}$ group and the phenyl ring above the turbidity point. This behavior demonstrates the greater hydrophilicity of the BE46 derivative than that of the PC46 derivative resulting from the formation of more stable hydrogen bonds between the $\text{C}=\text{O}$ group and water molecules.

Computational Studies of the Thermosensitive Behavior of Internally Hydrophobized Hyperbranched Polyglycidol with Phenyl Moieties in Aqueous Media. Since the turbidimetry results showed a significant difference in the temperature of the phase transition observed for PC and BE derivatives of HbPGL, in addition, Raman spectroscopy showed that BE derivative was more hydrophilic than the PC counterpart, we performed a computer simulation study to clarify the effect of the bond used to attach the aromatic group on the thermosensitive behavior of hydrophobized HbPGL derivatives. It is well-known that the cloud point of a more

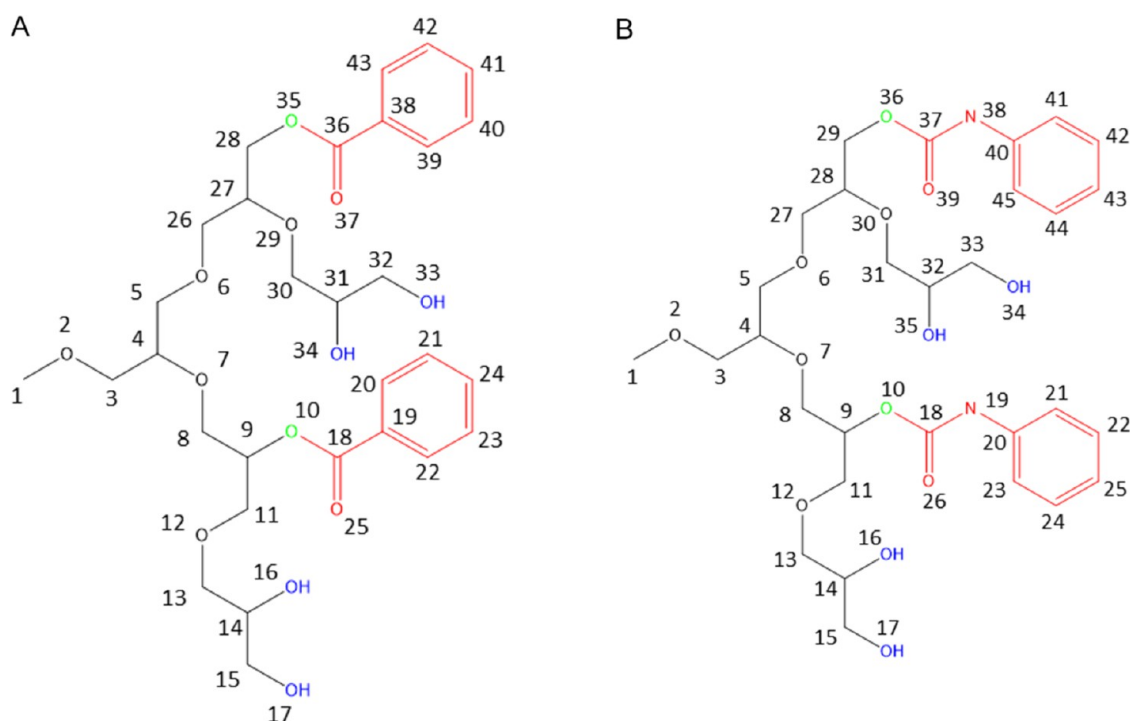


Figure 5. Structures of isolated fragments of hyperbranched polyglycidol hydrophobized with phenyl moieties immobilized via ester, BE (A), and urethane, PC (B) linkages, respectively. Methyl group was introduced as a terminal group (labeled as “1”) instead of the rest of the HbPGL molecule to limit the number of atoms in DFT calculations and maintain the total charge as zero.

hydrophobic copolymer is typically lower in comparison to that of a more hydrophilic polymer.^{23,41,72} Thus, our main goal was to explain the difference in the hydrophilicity/hydrophobicity of both BE and PC derivatives of HbPGL in aqueous media. First, the DFT method was used to estimate the electron density of isosurfaces in the structures. The high level of complexity of investigated macromolecules resulted mainly from a large number of hydrogen bonds formed and many similar energetic states, the optimization took months of computing time, which forced us to isolate a fragment of each hydrophobized macromolecule being approximately one/eighth of a complete macromolecule (Figure 5). Due to the complex structure of the hydrophobized HbPGL macromolecule, it is clear that the selected structures are not representative of all possible isomers. However, they allow studying the behavior of hydrophobic phenyl groups in the hydrophilic environment of hyperbranched polyglycidol, including phenyl–phenyl interactions, which seems to be crucial for understanding a hydrophilic/hydrophobic balance in the investigated polymers.

The geometry of the isolated fragments of hydrophobized HbPGLs with phenyl moieties immobilized via ester (A) and urethane (B) linkages (Figure 5A,B), respectively, was optimized under vacuum with the use of the DFT method. The partial charge of particular atoms is given in Table 2 (in units of electron charge). Figure 6A,B present visualization of electron density iso-surface with 0.001 e/a.u.³ value for ester and urethane HbPGL derivatives, respectively, mapped with electrostatic potential map color in the range from −0.1 (the reddest) to 0.1 (the bluest) Hartree/e. As Figure 6A shows, the most negative atoms in HbPGL modified with benzoyl ester moieties are oxygen atoms in 1,2-diol and carbonyl groups, whereas the most positive are carbon atoms in carbonyl groups. In the case of HbPGL hydrophobized with phenylurethane groups, the most negative atoms are nitrogen in the

urethane group and oxygens in both 1,2-diol and carbonyl groups, while the most positive atoms are carbon atoms from the urethane group. DFT investigations revealed the formation of intramolecular hydrogen bonds of 2 Å length between oxygen atoms of carbonyl in both ester or urethane moieties (depending on the HbPGL derivative), and hydroxyls of 1,2-diol present in terminal constitutional repeating units, exemplary illustrated in Figure 6 as yellow lines.

In the next step, using the DFT method, the hydrated fragments of the hydrophobized HbPGL structures were optimized. For this purpose, water molecules were initially incorporated randomly into the investigated systems. The optimized systems are visualized in Figure 7, in which hydrogen bonds are explicit shown by dashed lines.

The number of hydrogen bonds formed between a selected fragment of hHbPGL and water was similar for both HbPGL derivatives. For the ester derivative, the length of hydrogen bonds between water molecules and polymer varied in a range from 1.8 to 2.3 Å, whereas for the urethane derivative, it was in a range from 1.8 to 2.0 Å. The addition of water to the urethane derivative resulted in the breaking of the intramolecular H-bond between oxygen atoms of carbonyl of the urethane group and hydrogen coming from hydroxyl of the 1,2-diol group, which was not observed for the BE derivative.

Generally, the DFT investigations revealed that oxygen atoms of the carbonyl group in both derivatives are prone to the formation of hydrogen bonds with water molecules. Unexpectedly, the nitrogen atom of the urethane linkage, despite its evident negative charge, was not prone to participate in hydrogen bonding with water molecules. From one side, it can probably be affected by geometric reasons, i.e., steric hindrance or stoichiometric imbalance in the number of donor and acceptor groups taken for the calculations. From another side, it can be explained that carbonyl oxygen atoms, in spite of

Table 2. Partial Charges (Expressed in Electron Charge Unit) of Nonhydrogen Atoms for Ester, BE, and Urethane, and PC Derivatives in a Vacuum Calculated Using the Merz–Singh–Kollman Scheme

Ester derivative						Urethane derivative					
No.	Atom	Charge	No.	Atom	Charge	No.	Atom	Charge	No.	Atom	Charge
1	C	-0.139	24	C	-0.122	1	C	-0.11	24	C	-0.066
2	O	-0.272	25	O	-0.473	2	O	-0.281	25	C	-0.207
3	C	0.045	26	C	-0.299	3	C	-0.019	26	O	-0.452
4	C	-0.085	27	C	0.555	4	C	0.103	27	C	-0.118
5	C	0.337	28	C	-0.179	5	C	0.161	28	C	0.44
6	O	-0.313	29	O	-0.479	6	O	-0.319	29	C	-0.14
7	O	-0.261	30	C	0.071	7	O	-0.336	30	O	-0.503
8	C	-0.199	31	C	0.397	8	C	-0.363	31	C	0.194
9	C	0.084	32	C	0.086	9	C	0.547	32	C	0.283
10	O	-0.333	33	O	-0.544	10	O	-0.536	33	C	0.031
11	C	0.18	34	O	-0.646	11	C	-0.103	34	O	-0.526
12	O	-0.397	35	O	-0.32	12	O	-0.358	35	O	-0.634
13	C	-0.117	36	C	0.7	13	C	-0.092	36	O	-0.388
14	C	0.405	37	O	-0.514	14	C	0.31	37	C	0.942
15	C	0.027	38	C	-0.16	15	C	0.04	38	N	-0.799
16	O	-0.628	39	C	-0.051	16	O	-0.598	39	O	-0.563
17	O	-0.632	40	C	-0.117	17	O	-0.625	40	C	0.539
18	C	0.536	41	C	-0.115	18	C	0.789	41	C	-0.379
19	C	0.021	42	C	-0.135	19	N	-0.617	42	C	-0.037
20	C	-0.097	43	C	-0.048	20	C	0.424	43	C	-0.227
21	C	-0.124				21	C	-0.341	44	C	-0.055
22	C	-0.152				22	C	-0.053	45	C	-0.342
23	C	-0.089				23	C	-0.269			

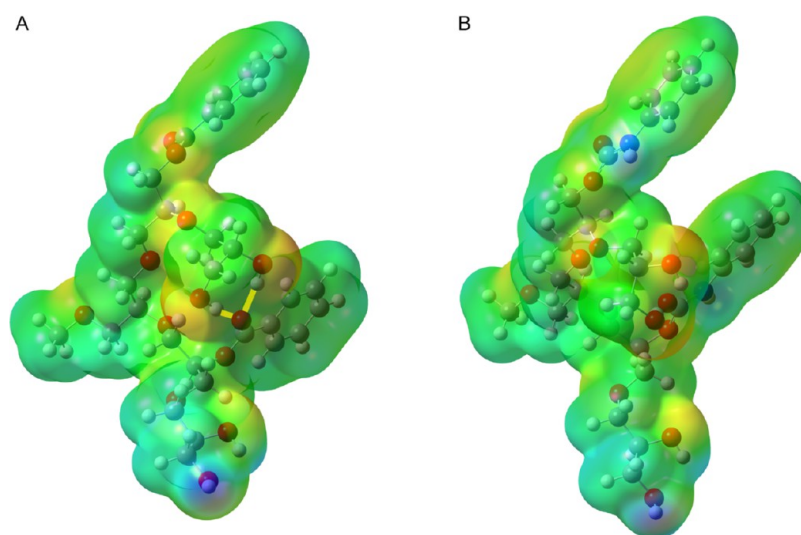


Figure 6. Electron density iso-surface for isolated fragments of hyperbranched polyglycidol hydrophobized with phenyl moieties immobilized via ester, BE (A), and urethane, PC (B) linkages, respectively. The surface was mapped with electrostatic potential; colors are in the range from -0.1 (the reddest) to 0.1 (the bluest) Hartree/e. The green color represents noncharged atoms.

lower electronegativity, in comparison to nitrogen atoms (Table 2), can form shorter, and thus stronger hydrogen bonds. Interestingly, DFT results indicate that the part of the carbon atoms in aromatic rings has higher potentials in the PC

derivative than in BE. This is a result of the presence of highly negative nitrogen atoms directly joined to the ring. Therefore, aromatic rings are more exposed outside the oligoether branch in the case of the PC derivative than in the BE derivative.

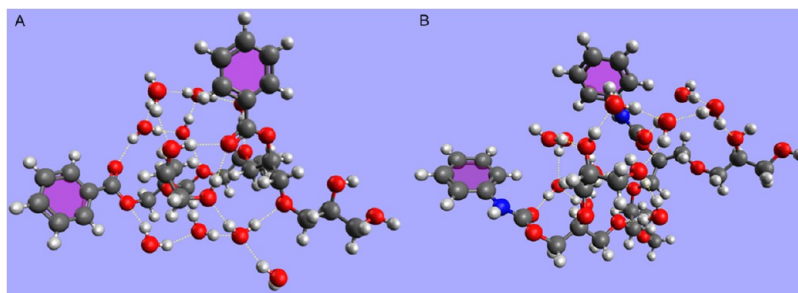


Figure 7. Optimized structures of the hydrated fragments of hyperbranched polyglycidol hydrophobized with phenyl moieties immobilized via ester, BE (A), and urethane, PC (B) linkages, respectively. Dashed lines indicate hydrogen bonds.

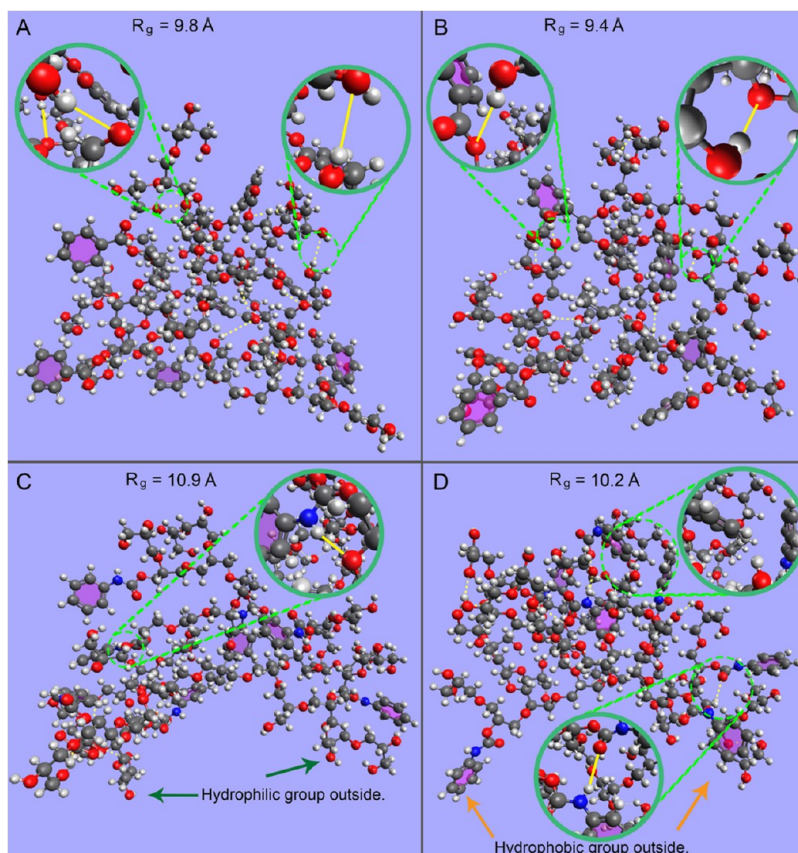


Figure 8. Representative macromolecular structures of the hydrophobized HbPGLs isolated from the simulation boxes after simulations in aqueous solution at a concentration equal to 150 mg/mL. Graphical representation without water molecules. BE50^M ester derivative at (A) 298 K and (B) 353 K. PC50^M urethane derivative at (C) 298 K and (D) 318 K. Results were obtained using TIP4P/2005 and OPLS-AA potentials. In subfigures (A–C), spherical zoom-ins show intramolecular H-bonds, and intramolecular phenyl interactions (D) are shown, however, taken from a different perspective to clearly show hydrogen bonds. The given R_g values refer to the radius of gyration of macromolecules.

Since the DFT method allows studying only a limited fragment of the investigated macromolecules, which represents only a small part of the real structure, it provides poor hydrogen bond statistics. Therefore, the molecular dynamics method MD LAMMPS was applied to characterize the time-average temperature-dependent behavior of the entire macromolecule in the aqueous solution at one of the experimentally tested concentrations (150 mg/mL). Experimentally determined cloud points for BE46 and PC46 aqueous solutions at a 50% drop in transmittance at this concentration were found to be equal to 345 and 313 K, respectively. Temperatures for MD simulations were selected based on the obtained experimental results to cover the ranges, both below and above the cloud point of each polymer. For the MD study, we used HbPGL

derivatives hydrophobized at a comparable extent as in experiments, namely BE50^M and PC50^M (where 50 represents the substitution degree of linear L₁₃ and L₁₄ constitutional repeating units of HbPGL and M stands for modeled systems) which can correspond to experimental samples BE46 and PC46.

MD LAMMPS study revealed that at room temperature for both phenyl derivatives of HbPGL (BE50^M and PC50^M) intramolecular hydrogen bonds between 1,2-diols and ether moieties were observed (Figure 8A,C). In addition, this study proved the difference in the localization of phenyl moieties in relation to polyether branches at room temperature, depending on the used covalent linkage for the immobilization of phenyl groups. Aromatic rings in PC derivative, contrarily to BE

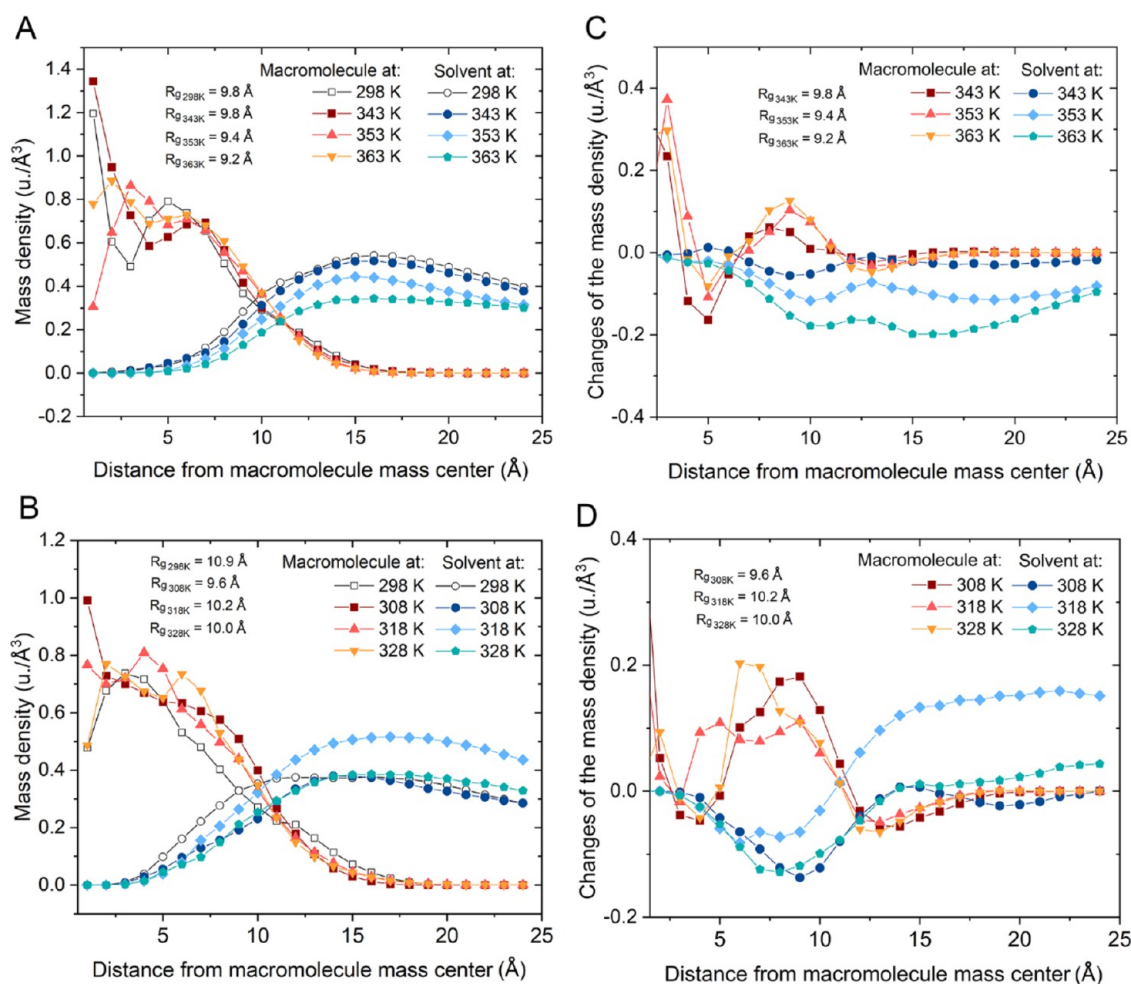


Figure 9. Time-averaged density profiles of hydrophobized HbPGLs and water as a function of distance from the polymer center of mass determined at different temperatures, below and above the experimentally determined cloud point, for (A) BE50^M and (C) PC50^M, respectively. The mass density differences with respect to the room temperature profiles for (B) BE50^M and (D) PC50^M. Results were obtained using TIP4P/2005 and OPLS-AA potentials.

derivative, are separated from polyether branches and thus are exposed outside the macromolecule. This behavior can be related to the presence of the NH group: the strongly negative nitrogen atom in the direct neighborhood of the ring results in better charge separation between carbon atoms in the ring and its higher polarity in the PC system; i.e., the difference between positive and negative partial charges located on carbon atoms is higher in PC than in BE derivative, and in addition, higher “mobility” of the rings in PC derivative related to the longer linker.

It was also shown that carbonyl oxygens in both derivatives are engaged in hydrogen bonds with 1,2-diol moieties which are hydrated with water molecules, whereas the NH group is a donor in hydrogen bonds with ether group. In the case of BE50^M, phenyl groups, due to the close contact of the aromatic ring with carbonyl, are effectively surrounded by 1,2-diol groups of terminal units swollen with water molecules. The increase of temperature above the cloud point in the case of PC50^M derivative caused phenyl moieties to become more outwardly exposed relative to the polyether branches of the macromolecule’s core as an effect of their collapse resulting from the increase of the number of formed intramolecular hydrogen bonds (Figure 8D). In the case of BE50^M phenyl rings upon heating remained surrounded by polyether

branches swollen with water (Figure 8B) even at a temperature above the cloud point, preventing intramolecular phenyl–phenyl interactions and finally making this derivative more hydrophilic. The evident exposition of phenyl groups in the outer region of the PC50^M macromolecule in relation to polyether branches of the macromolecule core makes the phenylurethane derivative of HbPGL more hydrophobic compared to the BE50^M derivative, which is consistent with Raman spectroscopy and turbidimetry data.

Monitoring the changes of the mass density of water and BE50^M and PC50^M macromolecules, respectively, both below and above the cloud points in respect to room temperature (298 K, Figure 9C,D) allowed us for easy observation of the hydration state of the macromolecule along with the changes of its radius of gyration, R_g . Generally, R_g of individual BE50^M and PC50^M macromolecules in the aqueous solution decreased with an increase of temperature. In the case of the BE50^M derivative, upon the increase of temperature to 353 K, i.e., above the cloud point, the gradual collapse of the macromolecules, i.e., the reduction of the radius of gyration, was observed. Water molecules located between the polymer branches were repelled from the macromolecule interior. Simultaneously, the density of water around the macromolecule also decreased. Only a slight shift of phenyl rings

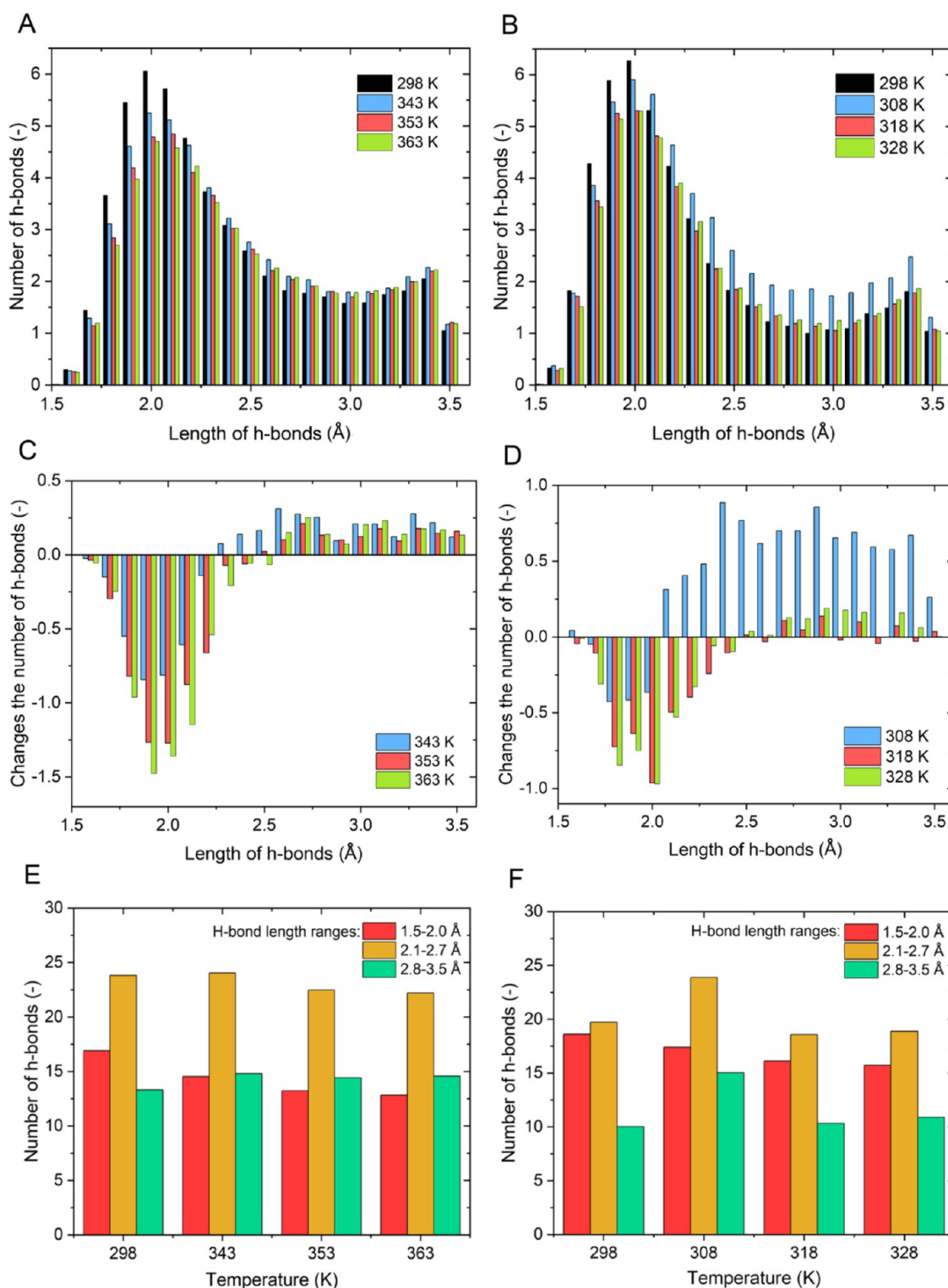


Figure 10. Time-averaged hydrogen bond histograms between hydrophobized HbPGLs and water molecules determined at different temperatures for (A) BE50^M and (B) PC50^M with the demonstration of H-bond number differences with respect to room temperature for (C) BE50^M and (D) PC50^M. Additionally, the dependences of the number of hydrogen bonds at a given temperature for specific ranges of hydrogen bond lengths are shown for (E) BE50^M and (F) PC50^M. Results were obtained using TIP4P/2005 and OPLS-AA potentials.

outside of the macromolecule was observed. However, π – π interactions between phenyl rings within a single BE50^M macromolecule are not preferably formed, because of steric hindrance generated by water-swollen and thus limited mobility of ester groups.

In the case of PC50^M, changes in the mass density of both macromolecule and water at temperature above the cloud point with respect to room temperature (298 K) revealed more complex behavior in comparison to the BE50^M derivative. After the phase transition temperature (313 K), the hydrophilic polyether segments collapsed, while the phenylurethane groups

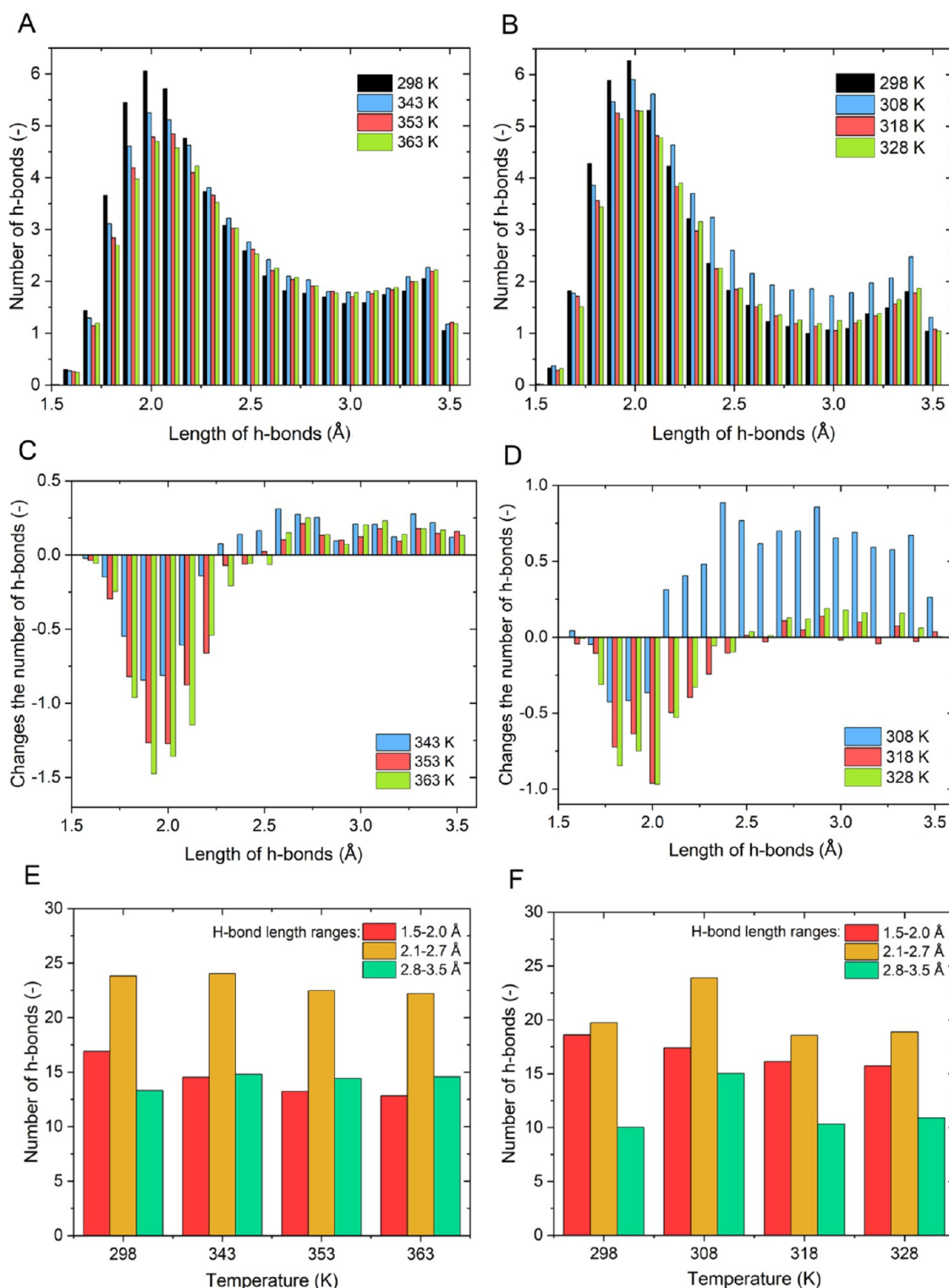


Figure 11. Time-averaged hydrogen bond histograms between hydrophilic groups of HbPGLs determined at different temperatures for (A) BE50^M and (B) PC50^M with the demonstration of H-bond number differences in relation to room temperature for (C) BE50^M and (D) PC50^M. Additionally, the dependences of the number of hydrogen bonds at a given temperature for specific ranges of hydrogen bond lengths are shown for (E) BE50^M and (F) PC50^M. Results were obtained using TIP4P/2005 and OPLS-AA potentials.

became more exposed outside the macromolecule. This is an effect of the breaking of hydrogen bonds between phenylurethane and 1,2-diol moieties in the corona of the macromolecule, and the formation of π – π interactions between aromatic rings (Figure S103B,D), which are favored with increasing temperature. The MD calculations showed that the

formation of π – π interactions in PC50^M was significantly more favorable than in the case of the BE50^M derivative (Figure S103A,C). This is probably an effect of higher partial potentials located on the carbon atoms in aromatic rings, as was shown based on DFT simulations (see Table 2). Therefore, the cloud point observed for PC50^M was evidently lower than that for

BE50^M. Relatively low T_{cp} of PC50^M (313 K) causes macromolecules at a temperature just above the cloud point to be still partially swollen with water molecules because the hydrogen bonds between water and ether oxygen are more stable than those between phenylurethane and 1,2-diol moiety in the corona. As a result, an increase in the macromolecule's radius of gyration was observed, as hydrophilic ether groups still attracted water and could be strongly hydrated. This mechanism was further confirmed using the TIP3P/Amber potential set (Figure S104). Moreover, the structure of PC50^M became more "open", as upon the interactions between aromatic moieties in the macromolecule corona, hydrophobic domains were separated by well-swollen hydrophilic parts. The formation of hydrophobic domains as the first step of the volume phase transition has been recognized recently for cross-linked copolymers of oligo(ethylene glycol methyl ether methacrylates), OEGMA by Kureha et al.⁷³ Using small-angle neutron scattering, the Authors characterized changes in nanoscale structure of POEGMA hydrogels with different composition under increasing temperature. They proved that the separation of hydrophobic parts of the network in a nanoscale is an important stage of volume phase transition, VPT, in amphiphilic materials. The sufficiently long hydrophilic segments can play the role of spacers preventing the further agglomeration of hydrophobic moieties, and as a result, the channels for water transport are formed in a gel structure. This could also be a case in the presented here study, as the branched structure can efficiently separate hydrophobic domains. Moreover, covalently bonded phenyl rings have a limited number of degrees of freedom, which prevents the formation of bigger hydrophobic domains. The situation changes when the polymer concentration increases. In such a case, the intermolecular interactions between hydrophobic moieties can occur leading to anomalous dependence of the phase separation temperature vs polymer concentration. It is also important to notice that the regularity of the branched structure also plays an important role in the VPT phenomenon (microphase separation). Yoon et al.⁷⁴ compared PMEO₂MA networks prepared by free radical polymerization (irregular networks) and by atom transfer radical polymerization (regular ones). They concluded that the irregularities in the polymer structure favored the faster water released from the polymer network because of the easier formation of channels for water transport. This finding also supports the hypothesis that the onset of phase separation in the materials studied here results in the formation of transport channels for water as hyper-branched polymers, from the topological point of view, are similar in a local (molecular) scale to networks (presence of branches). In consequence, water molecules can penetrate the hydrophilic interior of the PC50^M macromolecule when temperature 313 K is reached as the phenyl groups "open" the transport channels. Only the temperature increasing well above the phase transition, i.e., 325 K, led to the break of hydrogen bonds between water and the hydroxyl and ether groups of HbPGL, resulting in the repulsion of water from the center of the macromolecule.

To track the changes in the number of hydrogen bonds between the hydrophilic macromolecule and water, time-averaged histograms of the actual number of hydrogen bonds in the simulated systems were prepared (Figures 10, S105, and S106). When the temperature increased, the number of shorter hydrogen bonds decreases along with the slight increase of the number of longer hydrogen bonds, i.e., those above 2 Å length

macromolecule–water interactions. In the case of PC50^M (Figure 10B,D) just before the phase transition, the number of weak macromolecule–water hydrogen bonds (of the length above 2.5 Å) increased significantly. After exceeding the phase transition temperature, subsequent strong hydrogen bonds in the range 1.5–2.5 Å were broken. In addition, a decrease in the number of weak intramolecular hydrogen bonds of the length above 2.5 Å was observed (Figure 11B,D).

The collapse of the hydrophilic polyether groups in PC50^M was mainly caused by the breaking of hydrogen bonds between OH groups and water molecules at a temperature of 318 K. [Supporting Information: Figure S105]. At their expense, the number of hydrogen bonds between the hydrogens of hydroxyl groups and the oxygens of ether groups slightly increased. In the case of the BE50^M derivative (Figures 10A,C and S106), no abrupt change in the number of hydrogen bonds between a macromolecule and water molecules was observed between room temperature and the temperature above the cloud point. When the temperature increased, hydrogen bonds gradually disappeared, both intramolecular (Figure 11A,C) and intermolecular, i.e., bonds between HbPGL and water molecules (Figure 10A,C). It means that the nature of the BE50^M macromolecule changed from hydrophilic to hydrophobic smoothly. At higher temperatures, less intramolecular hydrogen bonds appeared. It should be noted that intramolecular hydrogen bonds are not preferred in these systems, and their total number decreases with increasing temperature (Figure S107).

Generally, the analysis of the change in the number of 2.5–3.5 Å-length hydrogen bonds between a hydrophobized macromolecule and water molecules upon heating revealed that PC50^M, despite the lower temperature range of the study, is a less hydrated derivative (Figure 10), in comparison to the BE50^M system, and thus its nature is more hydrophobic.

In the case of the PC50^M derivative, we noticed that in the mechanism of thermosensitive behavior the NH group plays a key role. After exceeding the cloud point, most of the strong hydrogen bonds, i.e., those of ~2 Å length, between the hydrogen of the NH group and the oxygen of ether groups were broken [Supporting Information: Figure S108], which promotes further exposition of phenylurethane rings outside the macromolecule in relation to collapsed polyether branches in the macromolecule's core. At a temperature well above the phase transition temperature (328 K) the hydrogen bonds between the NH groups and the oxygens of the ether groups reappeared. Additionally, these types of hydrogen bonds were characterized by a large range of interaction strength, i.e., hydrogen bond lengths in the range from 1.5 to 3.5 Å. These bonds were usually formed between the NH group and the oxygen atom of the ether group located in close vicinity of the carbonyl group, which further stabilizes the interactions between the phenyl rings and increases the likelihood of π – π interactions, which is consistent with Raman spectroscopy data. Intramolecular hydrogen bonding between hydrophilic polyether chains allowed the rings to be exposed and favored interactions between them.

The described factors evidenced that the PC50^M derivative is more hydrophobic in comparison to BE50^M, and explained the lower temperature of the phase transition of all phenylurethane derivatives in comparison to *h*HbPGL equipped with benzoyl esters. In the BE50^M derivative, the phenyl rings are localized outside the macromolecule, but they remain surrounded by polyether chains, which prevent them

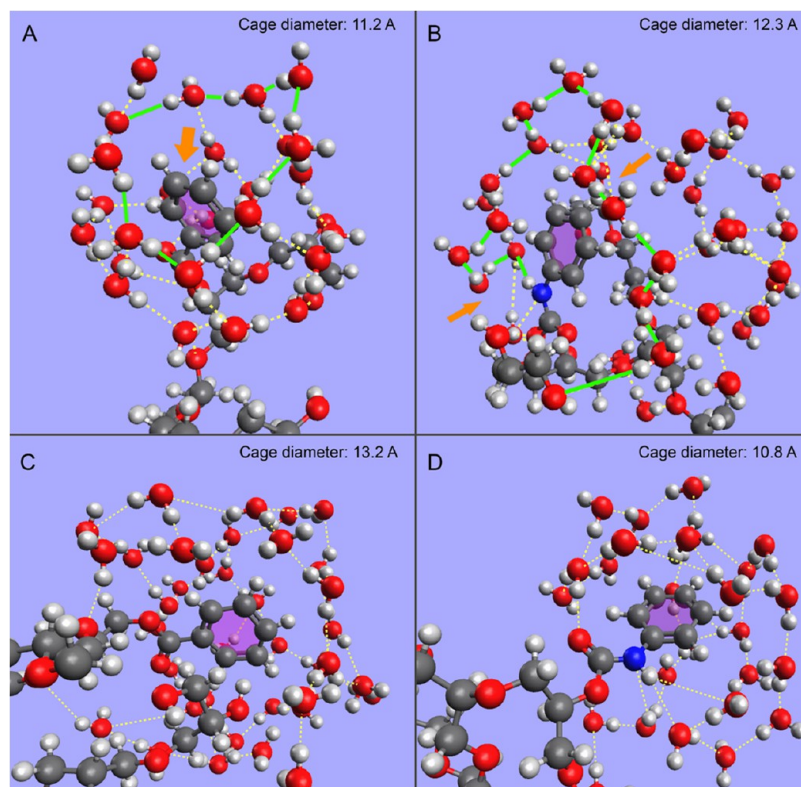


Figure 12. Cage structure of water around the phenyl ring observed at different temperatures for BE50^M: (A) 298 K and (C) 353 K and PC50^M: (B) 298 K and (D) 318 K. In (A, B) hydrogen bonds around the open part of the water cage are shown as green solid lines. The localization of the cage opening in relation to the ring edge is marked with orange arrows.

from interacting with each other. Additionally, the partial charges in carbon atoms in rings are lower in BE derivative than in PC one, and the benzoyl ester moiety is a shorter substituent than the phenylurethane group, which may affect the flexibility of these groups and constitute an additional obstacle for interactions between the rings.

As the thermosensitivity of amphiphilic polymers is an effect of the balance between hydrophilic and hydrophobic interactions, it is interesting to look at the state of phenyl rings attached to hyperbranched polyglycidol structures in the aqueous environment and its change upon heating. As water does not want to wet the hydrophobic moieties, the hydrogen bond network formed in water is strongly deformed in the neighborhood of phenyl rings. MD simulations showed that cage-like structures of water were formed around the phenyl groups resulting in a relatively high excluded volume for these groups. In the case of BE50^M, at room temperature (Figure 12A), the cage has a fairly regular and tight structure, but is open to the edge sides of the ring. Above the cloud point (Figure 12C) the cage expanded, and its structure became more open and less compact. Irregularly located “holes” were observed in the cage. For PC50^M at room temperature (Figure 12B) the cage was less regular and compact, with a partially open structure on the face side of the aromatic ring. The structure of the cage is disturbed by interactions between the 1,2-diol moieties and the ring. This caused the cage shape similar to a “donut-like” structure open to the face sides of the aromatic ring. For the PC50^M system, just above the cloud point (at 318 K, Figure 12D) the collapse of the ether chains and the “hiding” of the 1,2-diol groups inside the macromolecule exposed the ring allowed the creation of a cage with a

more compact and closed structure. NH group was still involved in stabilizing the cage. The cage structure of the water molecules stabilized the system and enabled the localization of the rings outside the macromolecule. As a result, the gyration radius of the urethane-modified HbPGL macromolecule increased just above the cloud point. This stabilization of the outside location of aromatic rings by water cages importantly influences the possibility of the formation of intermolecular interactions between macromolecules in PC systems.

In the BE50^M system, the size of water cages increased after the phase separation, while for the PC50^M derivative, cage size decreased. However, a direct comparison of this effect could be misleading as the cloud points determined for both derivatives are significantly different, thus the structures above the cloud point were studied at different states from the point of view of water–water interactions. The different behavior of water cages around the phenyl groups in HbPGL derivatives under the phase transition may result from the different localization of the aromatic rings in the macromolecule. In BE50^M, phenyl rings above the cloud point are partially surrounded by polyether chains, which stabilize the cage structure by the hydrogen bonds formed between water molecules being included in the cage structure. In the case of urethane derivative PC50^M, the rings are more exposed outside the macromolecule. Water molecules formed the sphere leading to the microphase separation at the local scale. This is unfavorable from an energetic point of view and should promote the aggregation of phenyl rings.

In the subsequent phase of computational studies, our focus shifted to larger-scale investigations aimed at elucidating the interactions between various macromolecules present in

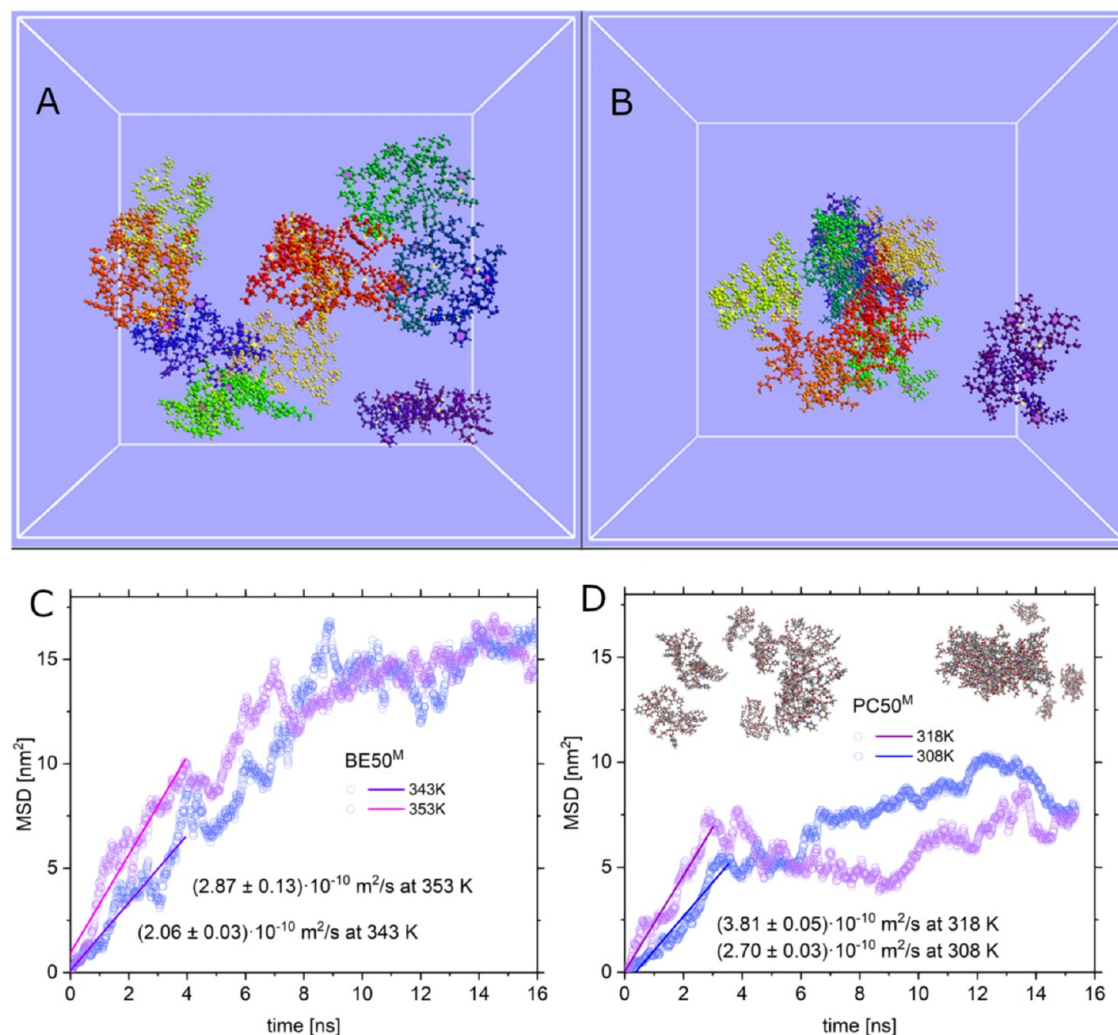


Figure 13. (A) First and (B) last time frame of BE50^M simulation at 353 K (coloring molecules atoms by index); water was not shown for clarity. MSD vs time for (C) BE50^M and (D) PC50^M at two selected temperatures. Lines represent fitting with Einstein–Smoluchowski relation. Insets in (D) show the first and last time frame at 353 K for PC50^M.

aqueous solutions. For this purpose, Yasara software, which is one of the fastest MD simulation tools, was used. The same concentrations were selected as in previous simulations. Each system contained ten BE50 M or PC50 M macromolecules and an appropriate number of water molecules. The proposed approach permitted the investigation of the aggregation process of hydrophobized HbPGL macromolecules in an aqueous environment, observed at phase separation. The trajectory obtained from the molecular dynamics simulation is presented in Figure 13. The initial phase of the mean-square displacement (MSD) curve corresponds to the short time scale and unrestricted movement of individual molecules. The self-diffusion coefficients were calculated based on the Einstein–Smoluchowski relation, $\text{MSD} = 6Dt$, for times up to 4 ns (after which aggregation commenced). The diffusion coefficients were found to be higher at elevated temperatures. The onset of aggregation is evident in the gradual decline in the MSD slope.

Generally, significantly more intermolecular hydrogen bonds were observed for the PC50^M derivative. Even below the phase transition temperature, macromolecules tend to aggregate. Among intermolecular interactions, hydrogen bonds between 1,2-diols and ether moieties dominated (Figure 14A). Above

the phase transition temperature, at the expense of the less preferred hydrogen bonds between 1,2-diols and water molecules, a large number of intermolecular hydrogen bonds between the NH groups and 1,2-diols of macromolecules (Figure 14B) appeared. These bonds served as stabilizers of connections between macromolecules above the cloud point. At temperatures below the cloud point of PC50^M, however, intramolecular hydrogen bonding between NH and 1,2-diol groups dominated.

What is more, numerous π – π interactions were also observed in PC50^M systems above the cloud point. The phenyl rings evidently tended to form clusters. Face-to-edge interactions between aromatic rings were the most frequently observed, and their average strength was calculated for the five strongest interactions found in the simulated systems at the last stage of the simulation. The average distance between the intermolecular rings was 3.6 ± 0.2 Å, and the average angle between the ring planes was $94 \pm 13^\circ$. For intramolecular interactions, the average distance between the rings was 4.1 ± 0.5 Å, whereas the average angle between the ring planes was $89 \pm 2^\circ$. In rare situations, a face-to-face ring orientation was observed for PC50^M (Figure 14C). At temperatures below the phase transition temperature, such interactions were barely

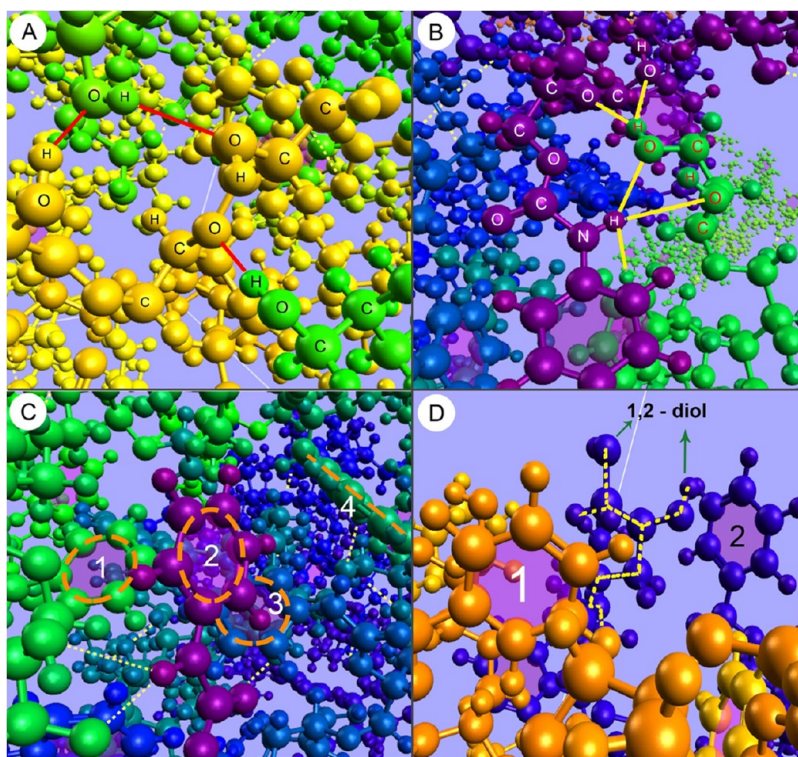


Figure 14. Selected fragments of simulated systems in the last simulation step (coloring atoms by index to better show the atom's affiliation to a given macromolecule). Water molecules are not shown for clarity. (A) Intermolecular hydrogen bonds involving hydroxyl and ether groups in PCSO^M at a temperature of 308 K (below the cloud point). (B) Intermolecular hydrogen bonds involving the phenylurethane moiety in PCSO^M at 318 K (above the cloud point). (C) Cluster of interacting phenyl rings in PCSO^M at 318 K. (D) An oligoglycidyl chain terminated with 1,2-diol blocking interactions between phenyl rings in BE50^M at a temperature of 353 K (above the cloud point).

seen due to the “straightened” polyether chains acting as a barrier to contact between phenylurethane groups. Such a weakening of π – π interactions was typical of BE50 regardless of the system temperature (Figure 14D).

The detailed analysis of computational data and Raman spectroscopy results is helpful in understanding the dominant behavior of the T_{cp} increase with the polymer concentration of the aqueous solutions of hydrophobized hyperbranched polyglycidols. Such anomalous behavior of macromolecules in water is an effect of the equilibrium between hydrophobic interactions of hydrophobic groups and hydrogen bonds between polyglycidyl chains and water molecules. Phase separation resulting directly from the presence of hydrophobic groups in macromolecules is hindered by the highly water-swollen polyether chains, which effectively screen phenyl moieties. To attain the phase separation of hydrophobized hyperbranched polyglycidols, it is necessary to increase temperature to reduce the number of hydrogen bonds between polyglycidyl chains and water molecules. The dehydration of macromolecules leads to higher probability of π – π interactions between phenyl moieties, whose strength, in addition, increases with the increase of temperature resulting in larger hydrophobic domains (aggregates). Then the hydrophobicity of macromolecules leads to the reduction in the solubility of hydrophobized HbPGLs in water and finally the polymer separation from the aqueous medium.

It seems that a key structural parameter to endow the amphiphilic polymer with the dominant behavior of the T_{cp} increase with the increase of concentration is the assurance of the homogeneous distribution of hydrophobic moieties separated by the highly hydrophilic environment of highly

water-swollen hyperbranched flexible chains. Thanks to the flexible nature of polyether backbones the efficient reorganization of macromolecules segments can be easily attained.

CONCLUSIONS

We presented the phase behavior of the internally hydrophobized hyperbranched polyglycidol with phenyl moieties incorporated via ester or urethane linkages. The substitution of monohydroxyls in linear constitutional repeating units of HbPGL with phenylurethane groups in the range from 32 to 55 mol %, and benzoyl ester groups in the range from 42 to 56 mol % endowed it with thermosensitive behavior in the aqueous medium. Unexpectedly, phenylurethane derivatives of HbPGL turned out to be more hydrophobic than their benzoyl ester counterparts, as their cloud points, T_{cp} were considerably lower. In addition, all HbPGLs with an aryl-enriched core display a critical point at very low concentration, and thus, an increase in T_{cp} with concentration was observed in the broad concentration range.

The computational simulations supported with Raman spectroscopy investigations helped to explain, on one hand, the difference in the thermosensitive behavior of HbPGL hydrophobized with phenyl moieties immobilized via ester or urethane linkages, respectively, and on the other hand, the dominant dependence of the T_{cp} increase with the increase of polymer content in the aqueous solutions.

The more hydrophobic character of the PC derivatives resulted from the fact that the phenylurethane groups protruded more outside the macromolecule compared with the benzoyl rings in the BE compounds, in which the aromatic rings remained surrounded by hydrated polyether branches. In

addition, we have noticed that the BE derivative is able to form a more stable hydration layer at elevated temperatures in comparison to PC samples, further evidencing its enhanced hydrophilicity.

Initially, the number of phenyl groups, their localization in the outer region of the macromolecule, and their ability to form π – π interactions are responsible for the phase separation of aqueous solutions of phenyl-enriched HbPGLs. In the case of the BE derivative, the phenyl rings are better “hidden” in the “interior of the macromolecule” and their interactions are strongly limited, while in the PC derivative, the phenyl groups are better “exposed” at the outside of the macromolecule and thus can more easily participate in π – π interactions.

The dominant behavior of the increase of T_{cp} on the increase of the polymer concentration in the thermosensitive properties of the aqueous solutions of phenyl-enriched HbPGLs can be explained by the balance between the hydrogen bonding between the polyether/glycidol parts with water molecules and hydrophobic π – π interactions between phenyl moieties homogeneously distributed within the macromolecule. The increase of the polymer concentration in the aqueous solution caused the enhancement of polymer solubilization at room temperature, as a result, hydrophobic phenyl groups are effectively hidden within water-swollen polyether branches forming hydrogen bonds with water molecules. Heating the aqueous solutions of hydrophobized HbPGL enhanced π – π interactions, and additionally led to the destruction of hydrogen bonds of polyether branches with water molecules, increasing the hydrophobicity of the macromolecule, and consequently achieving a phase separation.

This study shows how through such a subtle structural change as the covalent bond used for the immobilization of the hydrophobic group, the temperature of the phase separation can be significantly altered. Due to this fact, detailed investigation of the thermosensitive behavior of each system is necessary. This work may be promising in the development of polymers displaying very low critical points, and thus dominant behavior of the increase of T_{cp} on the increase of the polymer concentration in aqueous media.

■ ASSOCIATED CONTENT

SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.macromol.4c01709>.

^1H and ^{13}C NMR spectra of hyperbranched polyglycidol and hydrophobized hyperbranched polyglycidols; ^1H DOSY NMR spectra of hydrophobized hyperbranched polyglycidols; turbidimetry and DLS results of the thermosensitive behavior of the aqueous solutions of hydrophobized hyperbranched polyglycidols, and additional MD LAMMPS simulation data with histograms of time-averaged hydrogen bonds (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Monika Gosecka – Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, 90-363 Lodz, Poland; orcid.org/0000-0002-4358-0987; Email: mdybko@cbmm.lodz.pl

Authors

Daria Jaworska-Krych – Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, 90-363 Lodz, Poland

Paulina Maczugowska – Department of Molecular Physics, Faculty of Chemistry, Lodz University of Technology, 90-924 Lodz, Poland

Krzysztof Halagan – Department of Molecular Physics, Faculty of Chemistry, Lodz University of Technology, 90-924 Lodz, Poland; orcid.org/0000-0001-6412-2910

Kosma Szutkowski – NanoBioMedical Centre, Adam Mickiewicz University in Poznan, PL61614 Poznan, Poland; orcid.org/0000-0002-6091-9049

Mateusz Gosecki – Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, 90-363 Lodz, Poland; orcid.org/0000-0002-4901-4687

Małgorzata Urbaniak – Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, 90-363 Lodz, Poland

Marcin Kozanecki – Department of Molecular Physics, Faculty of Chemistry, Lodz University of Technology, 90-924 Lodz, Poland; orcid.org/0000-0001-7400-6315

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.macromol.4c01709>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the National Science Centre, Poland (project no. UMO-2018/30/E/ST5/00576). This article was completed while D.J.-K. was a Doctoral Candidate in the Interdisciplinary Doctoral School at the Lodz University of Technology, Poland. The optical microscopy images have been taken in the frame of cooperation with POIR.04.04.00-00-3ED8/17 project supported by the Foundation for Polish Science under the European Regional Development Fund, Poland.

■ REFERENCES

- (1) Abuwatfa, W. H.; Awad, N. S.; Pitt, W. G.; Hussein, G. A. Thermosensitive Polymers and Thermo-Responsive Liposomal Drug Delivery Systems. *Polymers* **2022**, *14* (5), No. 925, DOI: [10.3390/polym14050925](https://doi.org/10.3390/polym14050925).
- (2) Bordat, A.; Boissenot, T.; Nicolas, J.; Tsapis, N. Thermoresponsive polymer nanocarriers for biomedical applications. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2019**, *138*, 167–192.
- (3) Nagase, K.; Okano, T. Thermoresponsive-polymer-based materials for temperature-modulated bioanalysis and bioseparations. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5* (11), 2198.
- (4) Castillo-Henriquez, L.; Castro-Alpizar, J.; Lopretti-Correa, M.; Vega-Baudrit, J. Exploration of Bioengineered Scaffolds Composed of Thermo-Responsive Polymers for Drug Delivery in Wound Healing. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (3), No. 1408, DOI: [10.3390/ijms22031408](https://doi.org/10.3390/ijms22031408).
- (5) Haba, Y.; Harada, A.; Takagishi, T.; Kono, K. Rendering poly(amidoamine) or poly(propyleneimine) dendrimers temperature sensitive. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (40), 12760–12761.
- (6) Bloksma, M. M.; Paulus, R. M.; van Kuringen, H. P.; van der Woerd, F.; Lambermont-Thijs, H. M.; Schubert, U. S.; Hoogenboom, R. Thermoresponsive poly(2-oxazine)s. *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33* (1), 92–96.
- (7) Li, J.; Mizutani, S.; Sato, S.; Narumi, A.; Haba, O.; Kawaguchi, S.; Kakuchi, T.; Shen, X. D. Thermoresponsive property of well-defined poly(-methyl-propylacrylamide) and its copolymer architectures prepared by hydrosilylation-promoted group transfer

- polymerization. *Polymer* **2020**, 202, No. 122678, DOI: 10.1016/j.polymer.2020.122678.
- (8) Cortez-Lemus, N. A.; Licea-Claverie, A. Poly(-vinylcaprolactam), a comprehensive review on a thermoresponsive polymer becoming popular. *Prog. Polym. Sci.* **2016**, 53, 1–51.
- (9) Lutz, J. F.; Weichenhan, K.; Akdemir, Ö.; Hoth, A. About the phase transitions in aqueous solutions of thermoresponsive copolymers and hydrogels based on 2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate and oligo(ethylene glycol) methacrylate. *Macromolecules* **2007**, 40 (7), 2503–2508.
- (10) Christova, D.; Ivanova, S.; Ivanova, G. Water-soluble temperature-responsive poly(vinyl alcohol-vinyl acetal)s. *Polym. Bull.* **2003**, 50 (5–6), 367–372.
- (11) Sugihara, S.; Kanaoka, S.; Aoshima, S. Thermosensitive random copolymers of hydrophilic and hydrophobic monomers obtained by living cationic copolymerization. *Macromolecules* **2004**, 37 (5), 1711–1719.
- (12) Meeussen, F.; Nies, E.; Berghmans, H.; Verbrugghe, S.; Goethals, E.; Du Prez, F. Phase behaviour of poly(-vinyl caprolactam) in water. *Polymer* **2000**, 41 (24), 8597–8602.
- (13) Maeda, Y.; Tsubota, M.; Ikeda, I. Temperature-responsive graft copolymers with poly(propylene glycol) side chains. *Macromol. Rapid Commun.* **2003**, 24 (3), 242–245.
- (14) Christova, D.; Velichkova, R.; Loos, W.; Goethals, E. J.; Du Prez, F. New thermo-responsive polymer materials based on poly(2-ethyl-2-oxazoline) segments. *Polymer* **2003**, 44 (8), 2255–2261.
- (15) Kjellander, R.; Florin, E. Water-Structure and Changes in Thermal-Stability of the System Poly(Ethylene Oxide)-Water. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **1981**, 77, 2053–2077.
- (16) Dimitrov, P.; Rangelov, S.; Dworak, A.; Tsvetanov, C. B. Synthesis and associating properties of poly(ethoxyethyl glycidyl ether)/poly(propylene oxide) triblock copolymers. *Macromolecules* **2004**, 37 (3), 1000–1008.
- (17) Dimitrov, P.; Rangelov, S.; Dworak, A.; Haraguchi, N.; Hirao, A.; Tsvetanov, C. B. Triblock and radial star-block copolymers comprised of poly(ethoxyethyl glycidyl ether), polyglycidol, poly(propylene oxide) and polystyrene obtained by anionic polymerization initiated by Cs initiators. *Macromol. Symp.* **2004**, 215, 127–139.
- (18) Xue, X.; Thiagarajan, L.; Braim, S.; Saunders, B. R.; Shakesheff, K. M.; Alexander, C. Upper critical solution temperature thermoresponsive polymer brushes and a mechanism for controlled cell attachment. *J. Mater. Chem. B* **2017**, 5 (25), 4926–4933.
- (19) Ji, Y.; Zhu, M.; Gong, Y.; Tang, H.; Li, J.; Cao, Y. Thermoresponsive Polymers with Lower Critical Solution Temperature- or Upper Critical Solution Temperature-Type Phase Behaviour Do Not Induce Toxicity to Human Endothelial Cells. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2017**, 120 (1), 79–85.
- (20) Asadujjaman, A.; Bertin, A.; Schonhals, A. Dielectric analysis of the upper critical solution temperature behaviour of a poly-(acrylamide-co-acrylonitrile) copolymer system in water. *Soft Matter* **2017**, 13 (12), 2384–2393.
- (21) Niskanen, J.; Tenhu, H. How to manipulate the upper critical solution temperature (UCST)? *Polym. Chem.* **2017**, 8 (1), 220–232.
- (22) Zhang, H.; Guo, S. W.; Fan, W. Z.; Zhao, Y. Ultrasensitive pH-Induced Water Solubility Switch Using UCST Polymers. *Macromolecules* **2016**, 49 (4), 1424–1433.
- (23) Gao, X.; Cao, Y.; Song, X.; Zhang, Z.; Xiao, C.; He, C.; Chen, X. pH- and thermo-responsive poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid derivative) copolymers and hydrogels with LCST dependent on pH and alkyl side groups. *J. Mater. Chem. B* **2013**, 1 (41), 5578–5587.
- (24) Halperin, A.; Kroger, M.; Winnik, F. M. Poly(N-isopropylacrylamide) Phase Diagrams: Fifty Years of Research. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, 54 (51), 15342–15367.
- (25) Ansari, M. J.; Rajendran, R. R.; Mohanto, S.; Agarwal, U.; Panda, K.; Dhotre, K.; Manne, R.; Deepak, A.; Zafar, A.; Yasir, M.; Pramanik, S. Poly(N-isopropylacrylamide)-Based Hydrogels for Biomedical Applications: A Review of the State-of-the-Art. *Gels* **2022**, 8 (7), No. 454, DOI: 10.3390/gels8070454.
- (26) Xu, X.; Liu, Y.; Fu, W.; Yao, M.; Ding, Z.; Xuan, J.; Li, D.; Wang, S.; Xia, Y.; Cao, M. Poly(N-isopropylacrylamide)-Based Thermoresponsive Composite Hydrogels for Biomedical Applications. *Polymers* **2020**, 12 (3), No. 580, DOI: 10.3390/polym12030580.
- (27) Ashraf, S.; Park, H. K.; Park, H.; Lee, S. H. Snapshot of Phase Transition in Thermoresponsive Hydrogel PNIPAM: Role in Drug Delivery and Tissue Engineering. *Macromol. Res.* **2016**, 24 (4), 297–304.
- (28) Guan, Y.; Zhang, Y. J. PNIPAM microgels for biomedical applications: from dispersed particles to 3D assemblies. *Soft Matter* **2011**, 7 (14), 6375–6384.
- (29) Crespy, D.; Zuber, S.; Turshatov, A.; Landfester, K.; Popa, A. M. A straightforward synthesis of fluorescent and temperature-responsive nanogels. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2012**, 50 (6), 1043–1048.
- (30) Lee, B. H.; Vernon, B. Copolymers of isopropylacrylamide, HEMA-lactate and acrylic acid with time-dependent lower critical solution temperature as a bioresorbable carrier. *Polym. Int.* **2005**, 54 (2), 418–422.
- (31) Fischer, T.; Demco, D. E.; Fehete, R.; Möller, M.; Singh, S. Poly(vinylamine-isopropylacrylamide) linear polymer and hydrogels with tuned thermoresponsivity. *Soft Matter* **2020**, 16 (28), 6549–6562.
- (32) Cooperstein, M. A.; Canavan, H. E. Assessment of cytotoxicity of (-isopropyl acrylamide) and Poly(-isopropyl acrylamide)-coated surfaces. *Biointerphases* **2013**, 8, No. 19, DOI: 10.1186/1559-4106-8-19.
- (33) Liu, X. Y.; Mu, X. R.; Liu, Y.; Liu, H. J.; Chen, Y.; Cheng, F.; Jiang, S. C. Hyperbranched Polymers with Thermoresponsive Property Highly Sensitive to Ions. *Langmuir* **2012**, 28 (10), 4867–4876.
- (34) Sun, X. Y.; Zhou, Y. F.; Yan, D. Y. Rendering Hyperbranched Polyglycerol Adjustably Thermoresponsive by Adamantyl Modification and Host/Guest Interaction. *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, 211 (17), 1940–1946.
- (35) Han, J. O.; Lee, H. J.; Jeong, B. Thermosensitive core-rigid micelles of monomethoxy poly(ethylene glycol)-deoxy cholic acid. *Biomater Res.* **2022**, 26 (1), No. s40824-022-00263-9, DOI: 10.1186/s40824-022-00263-9.
- (36) Shen, Y.; Kuang, M.; Shen, Z.; Nieberle, J.; Duan, H. W.; Frey, H. Gold nanoparticles coated with a thermosensitive hyperbranched polyelectrolyte: Towards smart temperature and pH nanosensors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47 (12), 2227–2230.
- (37) Kojima, C.; Yoshimura, K.; Harada, A.; Sakanishi, Y.; Kono, K. Synthesis and Characterization of Hyperbranched Poly(glycidol) Modified with pH- and Temperature-Sensitive Groups. *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20 (5), 1054–1057.
- (38) Gosecka, M.; Jaworska-Krych, D.; Gosecki, M.; Wielgus, E.; Marcinkowska, M.; Janaszewska, A.; Klajnert-Maculewicz, B. Self-Healable, Injectable Hydrogel with Enhanced Clotrimazole Solubilization as a Potential Therapeutic Platform for Gynecology. *Biomacromolecules* **2022**, 23 (10), 4203–4219.
- (39) Gosecki, M.; Ziemczonek, P.; Gosecka, M.; Urbaniak, M.; Wielgus, E.; Marcinkowska, M.; Janaszewska, A.; Klajnert-Maculewicz, B. Cross-linkable star-hyperbranched unimolecular micelles for the enhancement of the anticancer activity of clotrimazole. *J. Mater. Chem. B* **2023**, 11 (24), 5552–5564.
- (40) Jamróz-Piegi, M.; Utrata-Wesolek, A.; Trzebiecka, B.; Dworak, A. Hydrophobic modification of high molar mass polyglycidol to thermosensitive polymers. *Eur. Polym. J.* **2006**, 42 (10), 2497–2506.
- (41) Gosecki, M.; Ziemczonek, P.; Maczugowska, P.; Czaderna-Lekka, A.; Kozanecki, M.; Gosecka, M. The influence of 2-acrylamidophenylboronic acid on the phase behaviour of its copolymers with-isopropylacrylamide in aqueous solution. *Polym. Chem.* **2021**, 12 (22), 3264–3275.
- (42) Osváth, Z.; Tóth, T.; Iván, B. Synthesis, characterization, LCST-type behavior and unprecedented heating-cooling hysteresis of

- poly(-isopropylacrylamide-3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate) copolymers. *Polymer* **2017**, *108*, 395–399.
- (43) Yeshchenko, O. A.; Naumenko, A. P.; Kutsevol, N. V.; Harahuts, I. I. Laser-driven structural transformations in dextran-PNIPAM copolymer/Au nanoparticles hybrid nanosystem: the role of plasmon heating and attractive optical forces. *RSC Adv.* **2018**, *8* (67), 38400–38409.
- (44) Narayanan, A.; Menefee, J. R.; Liu, Q. H.; Dhinojwala, A.; Joy, A. Lower Critical Solution Temperature-Driven Self-Coacervation of Nonionic Polyester Underwater Adhesives. *ACS Nano* **2020**, *14* (7), 8359–8367.
- (45) Marsili, L.; Dal Bo, M.; Eisele, G.; Donati, I.; Berti, F.; Toffoli, G. Characterization of Thermoresponsive Poly-N-Vinylcaprolactam Polymers for Biological Applications. *Polymers* **2021**, *13* (16), No. 2639, DOI: 10.3390/polym13162639.
- (46) Baddam, V.; Tenhu, H. Thermoresponsive polycations. *Polym. Chem.* **2023**, *14* (32), 3647–3678.
- (47) Weber, C.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S. Temperature responsive bio-compatible polymers based on poly(ethylene oxide) and poly(2-oxazoline)s. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37* (5), 686–714.
- (48) Park, M. H.; Park, J.; Lee, H. J.; Jeong, B. Alpha-beta transition induced by C18-conjugation of polyalanine and its implication in aqueous solution behavior of poly(ethylene glycol)-polyalanine block copolymers. *Biomater. Res.* **2020**, *24* (1), No. 23, DOI: 10.1186/s40824-020-00200-8.
- (49) Fang, W. C.; Zhang, R.; Yao, Y. F.; Liu, H. J.; Chen, Y. Specific thermoresponsive behaviours exhibited by optically active and inactive phenylalanine modified hyperbranched polyethylenimines in water. *Chin. J. Polym. Sci.* **2017**, *35* (8), 1035–1042.
- (50) Zhang, Y.; Wang, R. C.; Liu, H. J.; Chen, Y. Hyperbranched polyglycerol derivatives exhibiting normal or abnormal thermoresponsive behaviours in water: facile preparation and investigation by turbidimetry and fluorescence techniques. *Soft Matter* **2017**, *13* (44), 8136–8143.
- (51) Schömer, M.; Seiwert, J.; Frey, H. Hyperbranched Poly(propylene oxide): A Multifunctional Backbone-Thermoresponsive Polyether Polyol Copolymer. *ACS Macro Lett.* **2012**, *1* (7), 888–891.
- (52) Türk, H.; Shukla, A.; Rodrigues, P. C. A.; Rehage, H.; Haag, R. Water-soluble dendritic core-shell-type architectures based on polyglycerol for solubilization of hydrophobic drugs. *Chem. - Eur. J.* **2007**, *13* (15), 4187–4196.
- (53) Gosecka, M.; Gosecki, M.; Ziemczonek, P.; Urbaniak, M.; Wielgus, E.; Marcinkowska, M.; Janaszewska, A.; Klajnert-Maculewicz, B. Selective Anticervical Cancer Injectable and Self-Healable Hydrogel Platforms Constructed of Drug-Loaded Cross-Linkable Unimolecular Micelles in a Single and Combination Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2024**, *16* (12), 14605–14625.
- (54) Gosecki, M.; Zgardzinska, B.; Gosecka, M. Temperature-Induced Changes in the Nanostructure of Hydrogels Based on Reversibly Cross-Linked Hyperbranched Polyglycidol with B(OH) Ions. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120* (32), 18323–18332.
- (55) Haryanto; Singh, D.; Huh, P. H.; Kim, S. C. Hyperbranched poly(glycidol)/poly(ethylene oxide) crosslinked hydrogel for tissue engineering scaffold using e-beams. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2016**, *104* (1), 48–56.
- (56) Wu, C. Z.; Strehmel, C.; Achazi, K.; Chiapisi, L.; Dervede, J.; Lensen, M. C.; Gradzielski, M.; Ansorge-Schumacher, M. B.; Haag, R. Enzymatically Cross-Linked Hyperbranched Polyglycerol Hydrogels as Scaffolds for Living Cells. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (11), 3881–3890.
- (57) Gosecki, M.; Kazmierski, S.; Gosecka, M. Diffusion-Controlled Biomineralization Conducted In Situ in Hydrogels Based on Reversibly Cross-Linked Hyperbranched Polyglycidol. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (10), 3418–3431.
- (58) Schömer, M.; Schüll, C.; Frey, H. Hyperbranched aliphatic polyether polyols. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2013**, *51* (5), 995–1019.
- (59) Wilms, D.; Stiriba, S. E.; Frey, H. Hyperbranched Polyglycerols: From the Controlled Synthesis of Biocompatible Polyether Polyols to Multipurpose Applications. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43* (1), 129–141.
- (60) Jaworska-Krych, D.; Gosecka, M.; Gosecki, M.; Urbaniak, M.; Dzitko, K.; Ciesielska, A.; Wielgus, E.; Kadlubowski, S.; Kozanecki, M. Enhanced Solubility and Bioavailability of Clotrimazole in Aqueous Solutions with Hydrophobized Hyperbranched Polyglycidol for Improved Antifungal Activity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2024**, *16* (15), 18434–18448.
- (61) Singh, U. C.; Kollman, P. A. An Approach to Computing Electrostatic Charges for Molecules. *J. Comput. Chem.* **1984**, *5* (2), 129–145.
- (62) Besler, B. H.; Merz, K. M.; Kollman, P. A. Atomic Charges Derived from Semiempirical Methods. *J. Comput. Chem.* **1990**, *11* (4), 431–439.
- (63) Hockney, R. W.; James, W. Eastwood Computer Simulation Using Particles. In *Particle-Particle-Particle-Mesh (P3M) Algorithms*; CRC Press, 1988; pp 267–304 9780852743928.
- (64) Sadus, R. J. Particle-Particle and Particle-Mesh (PPPM) Methods. In *Molecular Simulation of Fluids*; Elsevier Science: Amsterdam, 1999; pp 162–169.
- (65) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79* (2), 926–935.
- (66) Maeda, Y.; Kubota, T.; Yamauchi, H.; et al. Hydration changes of poly(2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate) during thermosensitive phase separation in water. *Langmuir* **2007**, *23* (22), 11259–11265.
- (67) Maeda, Y.; Yamauchi, H.; Kubota, T. Confocal Micro-Raman and Infrared Spectroscopic Study on the Phase Separation of Aqueous Poly(2-(2-methoxyethoxy)ethyl (meth)acrylate) Solutions. *Langmuir* **2009**, *25* (1), 479–482.
- (68) Olejniczak, M. N.; Kozanecki, M.; Saramak, J.; Matusiak, M.; Kadlubowski, S.; Matyjaszewski, K. Raman spectroscopy study on influence of network architecture on hydration of poly(2-(2-methoxyethoxy) ethyl methacrylate) hydrogels. *J. Raman Spectrosc.* **2017**, *48* (3), 465–473.
- (69) Miyazawa, T.; Fukushima, K.; Ideguchi, Y. Molecular Vibrations and Structure of High Polymers. III. Polarized Infrared Spectra, Normal Vibrations, and Helical Conformation of Polyethylene Glycol. *J. Chem. Phys.* **1962**, *37*, 2764–2776.
- (70) Koenig, J. L.; Angood, A. C.; Semen, J.; Lando, J. B. Laser-excited Raman studies of the conformational transition of syndiotactic polymethacrylic acid in water Cite this: 1969, 91, 26, 7250–7254. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 7250–7254.
- (71) Lin-Vien, D.; Colthup, N. B.; Fateley, W. G.; Grasselli, J. G. *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*; Elsevier, 1991.
- (72) Jain, K.; Vedarajan, R.; Watanabe, M.; Ishikiriya, M.; Matsumi, N. Tunable LCST behavior of poly(-isopropylacrylamide/ionic liquid) copolymers. *Polym. Chem.* **2015**, *6* (38), 6819–6825.
- (73) Kureha, T.; Ohira, M.; Takahashi, Y.; Li, X.; Gilbert, E. P.; Shibayama, M. Nanoscale Structures of Poly(oligo ethylene glycol methyl ether methacrylate) Hydrogels Revealed by Small-Angle Neutron Scattering. *Macromolecules* **2022**, *55* (5), 1844–1854.
- (74) Yoon, J. A.; Gayathri, C.; Gil, R. R.; Kowalewski, T.; Matyjaszewski, K. Comparison of the Thermoresponsive Deswelling Kinetics of Poly(2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate) Hydrogels Prepared by ATRP and FRP. *Macromolecules* **2010**, *43* (10), 4791–4797.

Supporting information
for
Thermosensitive behaviour of internally phenyl-
enriched hyperbranched polyglycidols in water – the
influence of a covalent bond used for the
hydrophobization

Daria Jaworska-Krych^a, Monika Gosecka^{*a}, Paulina Maczugowska^b, Krzysztof Hałagan^b, Kosma Szutkowski^c, Mateusz Gosecki^a, Małgorzata Urbaniak^a, Marcin Kozanecki^b

a. Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, Sienkiewicza 112, 90-363 Lodz, Poland

* Correspondence: mdybko@cbmm.lodz.pl

b. Department of Molecular Physics, Faculty of Chemistry, Lodz University of Technology, Zeromskiego 116, 90-924 Lodz, Poland

c. NanoBioMedical Centre, Adam Mickiewicz University in Poznan, PL61614 Poznan, Poland;

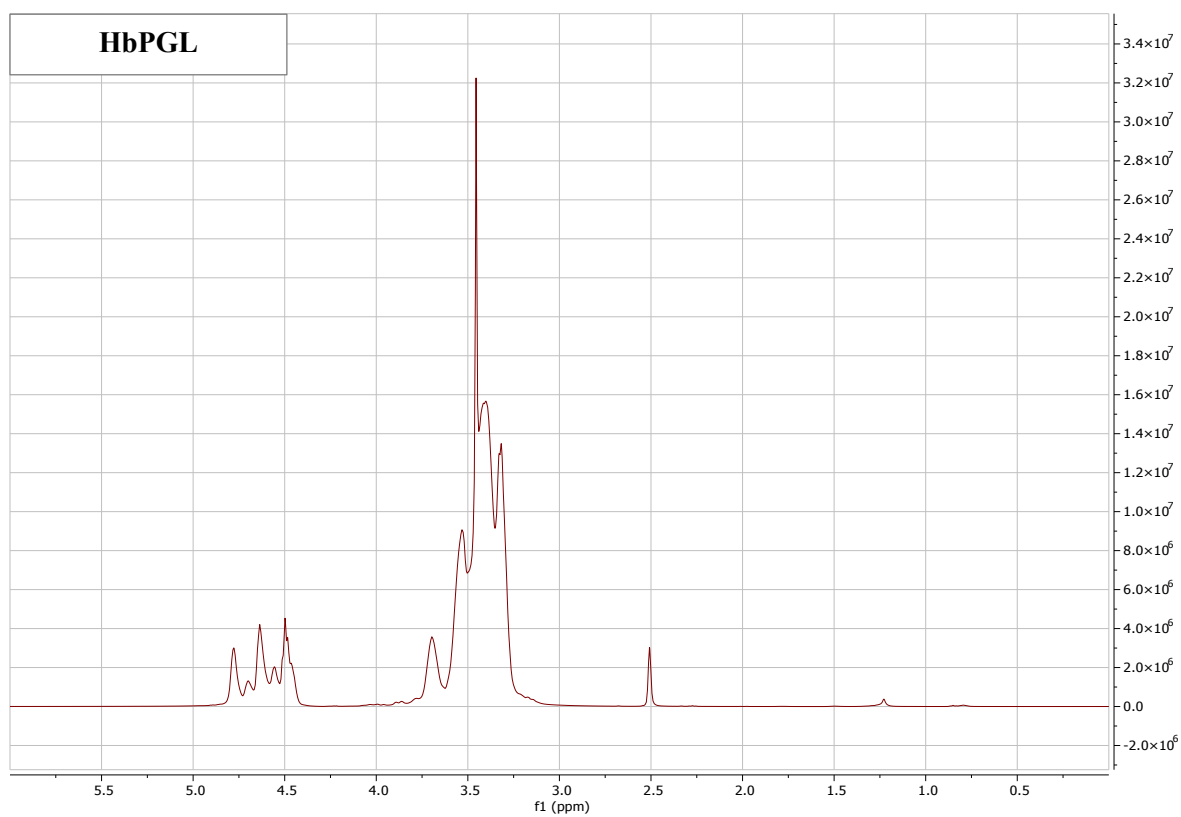


Figure S1. ^1H NMR spectrum of HbPGL recorded in DMSO-d_6 .

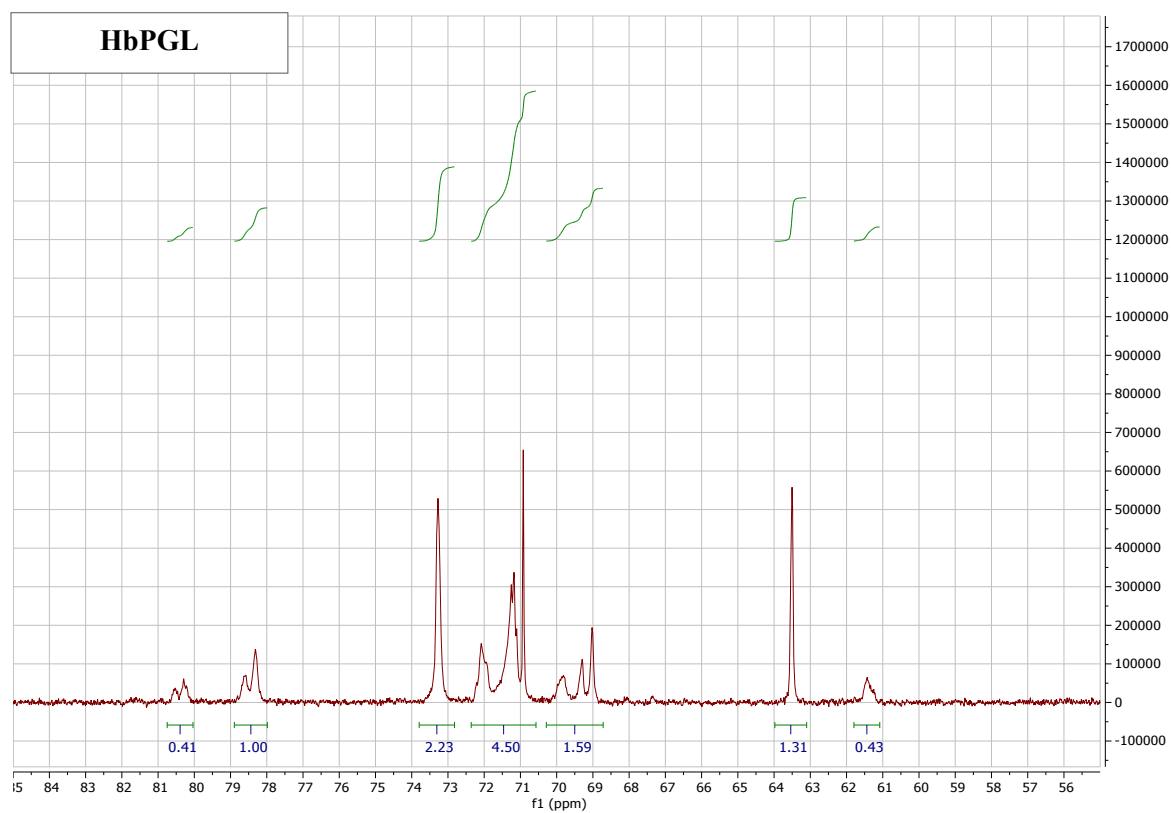


Figure S2. ^{13}C INV GATED NMR spectrum of HbPGL recorded in DMSO-d_6 .

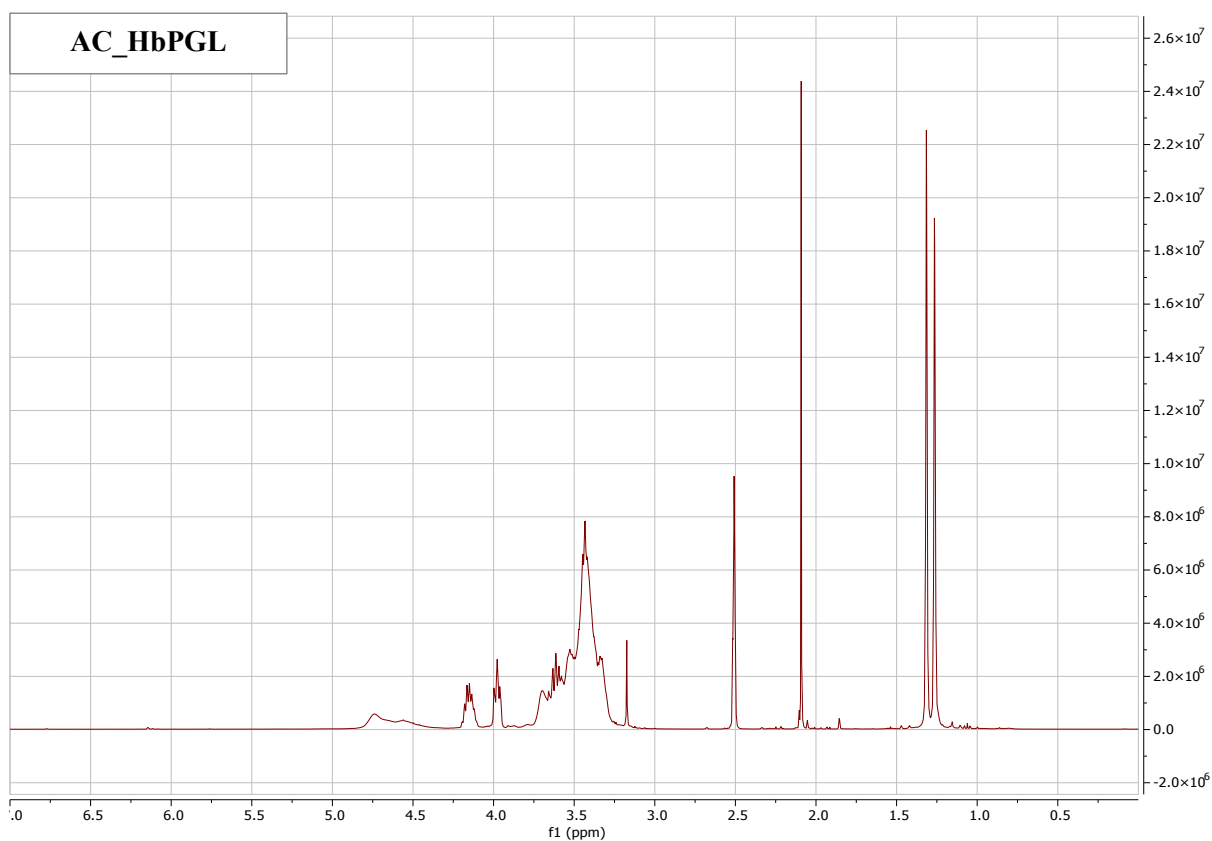


Figure S3. ^1H NMR spectrum of AC_HbPGL recorded in DMSO- d_6 .

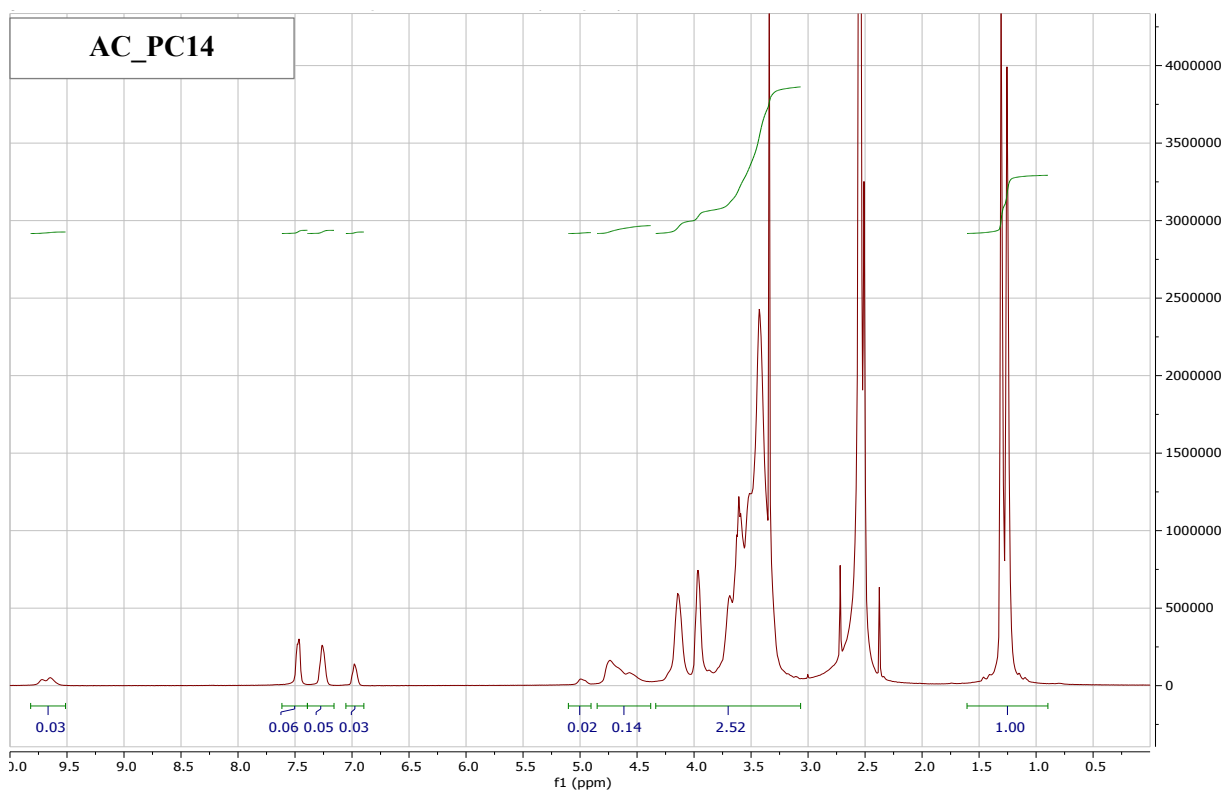


Figure S4. ^1H NMR spectrum of AC_PC14 recorded in DMSO- d_6 .

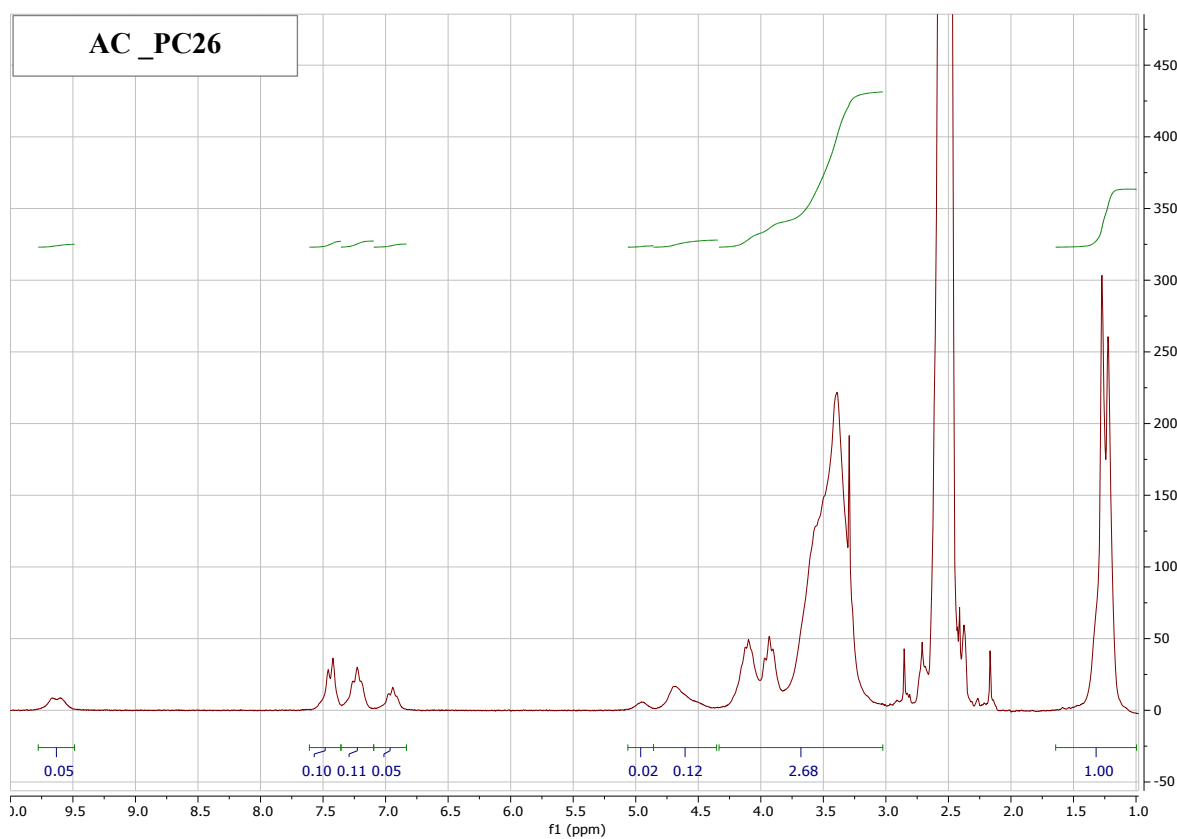


Figure S5. ^1H NMR spectrum of AC_PC26 recorded in DMSO-d_6 .

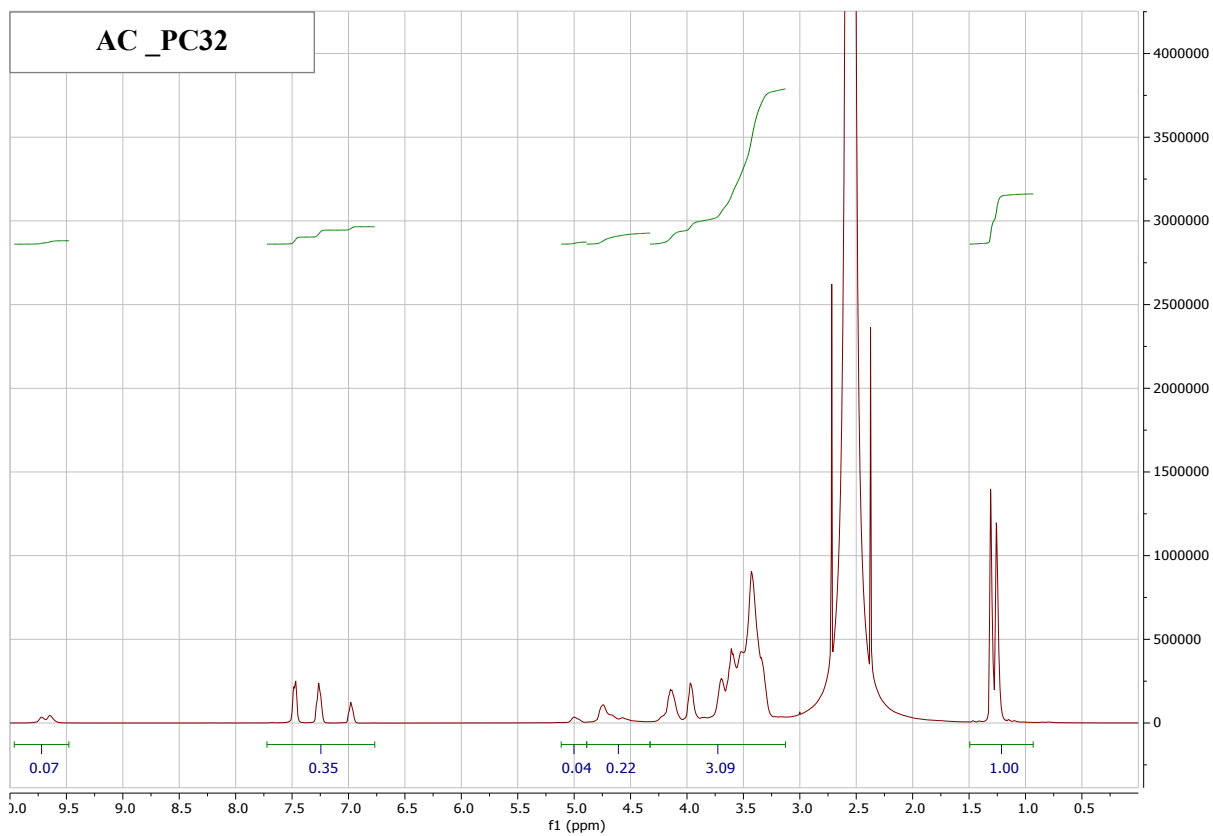


Figure S6. ^1H NMR spectrum of AC_PC32 recorded in DMSO-d_6 .

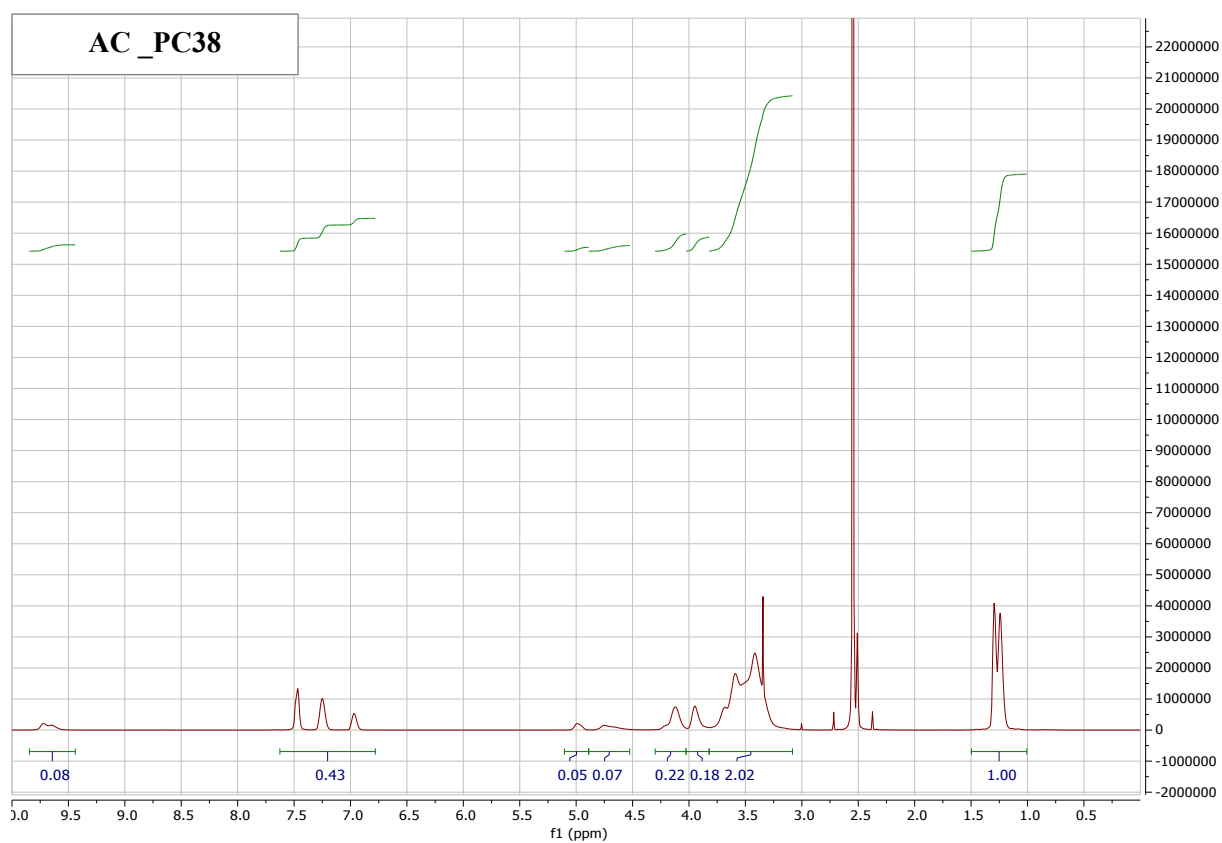


Figure S7. ^1H NMR spectrum of AC_PC38 recorded in DMSO-d_6 .

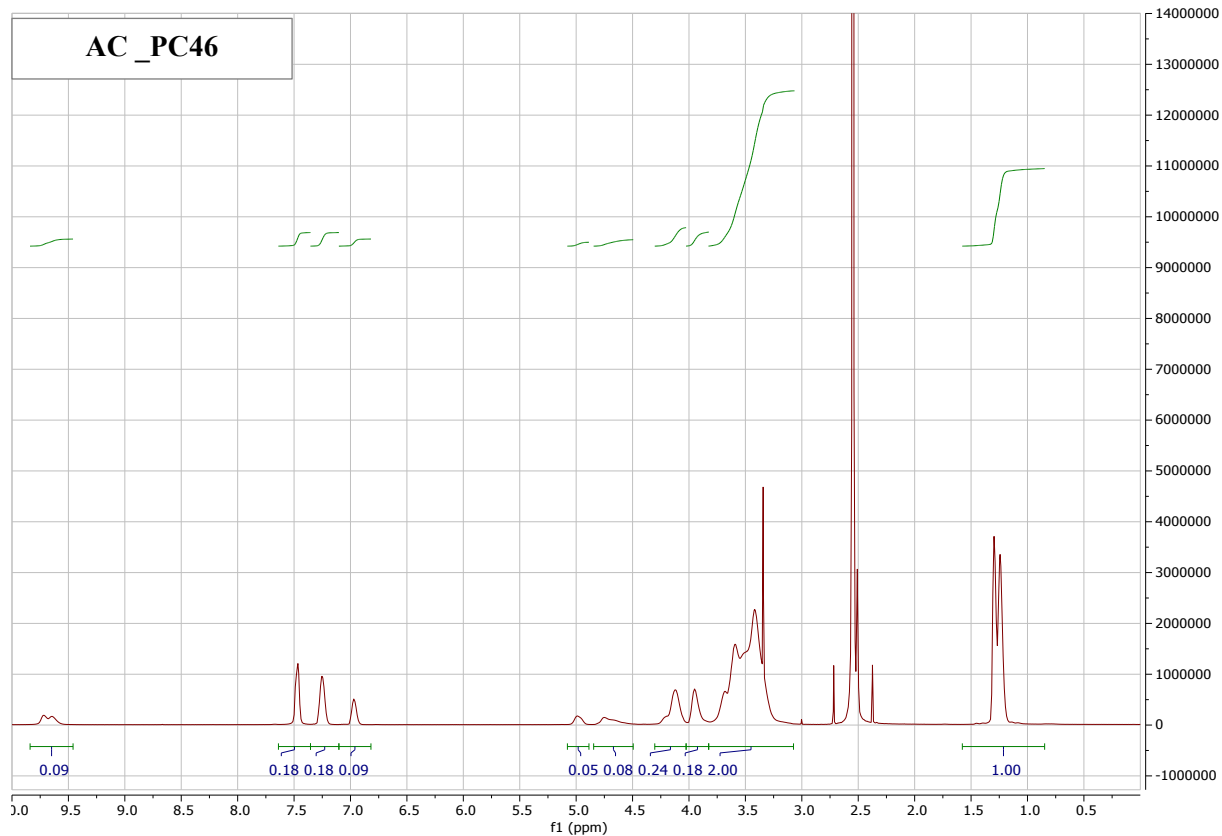


Figure S8. ^1H NMR spectrum of AC_PC46 recorded in DMSO-d_6 .

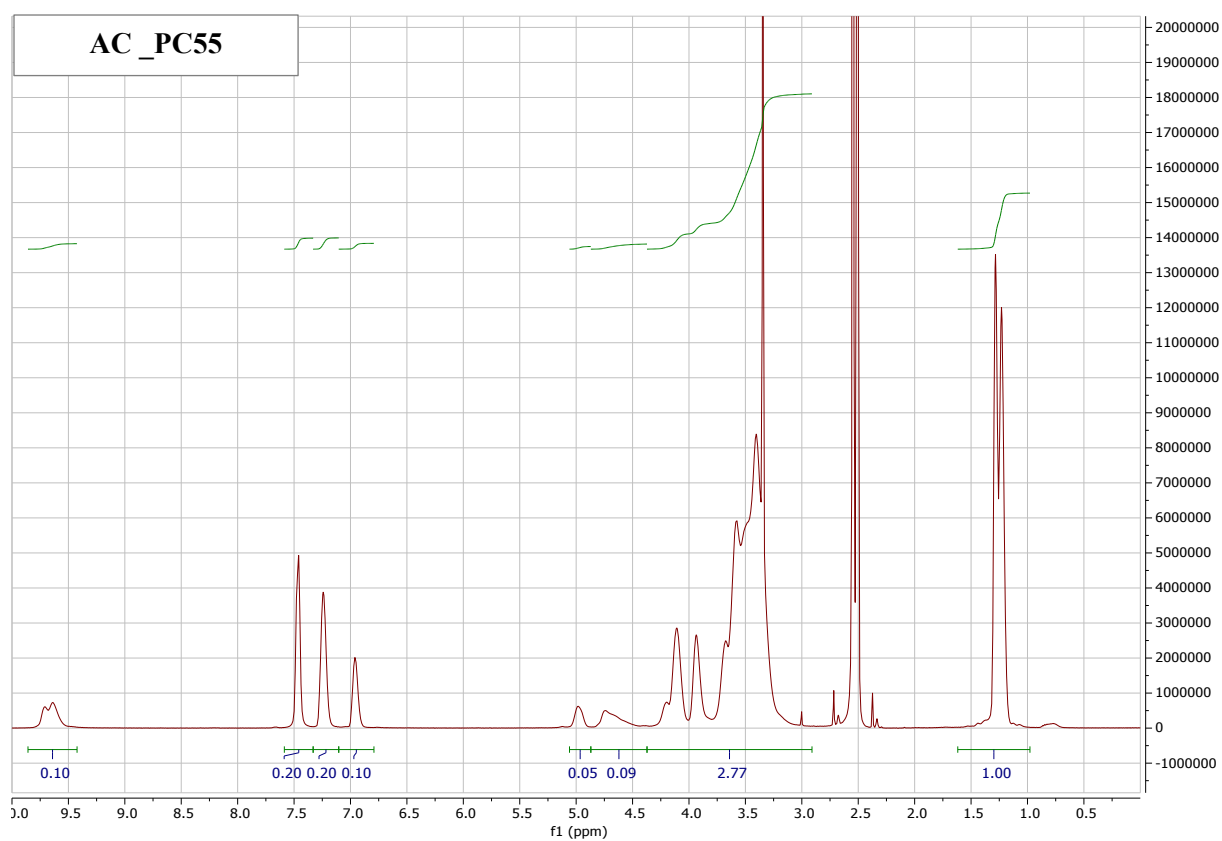


Figure S9. ^1H NMR spectrum of AC_PC55 recorded in DMSO-d_6 .

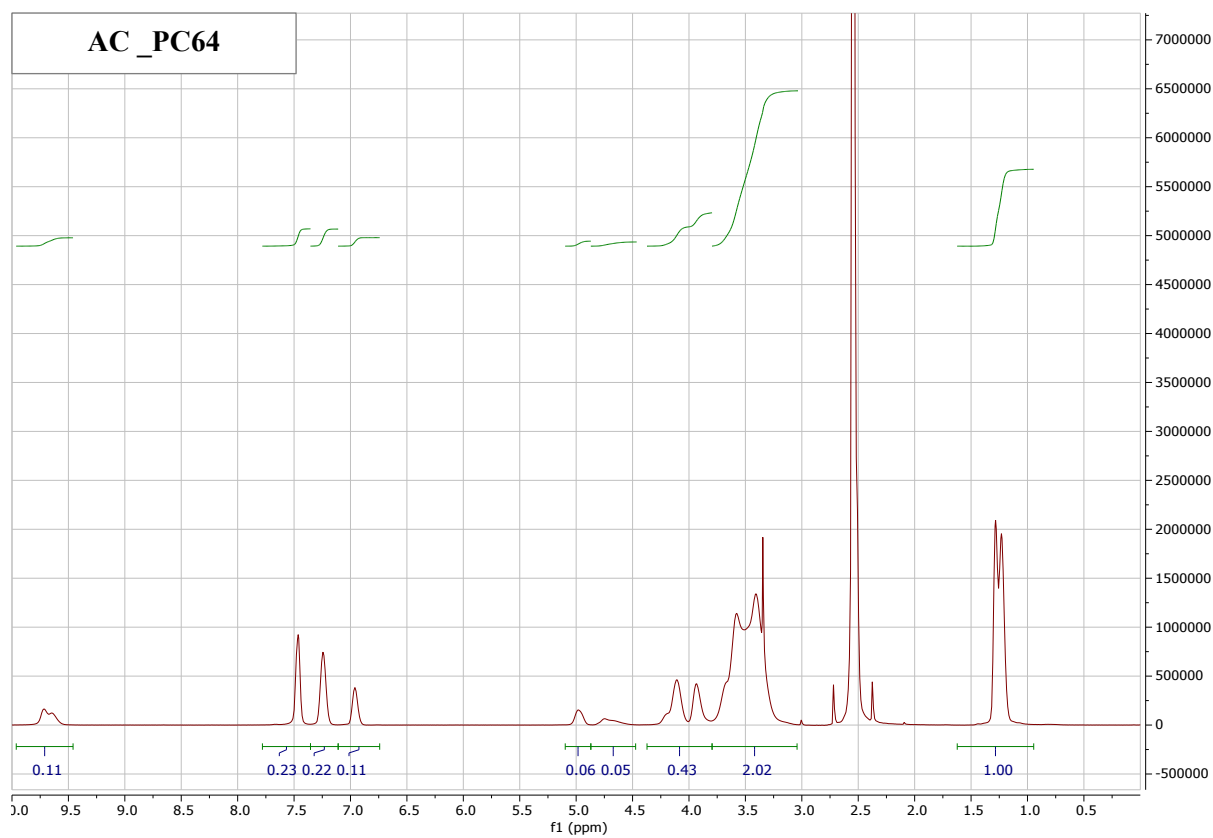


Figure S10. ^1H NMR spectrum of AC_PC64 recorded in DMSO-d_6 .

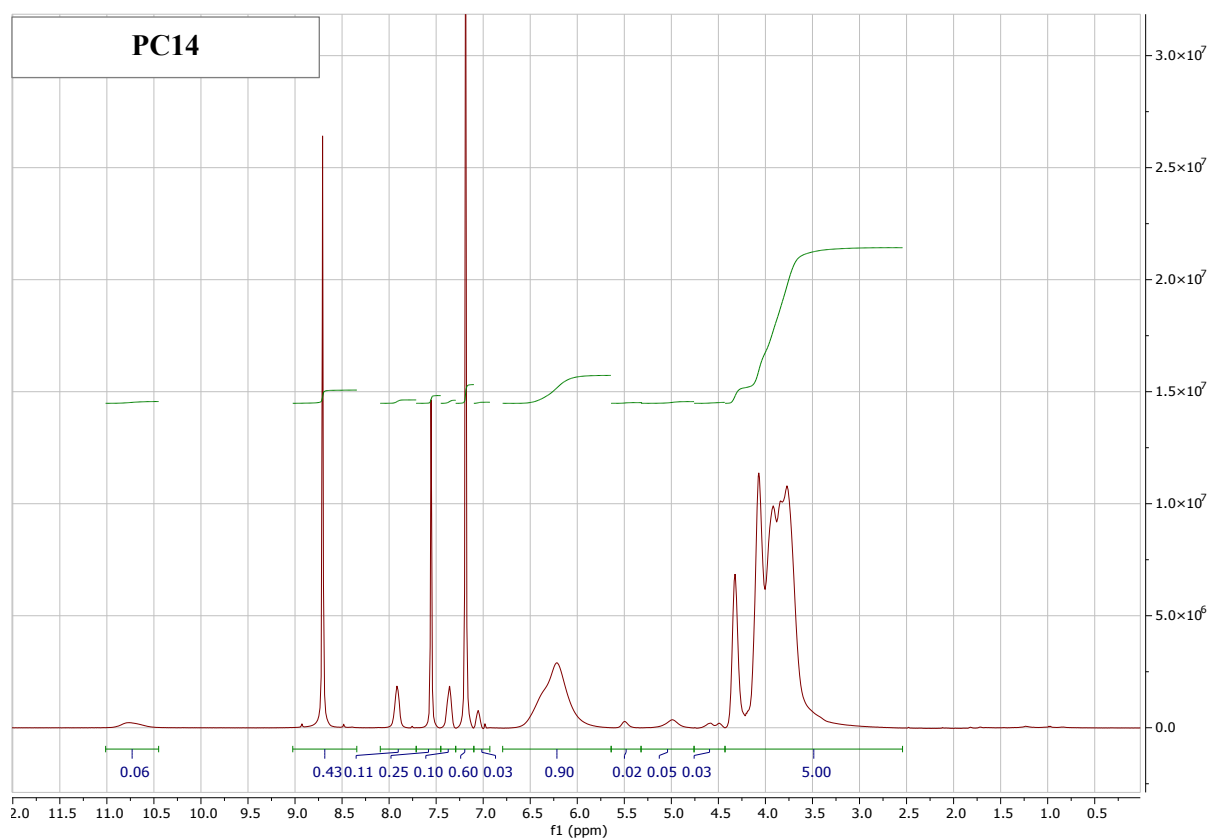


Figure S11. ^1H NMR spectrum of PC14 recorded in Pyridine- d_5 .

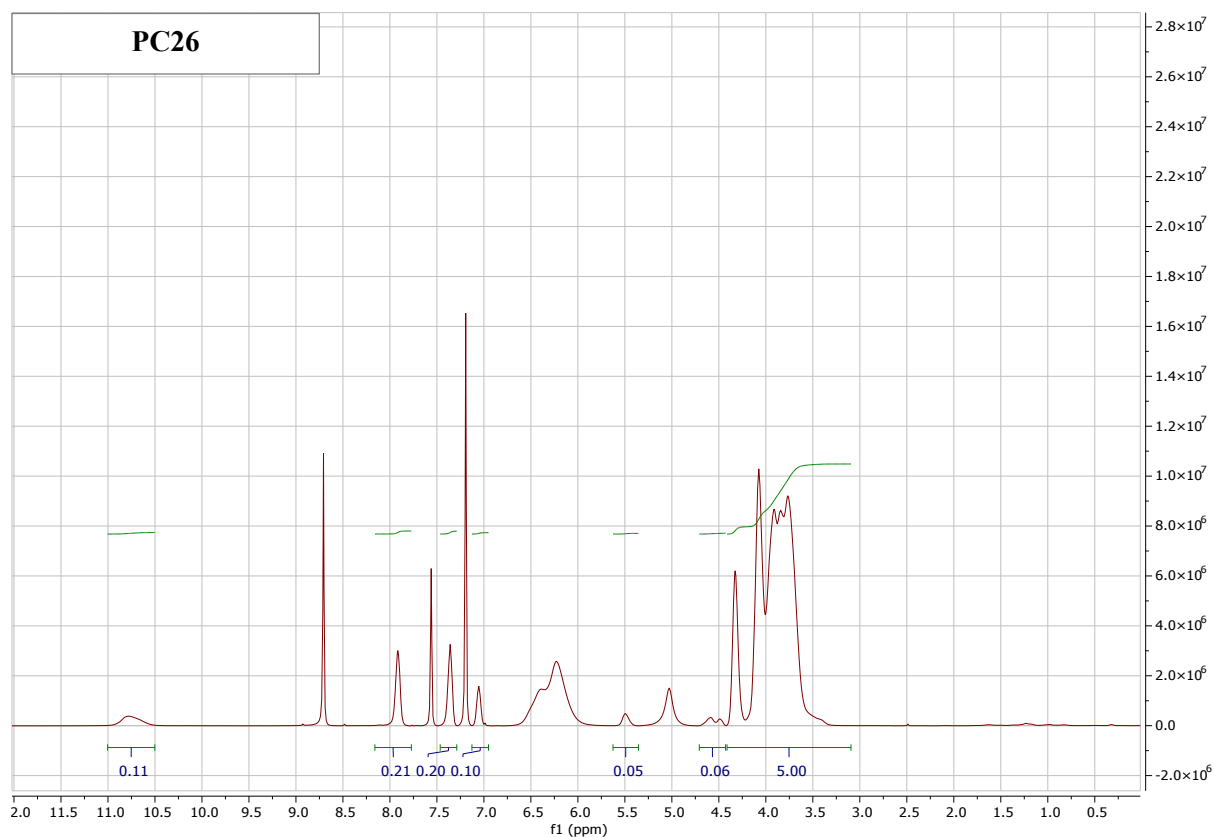


Figure S12. ^1H NMR spectrum of PC26 recorded in Pyridine- d_5 .

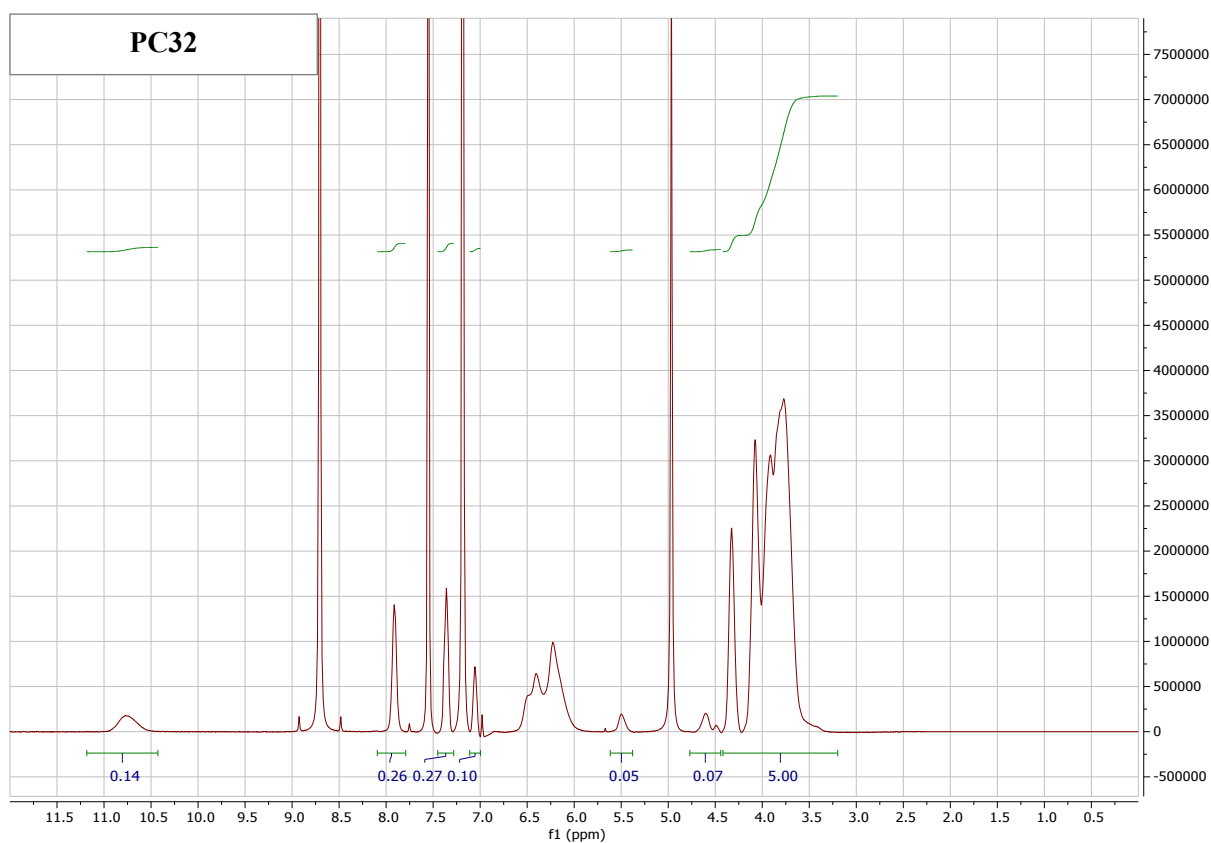


Figure S13. ^1H NMR spectrum of PC32 recorded in Pyridine-d_5 .

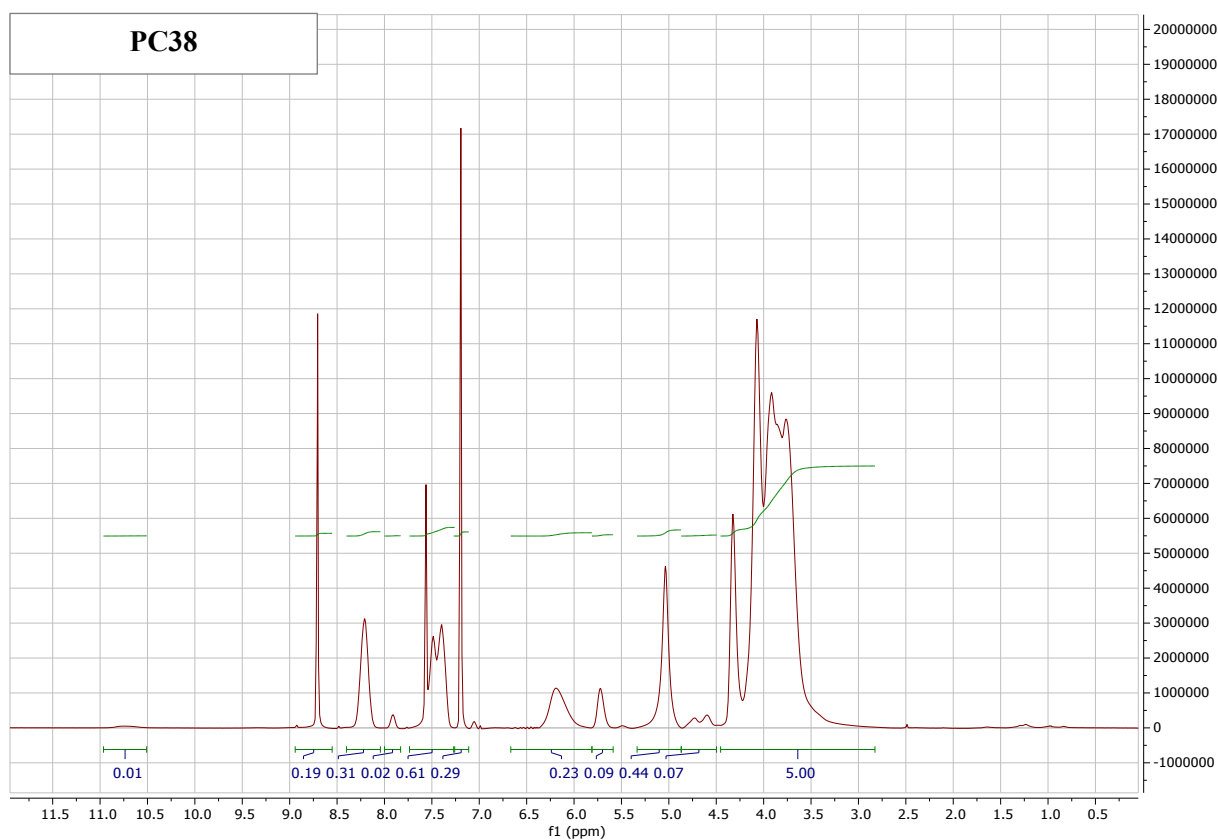


Figure S14. ^1H NMR spectrum of PC38 recorded in Pyridine-d_5 .

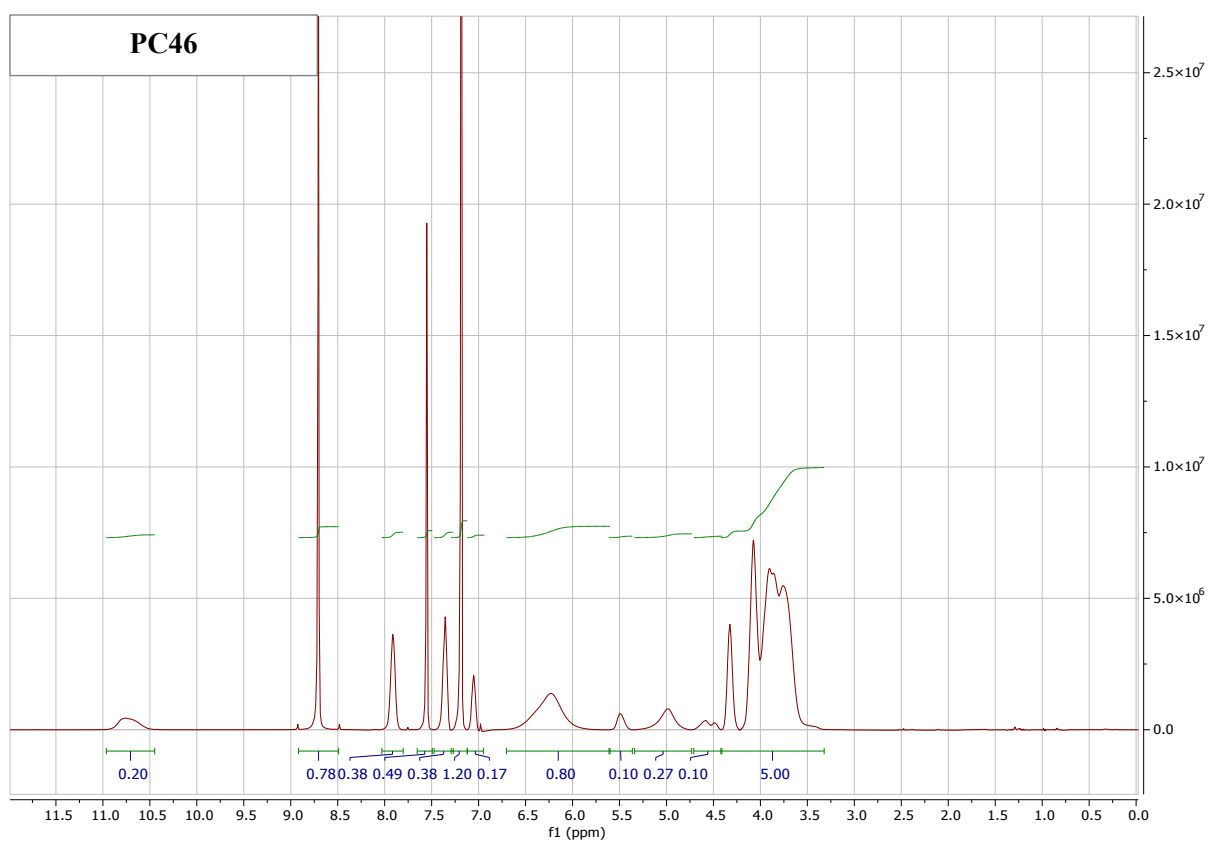


Figure S15. ¹H NMR spectrum of PC46 recorded in Pyridine-d₅.

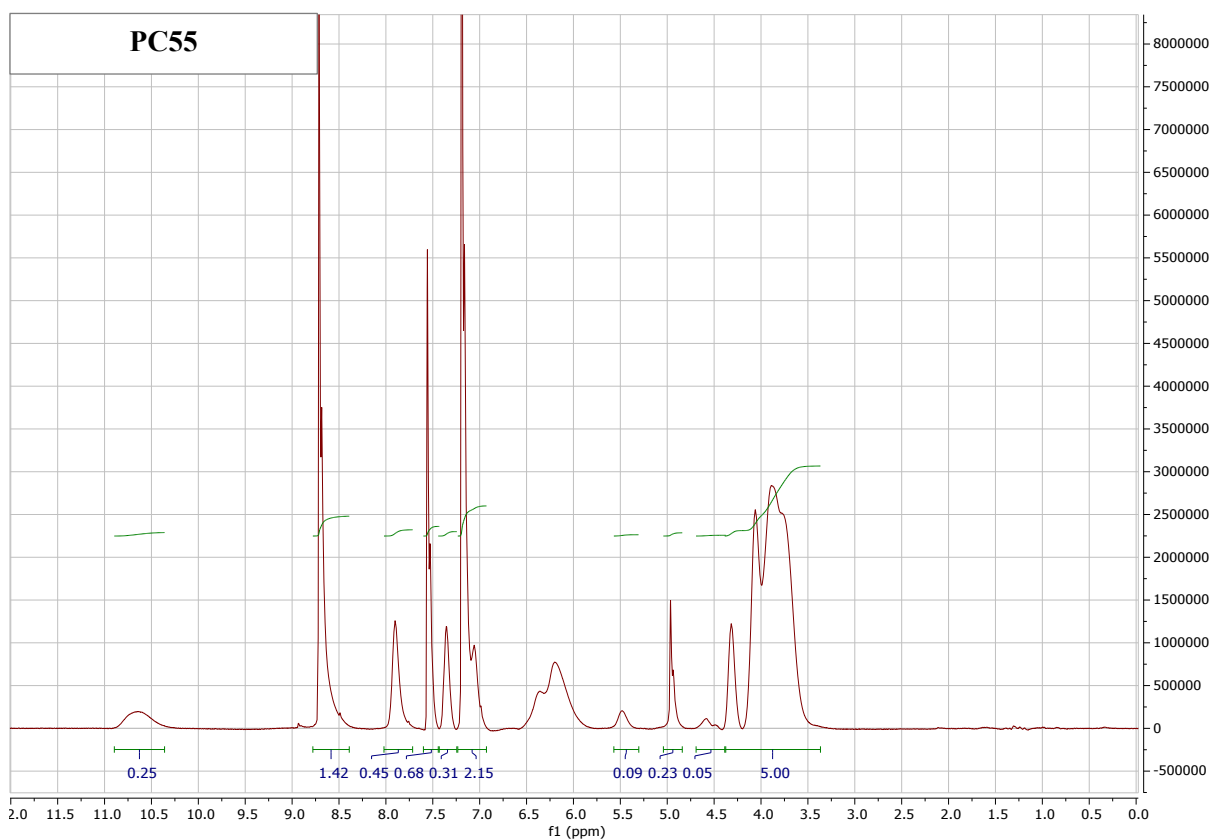


Figure S16. ¹H NMR spectrum of PC55 recorded in Pyridine-d₅.

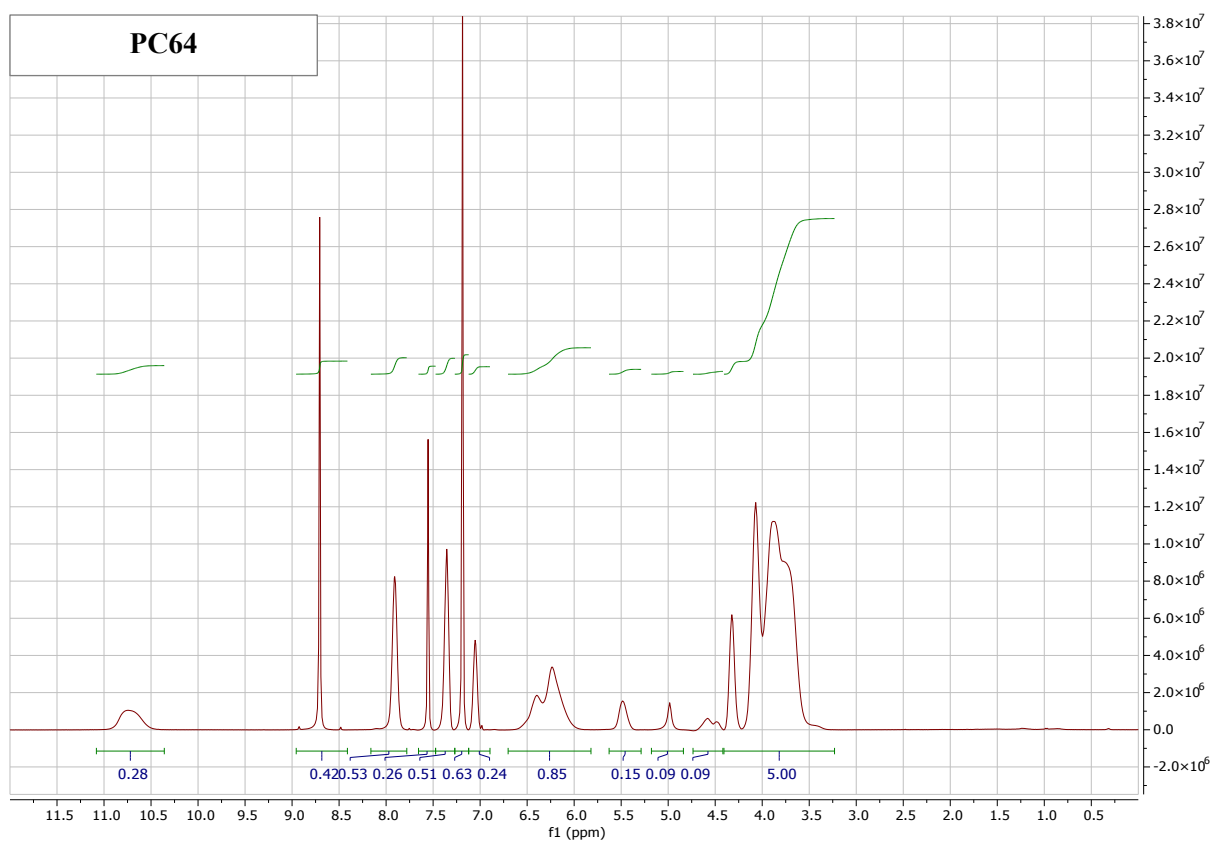


Figure S17. ^1H NMR spectrum of PC64 recorded in Pyridine- d_5 .

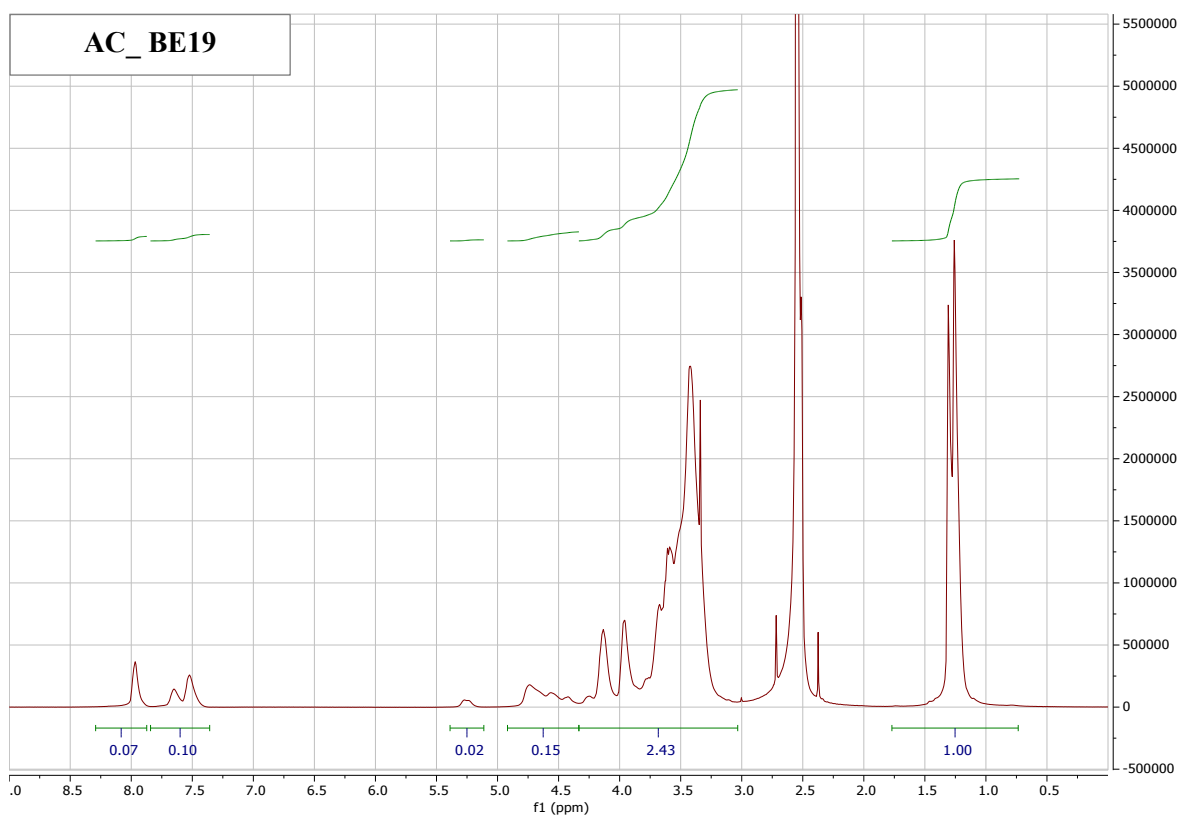


Figure S18. ^1H NMR spectrum of AC_BE19 recorded in DMSO- d_6 .

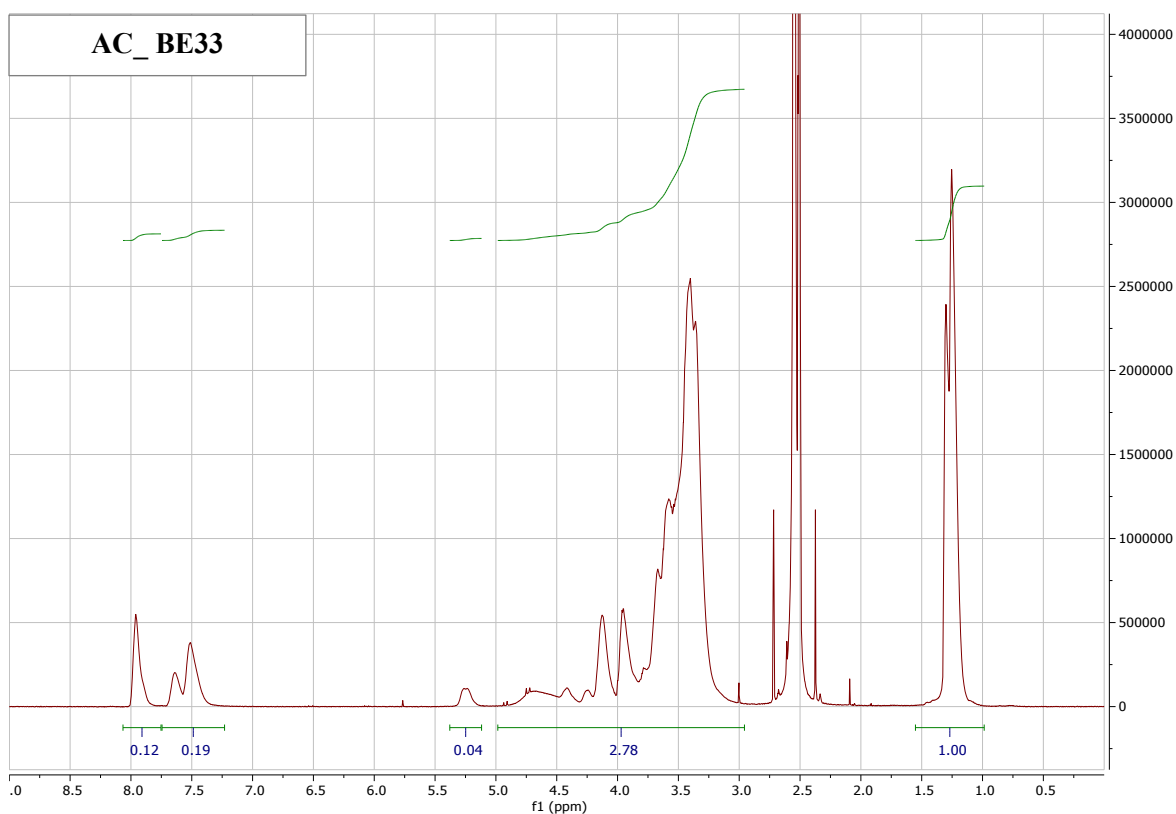


Figure S19. ^1H NMR spectrum of AC_BE33 recorded in DMSO-d_6 .

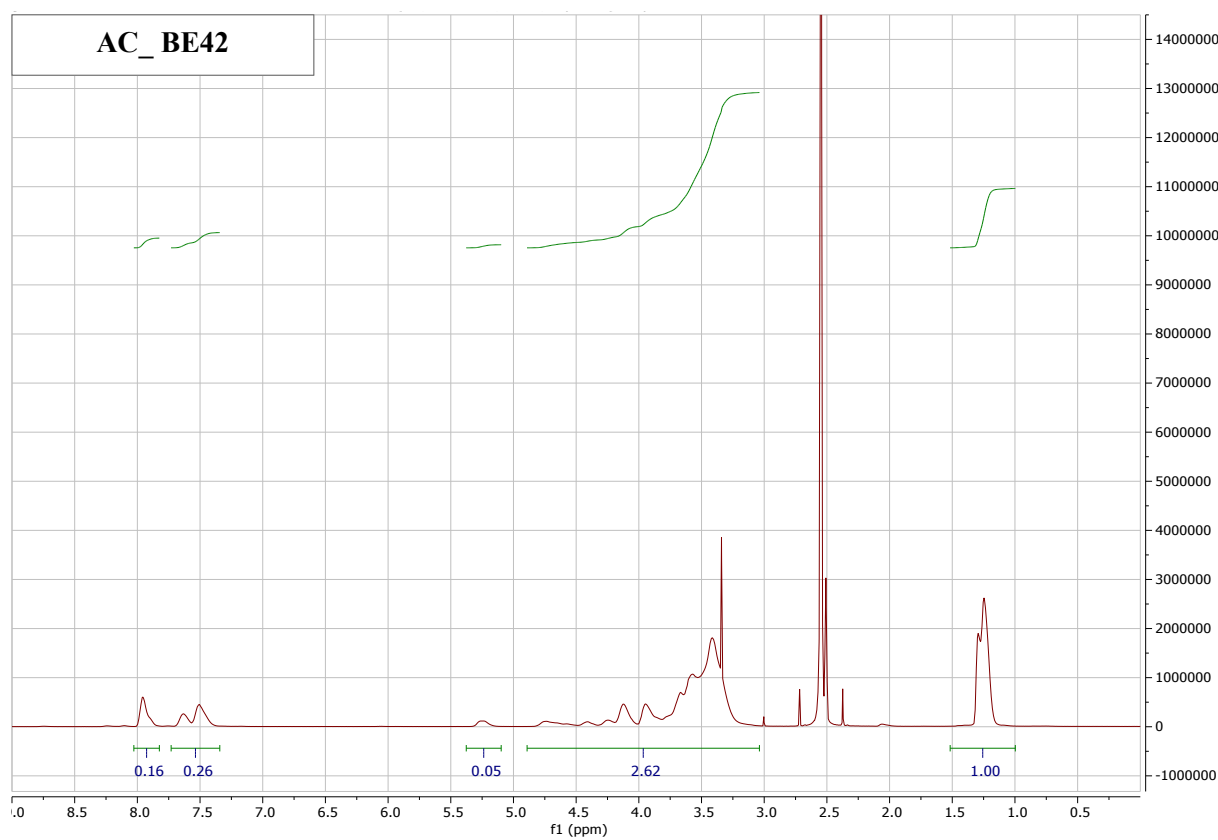


Figure S20. ^1H NMR spectrum of AC_BE42 recorded in DMSO-d_6 .

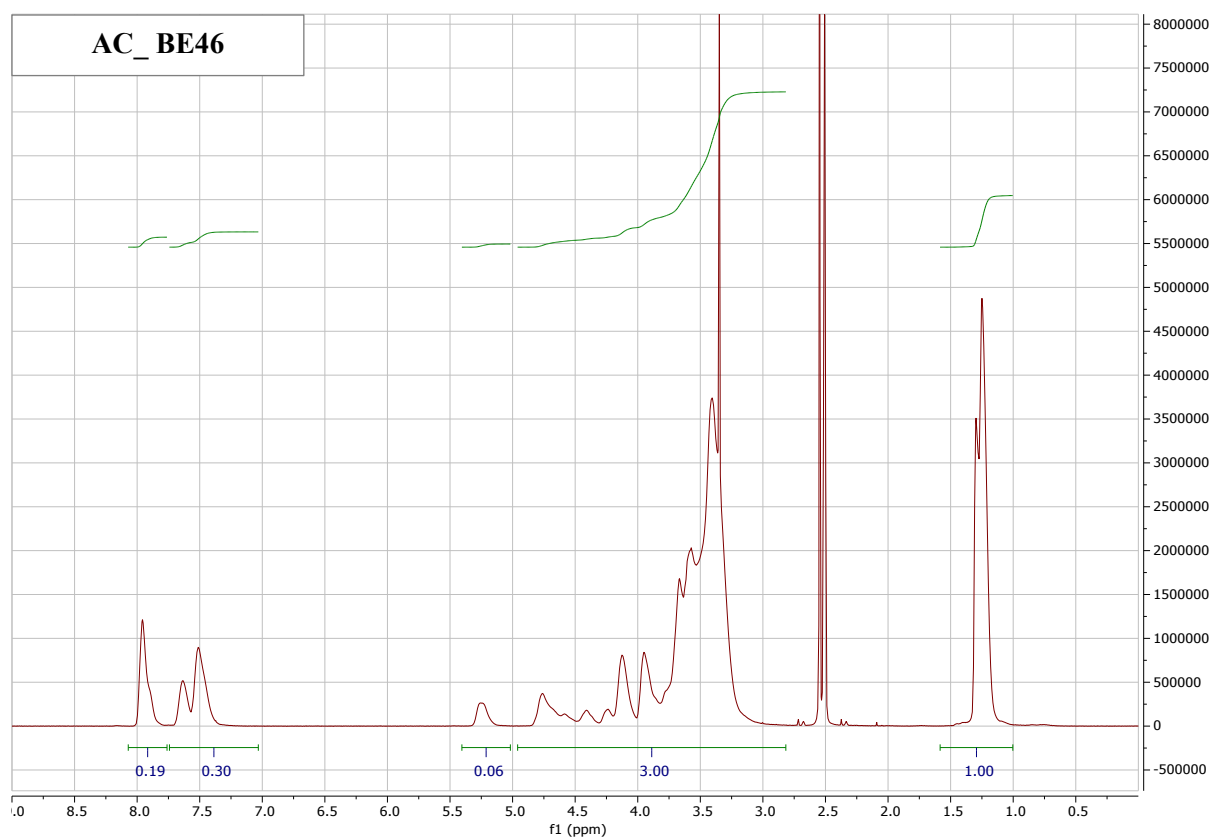


Figure S21. ^1H NMR spectrum of AC_BE46 recorded in DMSO-d_6 .

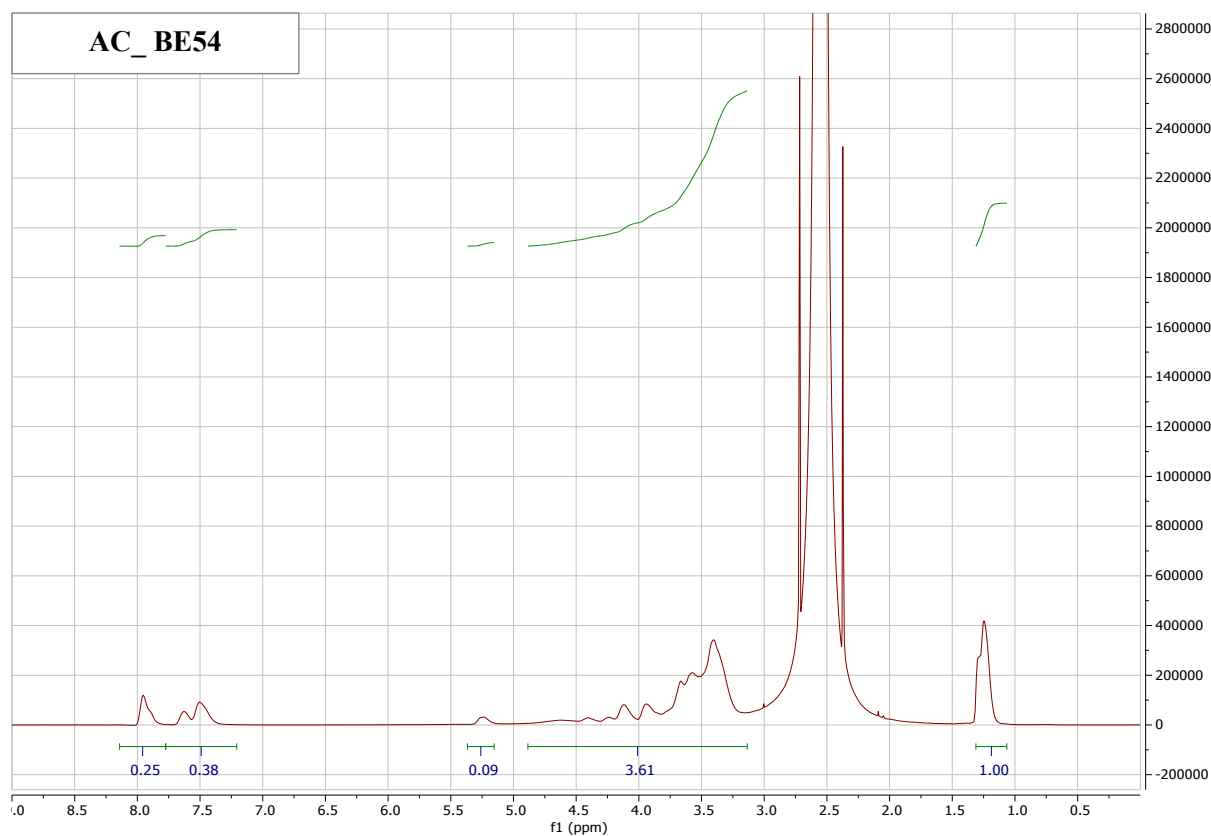


Figure S22. ^1H NMR spectrum of AC_BE54 recorded in DMSO-d_6 .

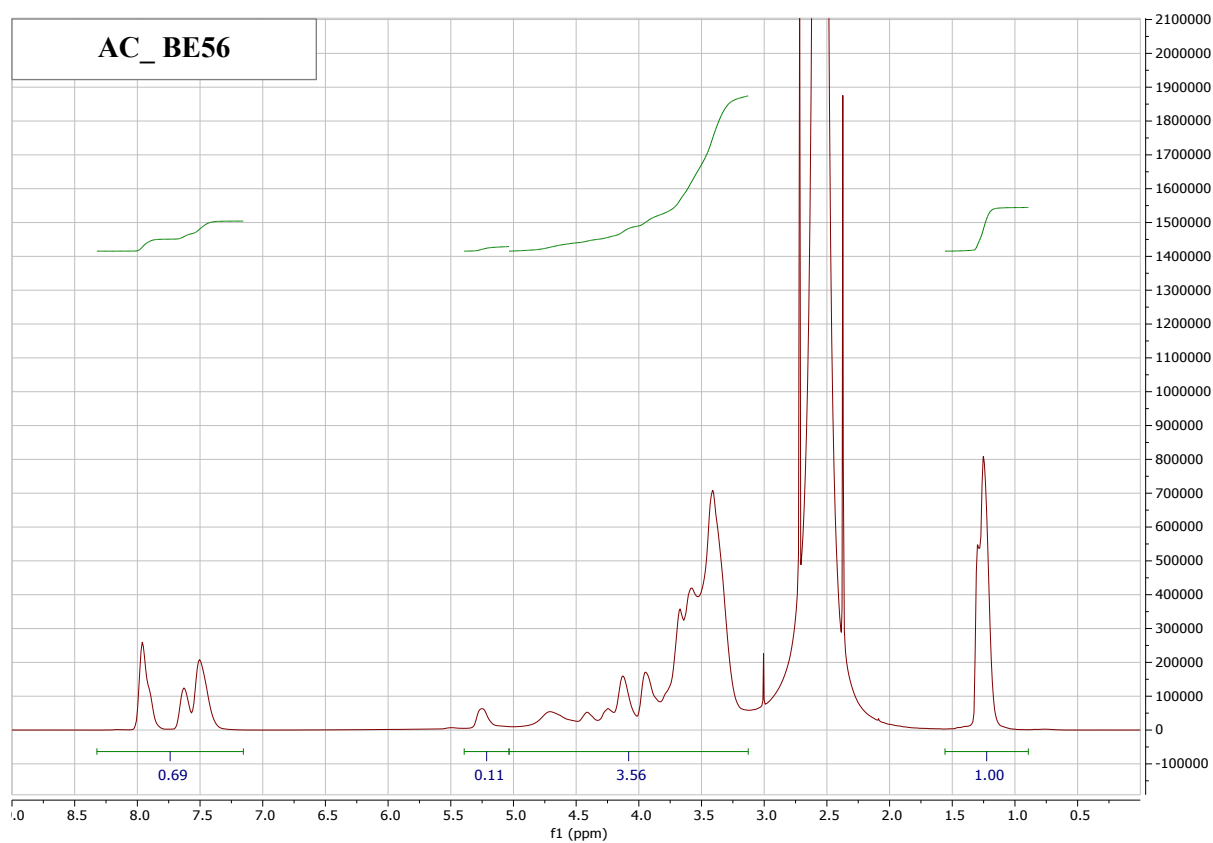


Figure S23. ^1H NMR spectrum of AC_BE56 recorded in DMSO-d_6 .

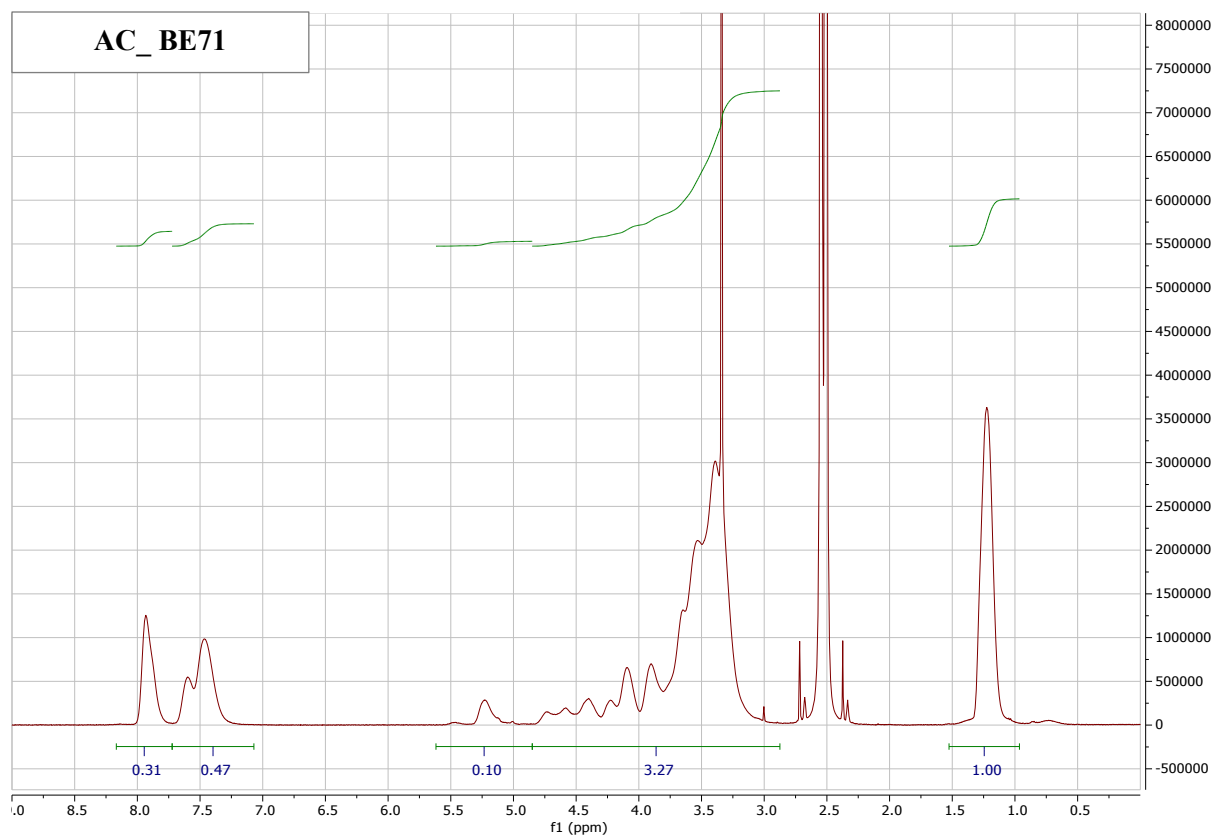


Figure S24. ^1H NMR spectrum of AC_BE71 recorded in DMSO-d_6 .

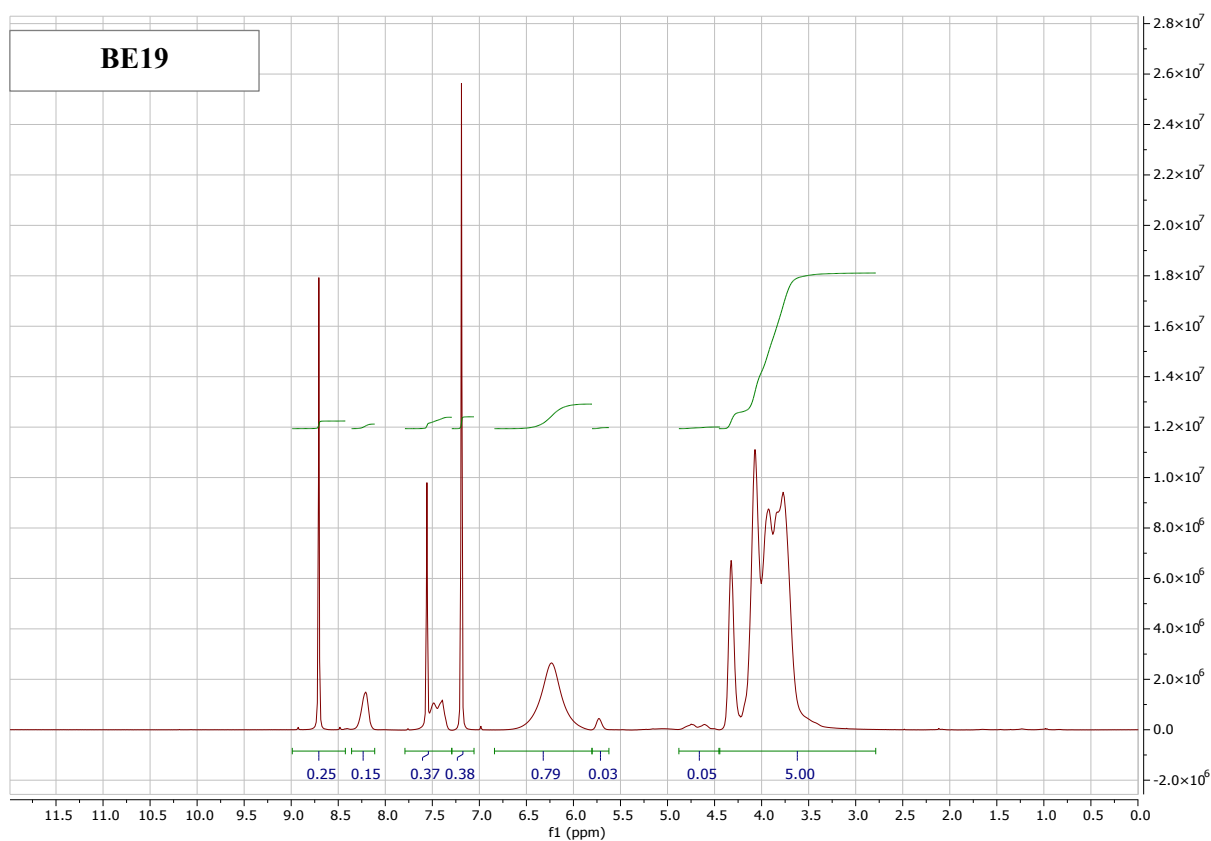


Figure S25. ^1H NMR spectrum of BE19 recorded in Pyridine- d_5 .

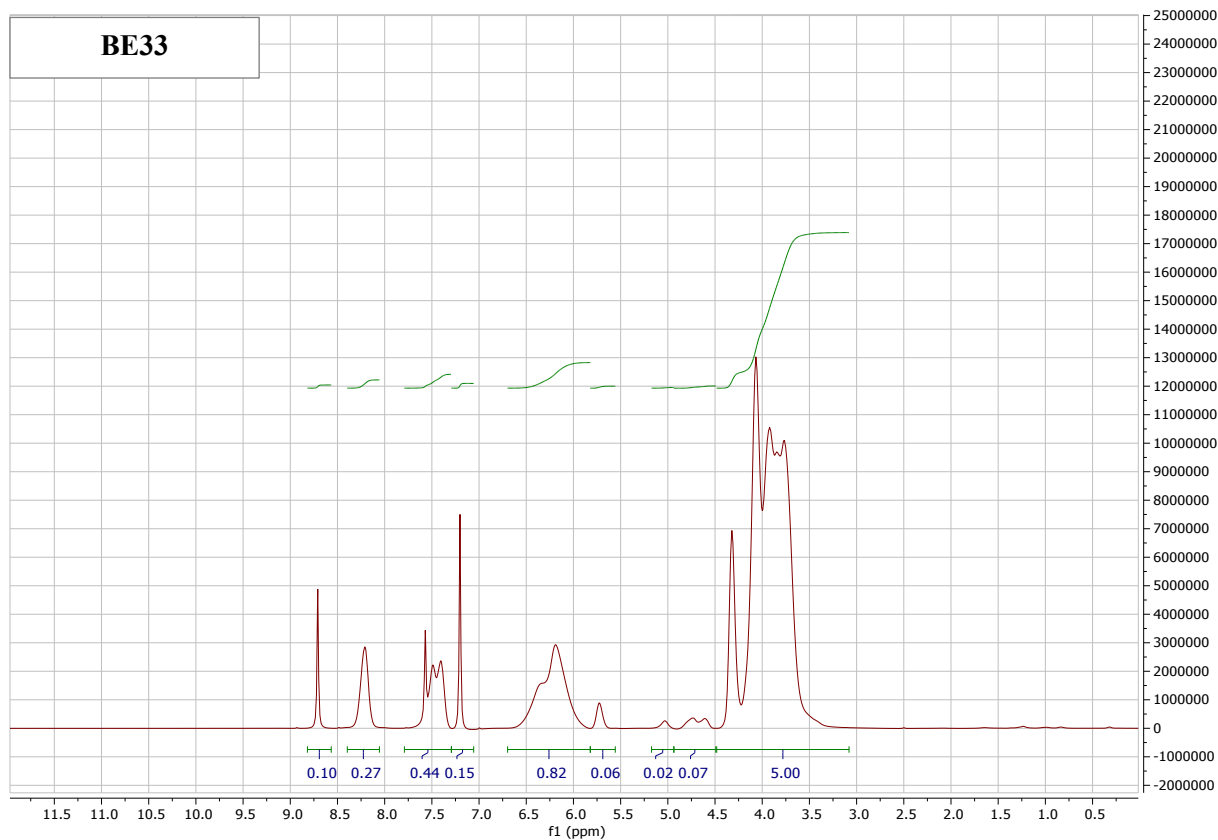


Figure S26. ^1H NMR spectrum of BE33 recorded in Pyridine- d_5 .

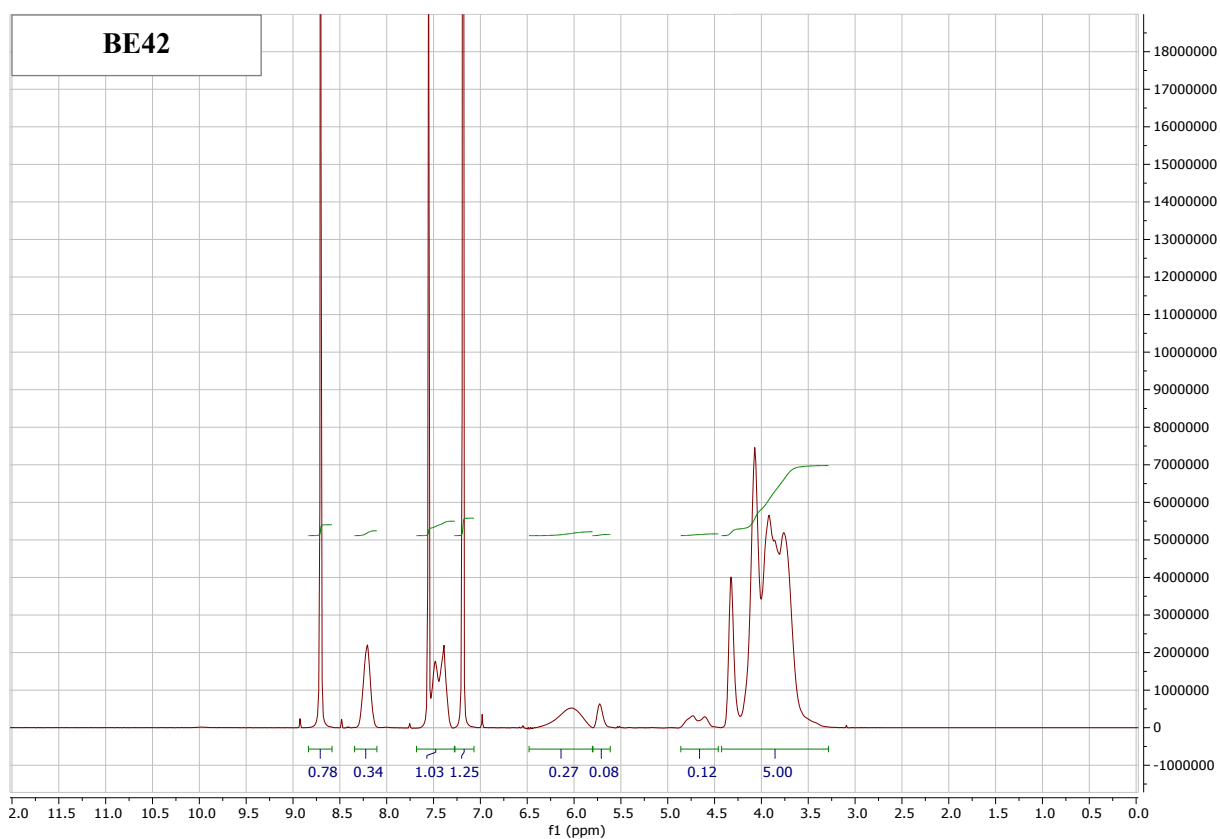


Figure S27. ^1H NMR spectrum of BE42 recorded in Pyridine- d_5 .

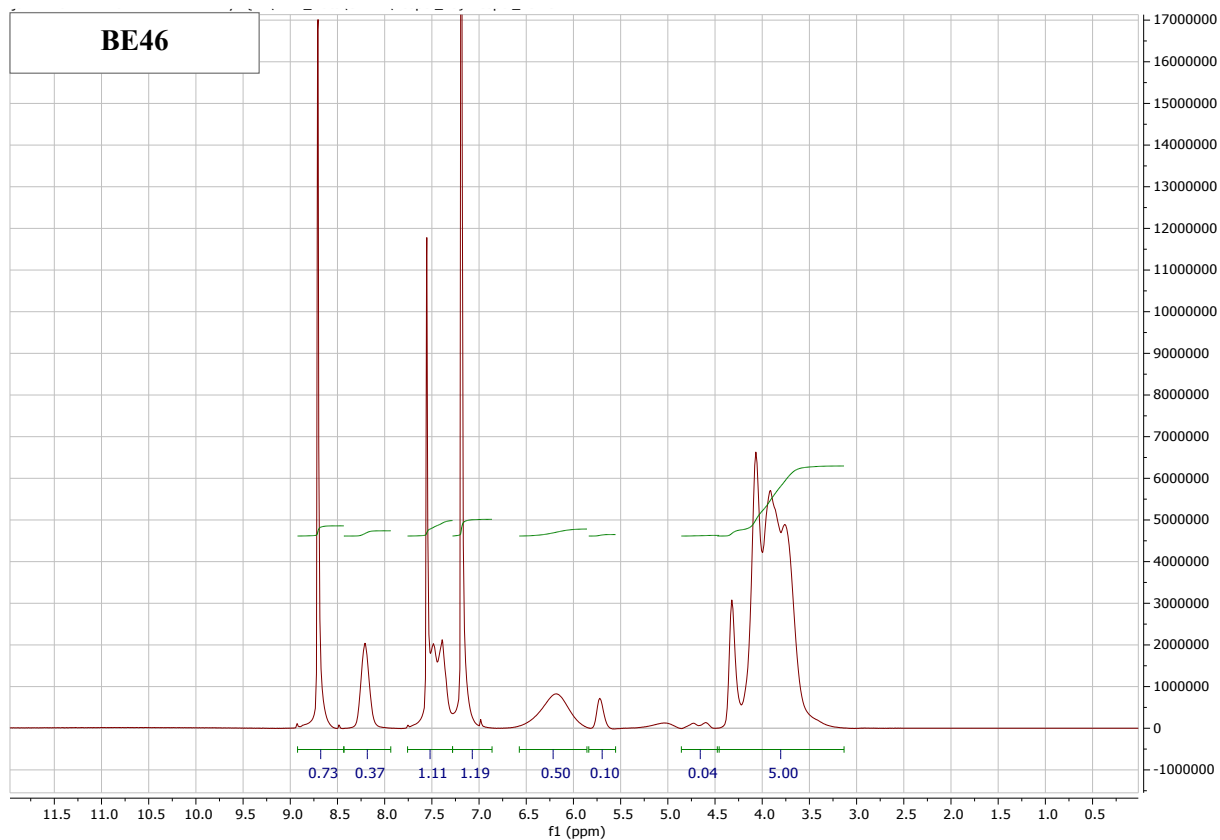


Figure S28. ^1H NMR spectrum of BE46 recorded in Pyridine- d_5 .

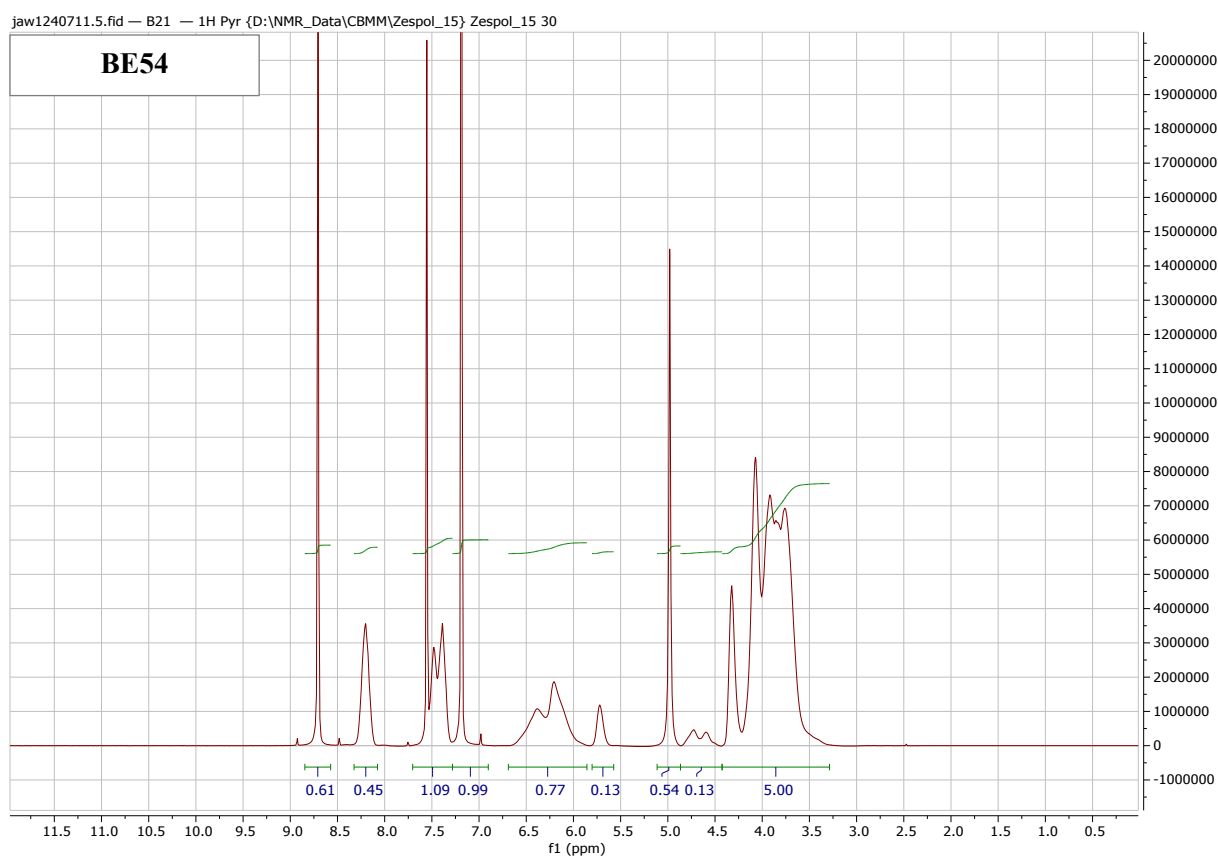


Figure S29. ^1H NMR spectrum of BE54 recorded in Pyridine- d_5 .

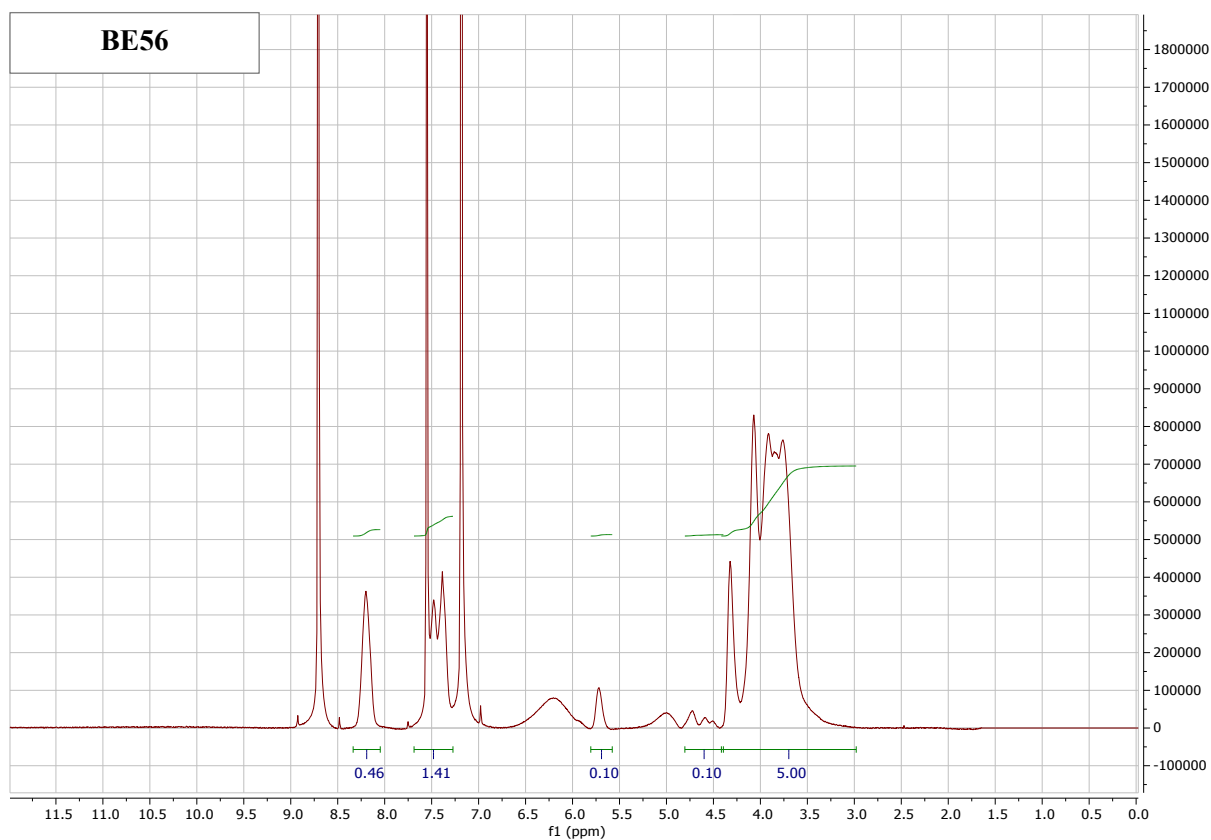


Figure S30. ^1H NMR spectrum of BE56 recorded in Pyridine- d_5 .

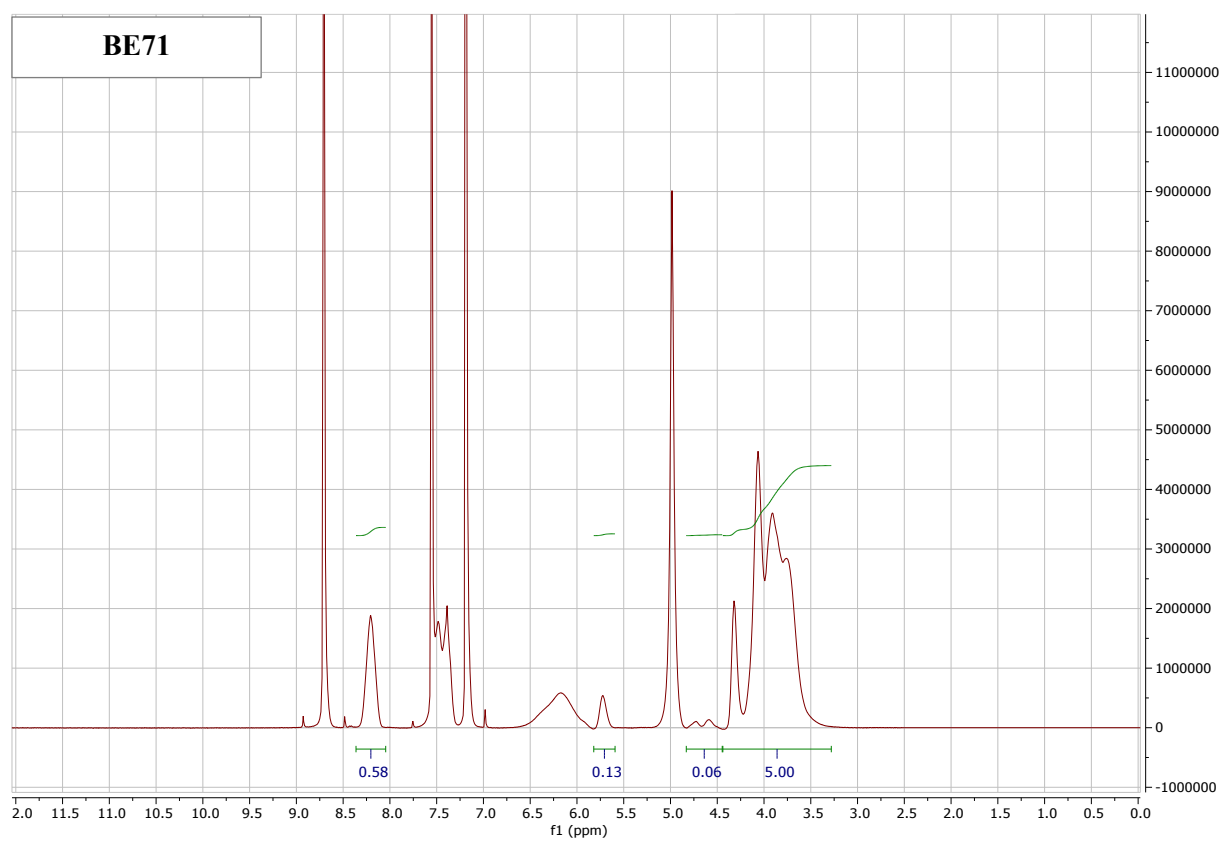


Figure S31. ^1H NMR spectrum of BE71 recorded in Pyridine-d_5 .

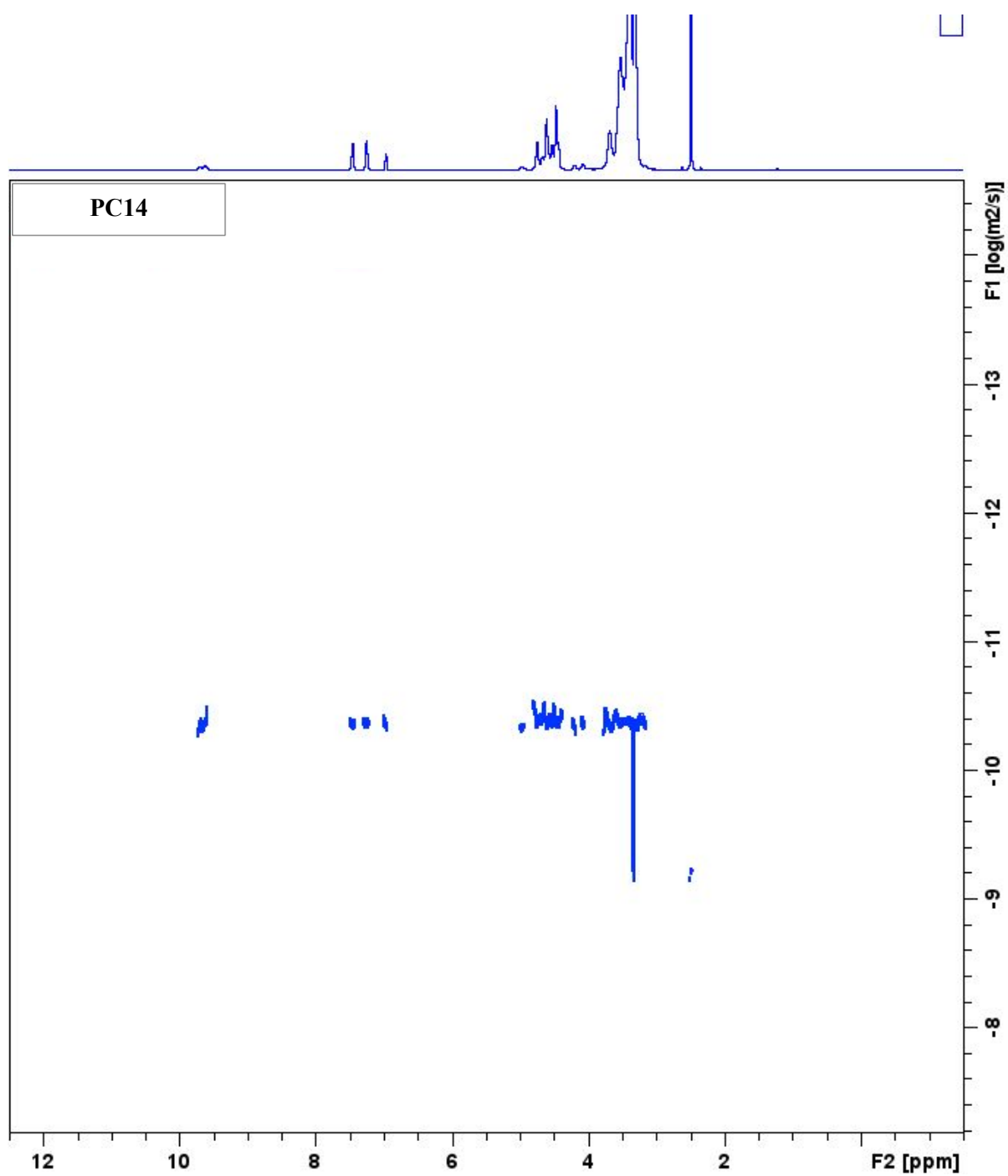


Figure S32. ¹H DOSY NMR spectrum of PC14 recorded in DMSO-d₆.

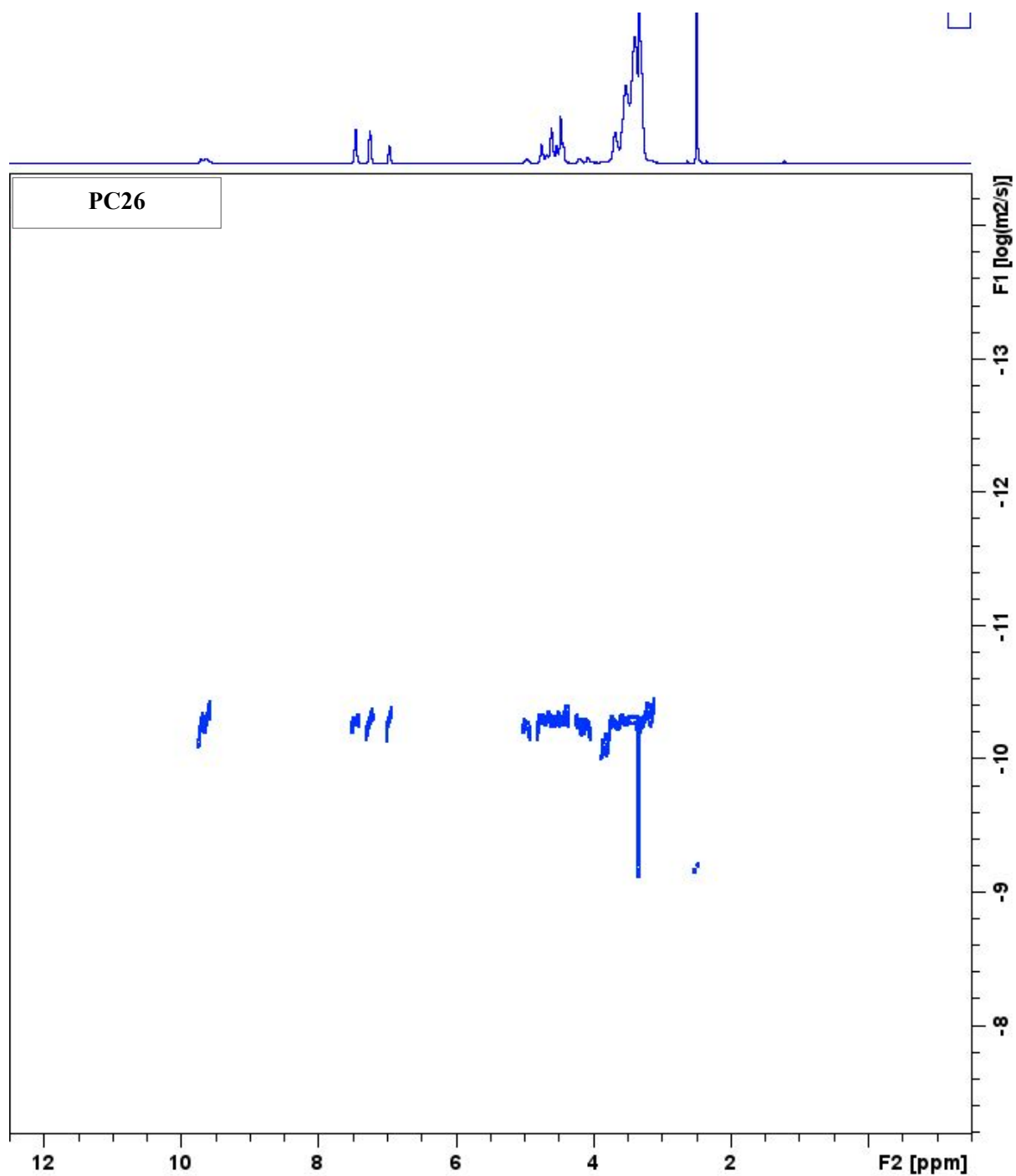


Figure S33. ¹H DOSY NMR spectrum of PC26 recorded in DMSO-d₆.

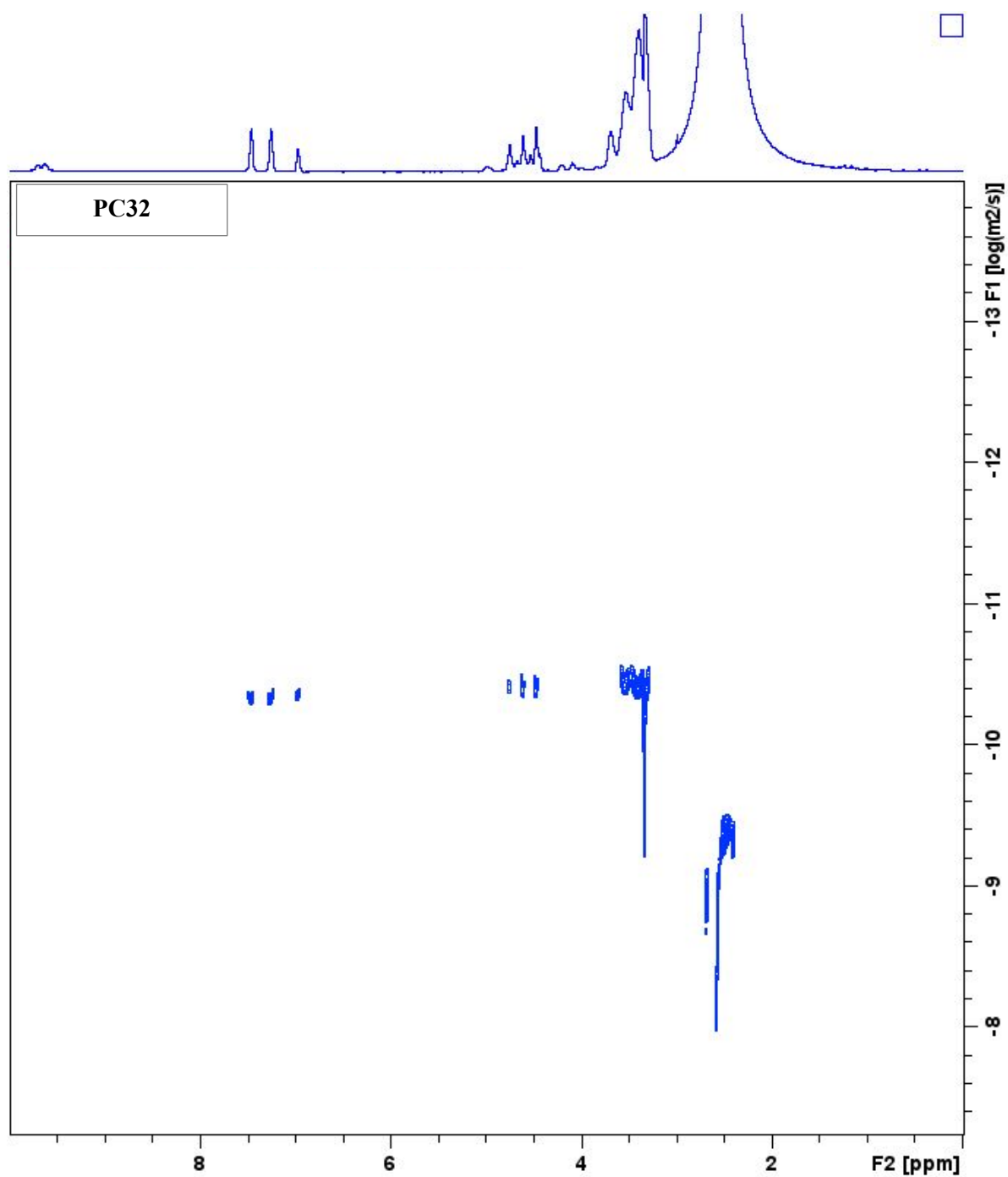


Figure S34. ^1H DOSY NMR spectrum of PC32 recorded in DMSO-d_6 .

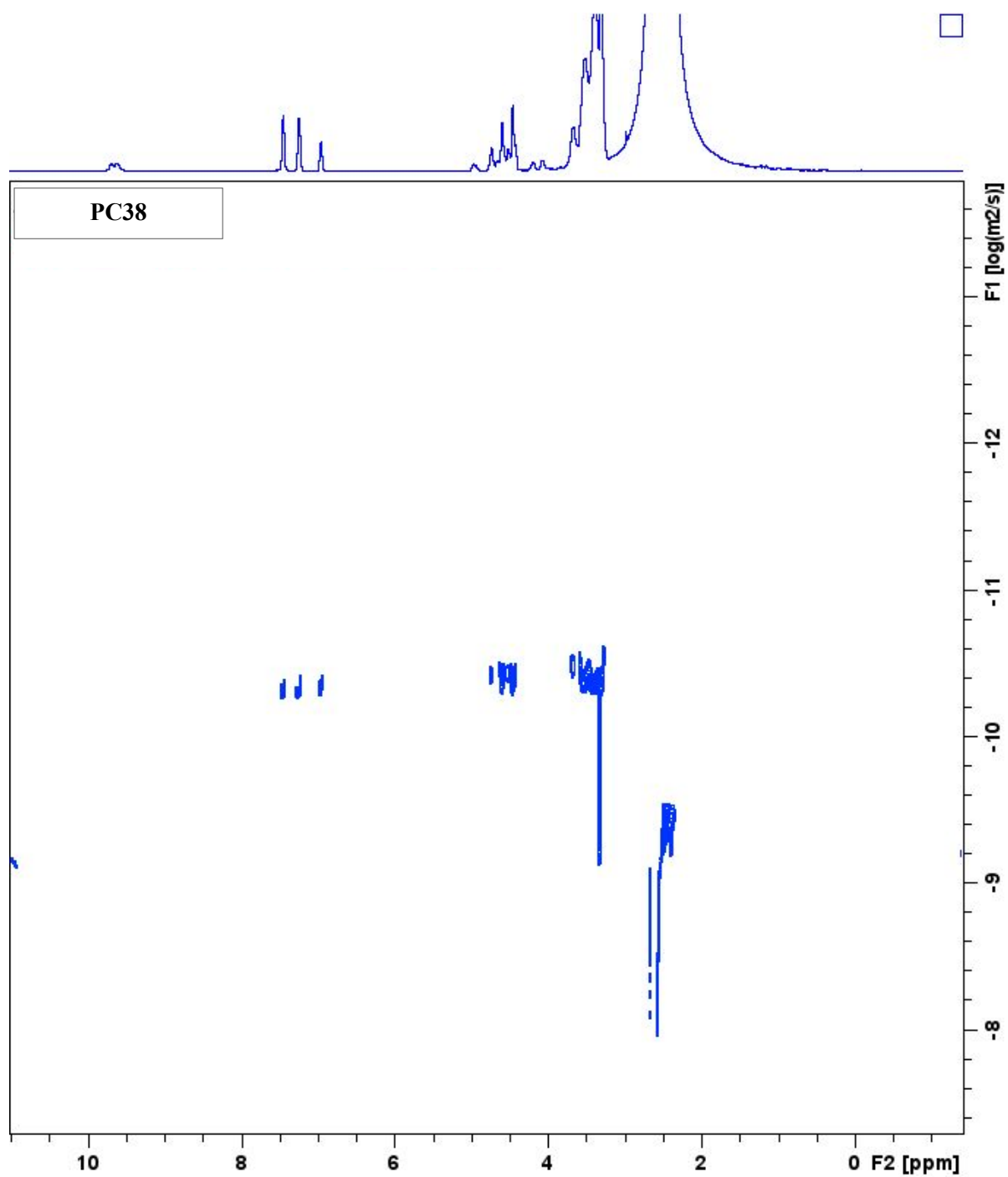


Figure S35. ¹H DOSY NMR spectrum of PC38 recorded in DMSO-d₆.

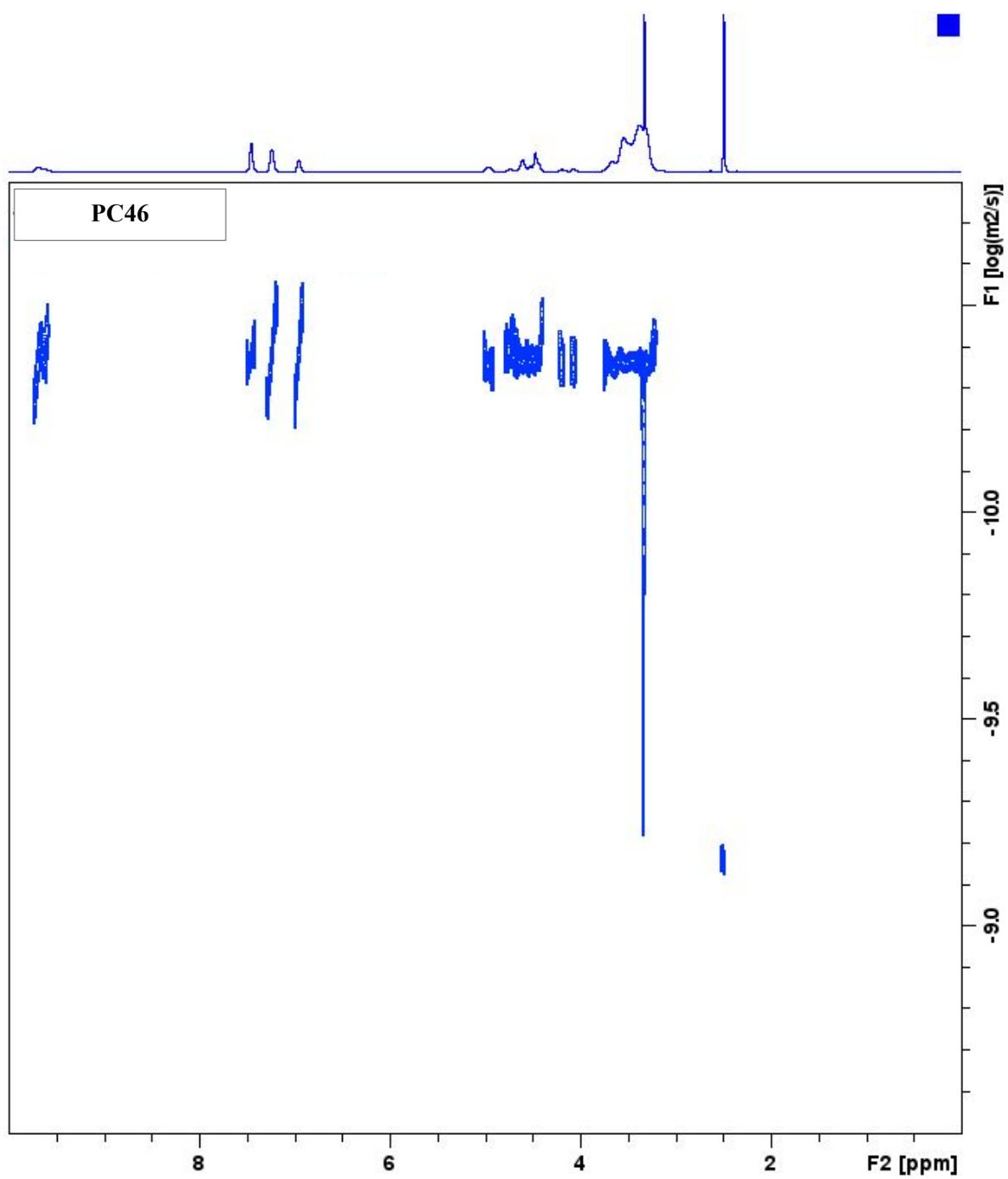


Figure S36. ^1H DOSY NMR spectrum of PC46 recorded in DMSO-d_6 .

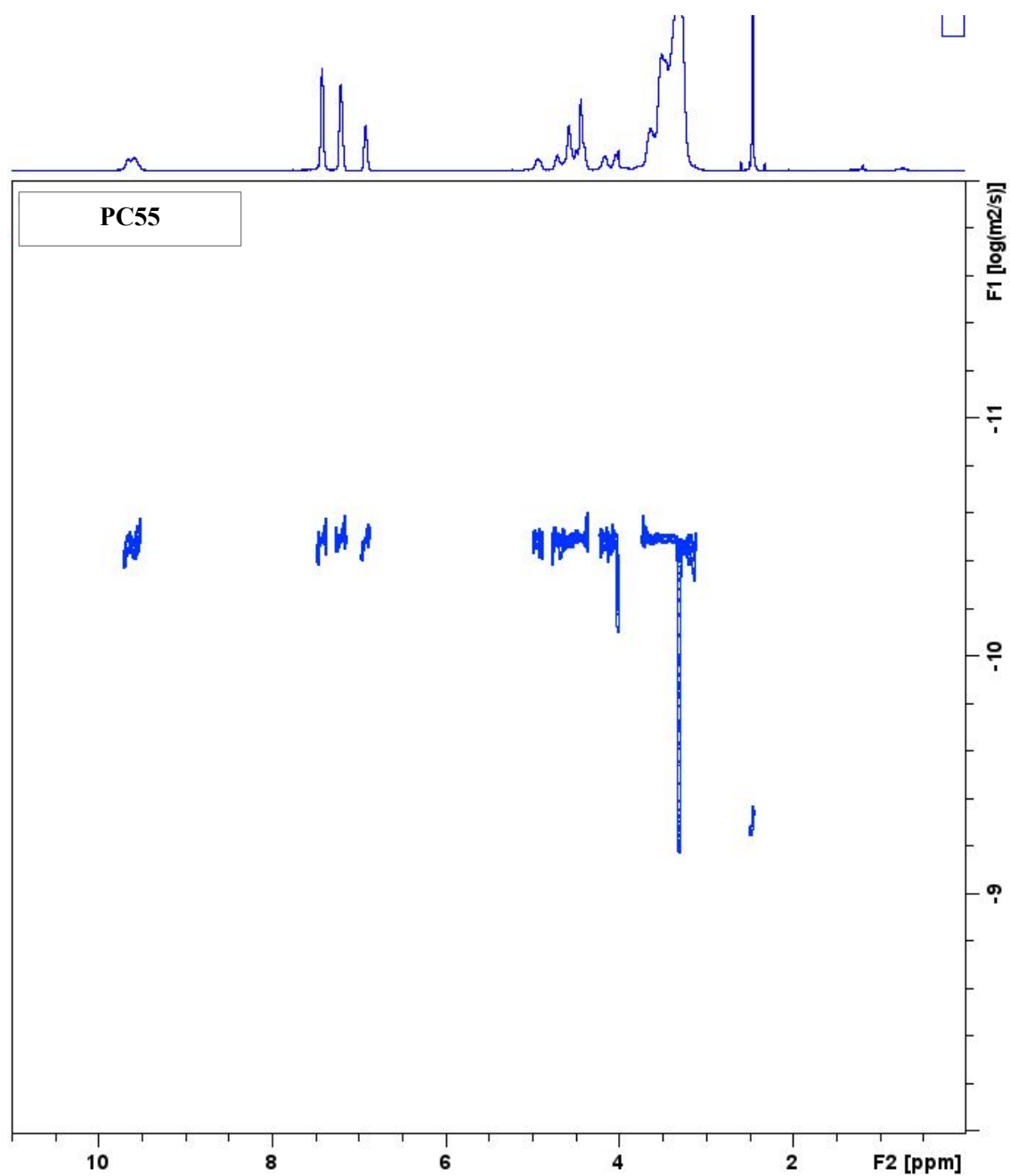


Figure S37. ^1H DOSY NMR spectrum of PC55 recorded in DMSO-d_6 .

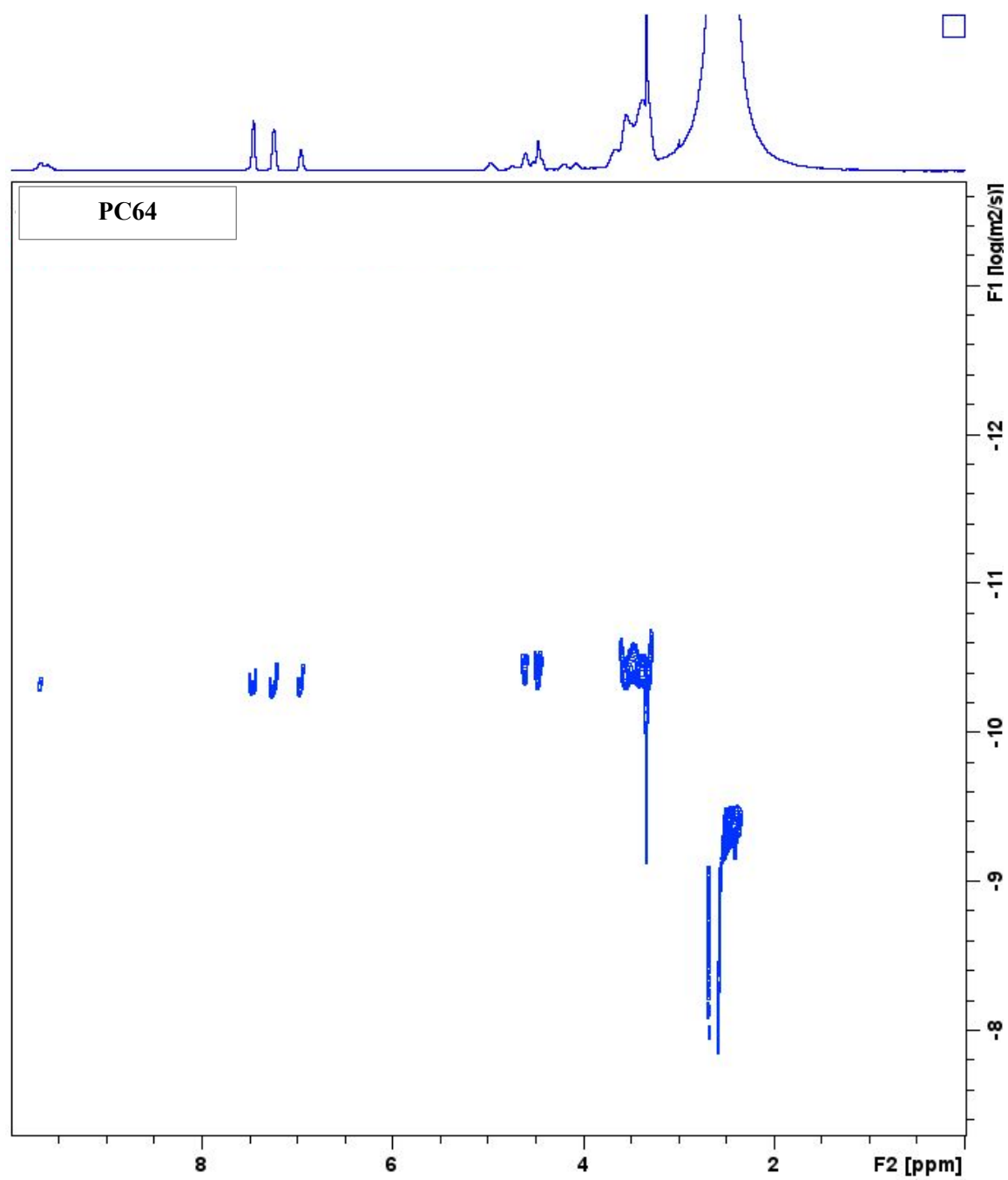


Figure S38. ¹H DOSY NMR spectrum of PC64 recorded in DMSO-d₆.

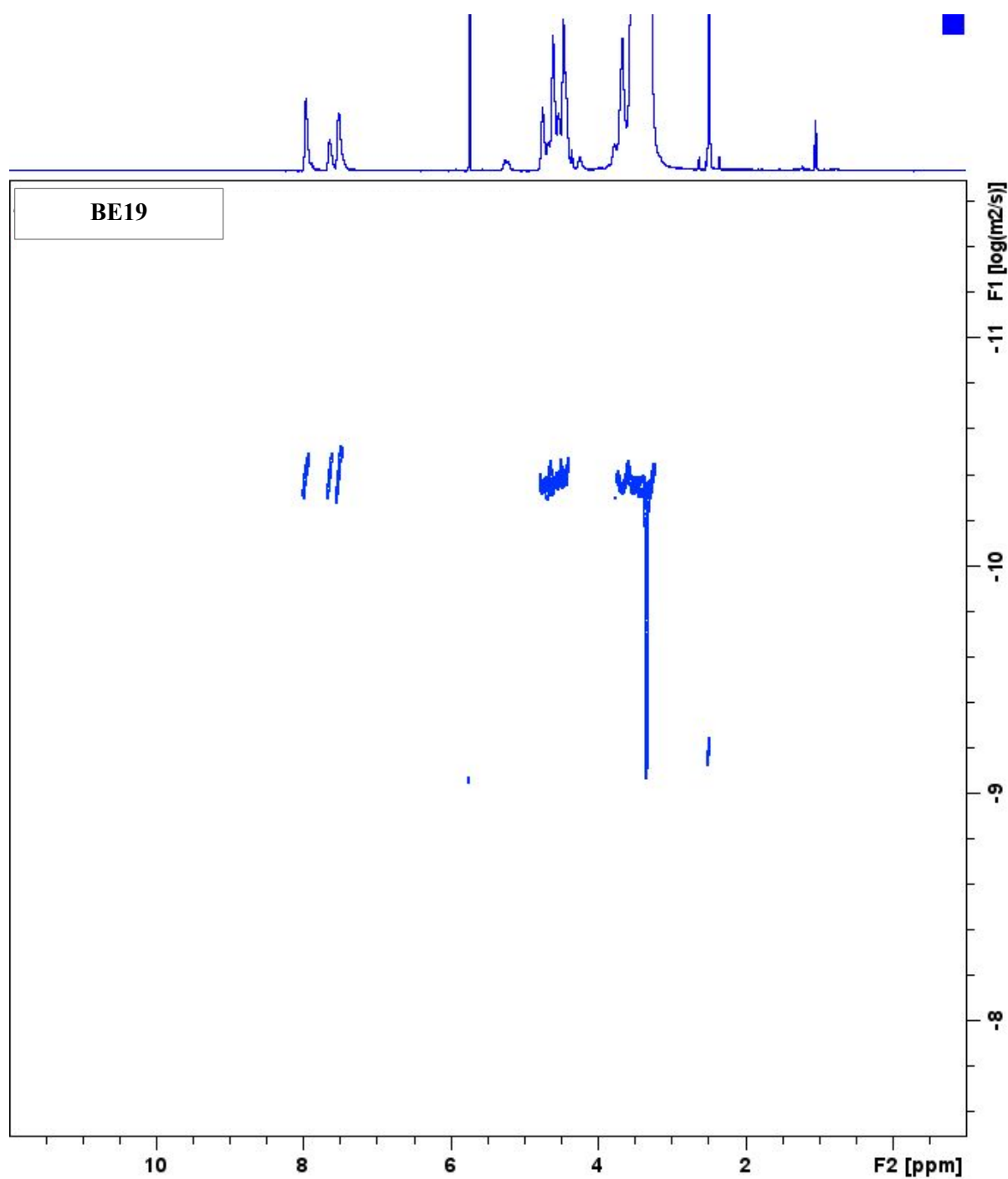


Figure S39. ¹H DOSY NMR spectrum of BE19 recorded in DMSO-d₆.

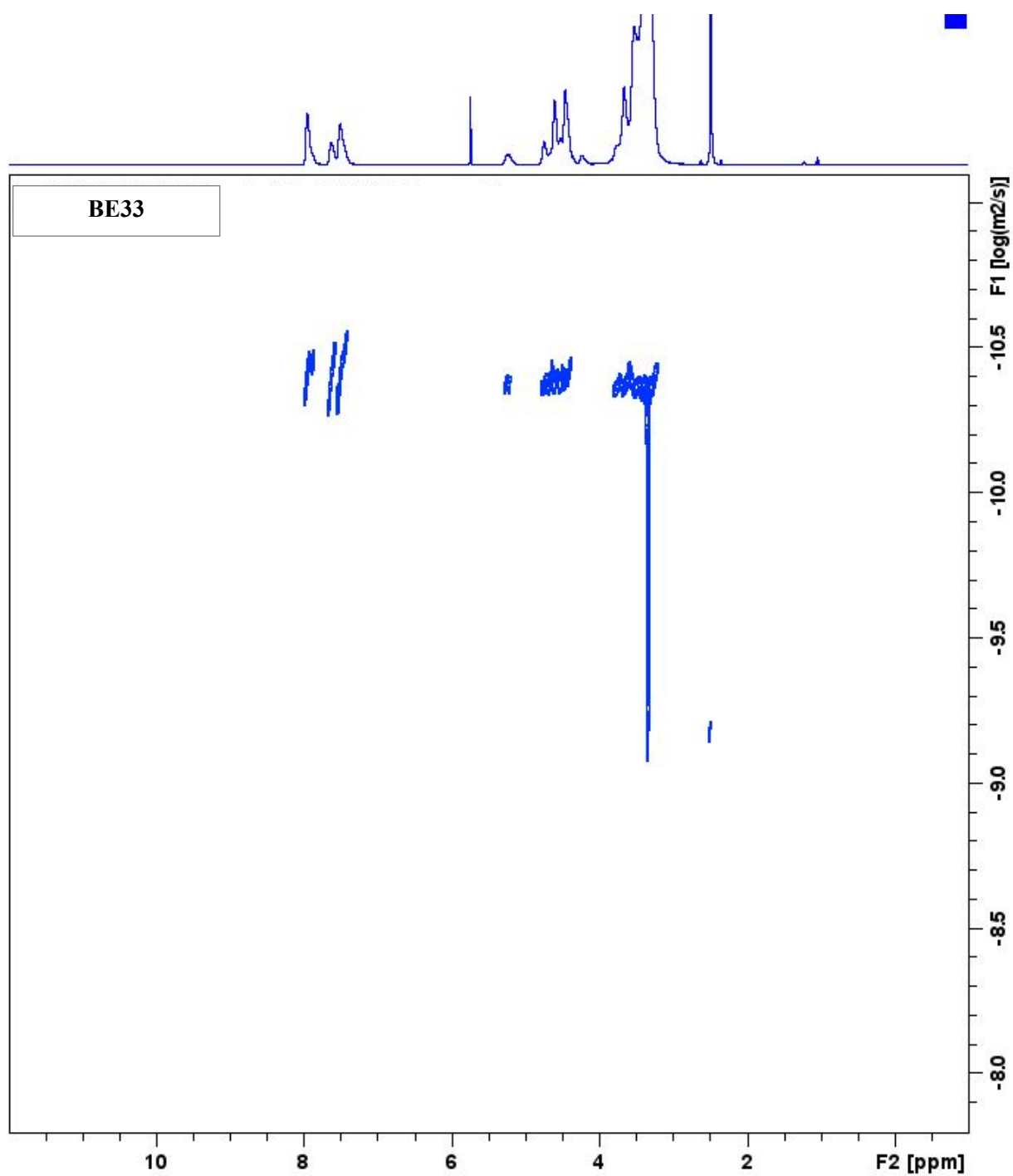


Figure S40. ¹H DOSY NMR spectrum of BE33 recorded in DMSO-d₆.

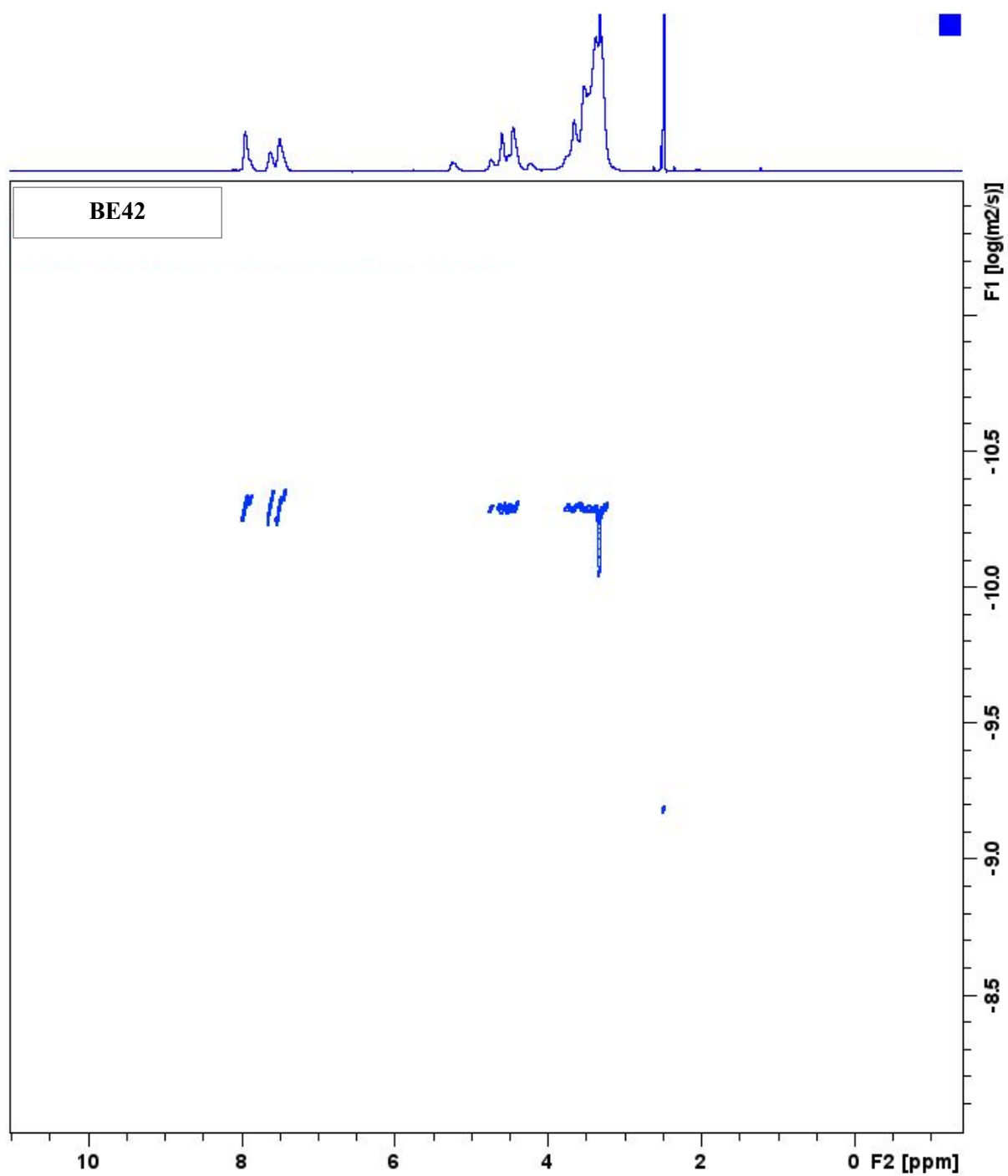


Figure S41. ¹H DOSY NMR spectrum of BE42 recorded in DMSO-d₆.

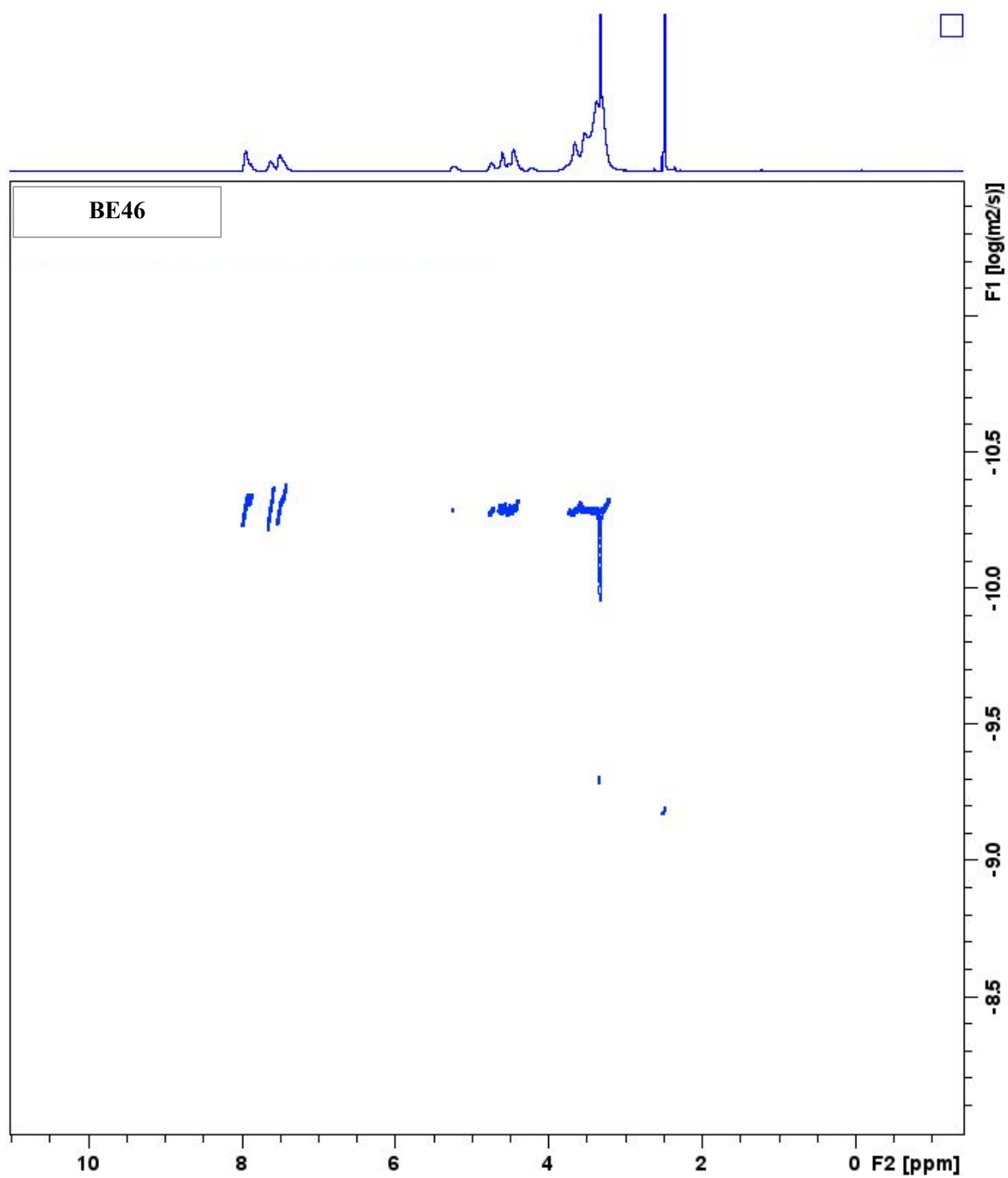


Figure S42. ^1H DOSY NMR spectrum of BE46 recorded in DMSO-d_6 .

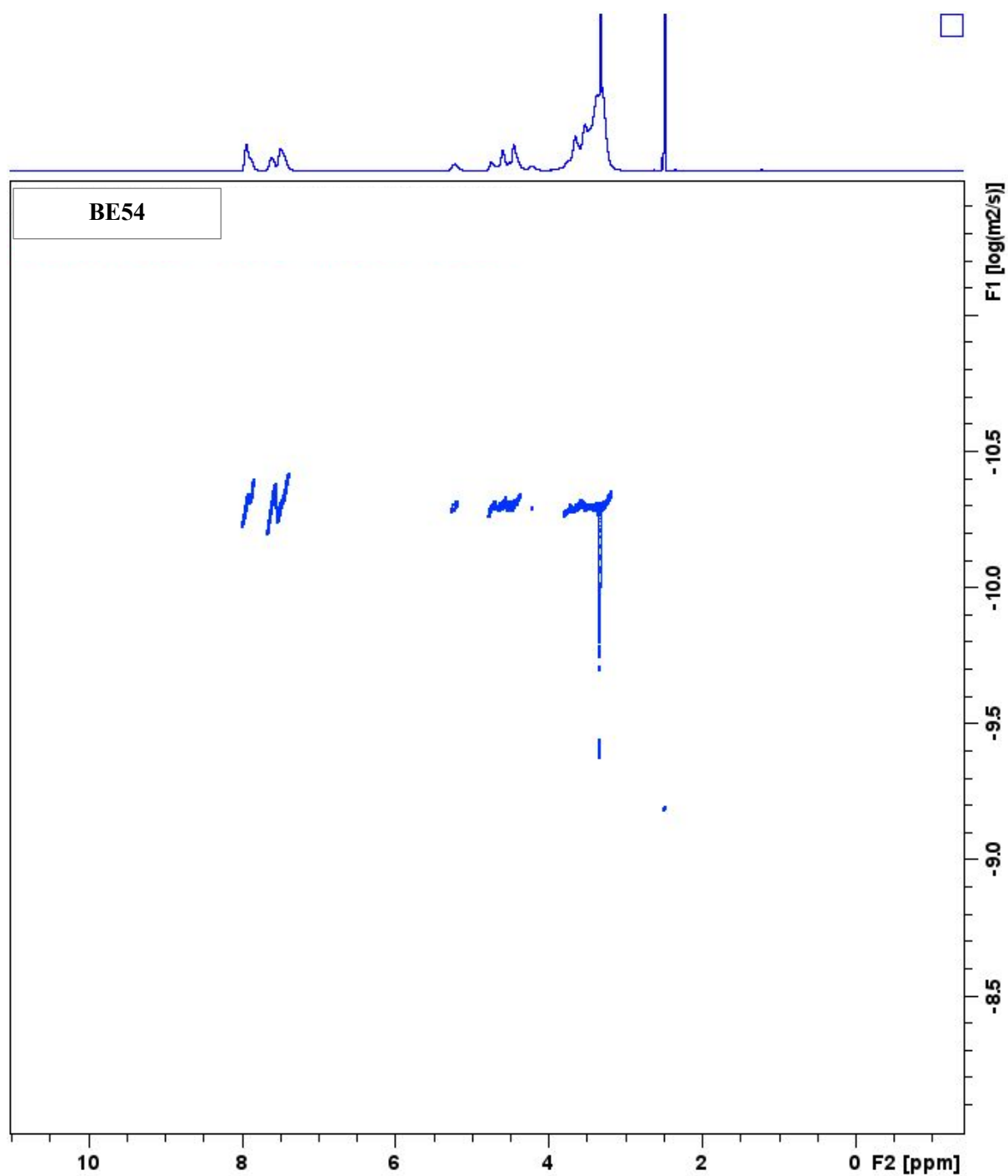


Figure S43. ^1H DOSY NMR spectrum of BE54 recorded in DMSO-d_6 .

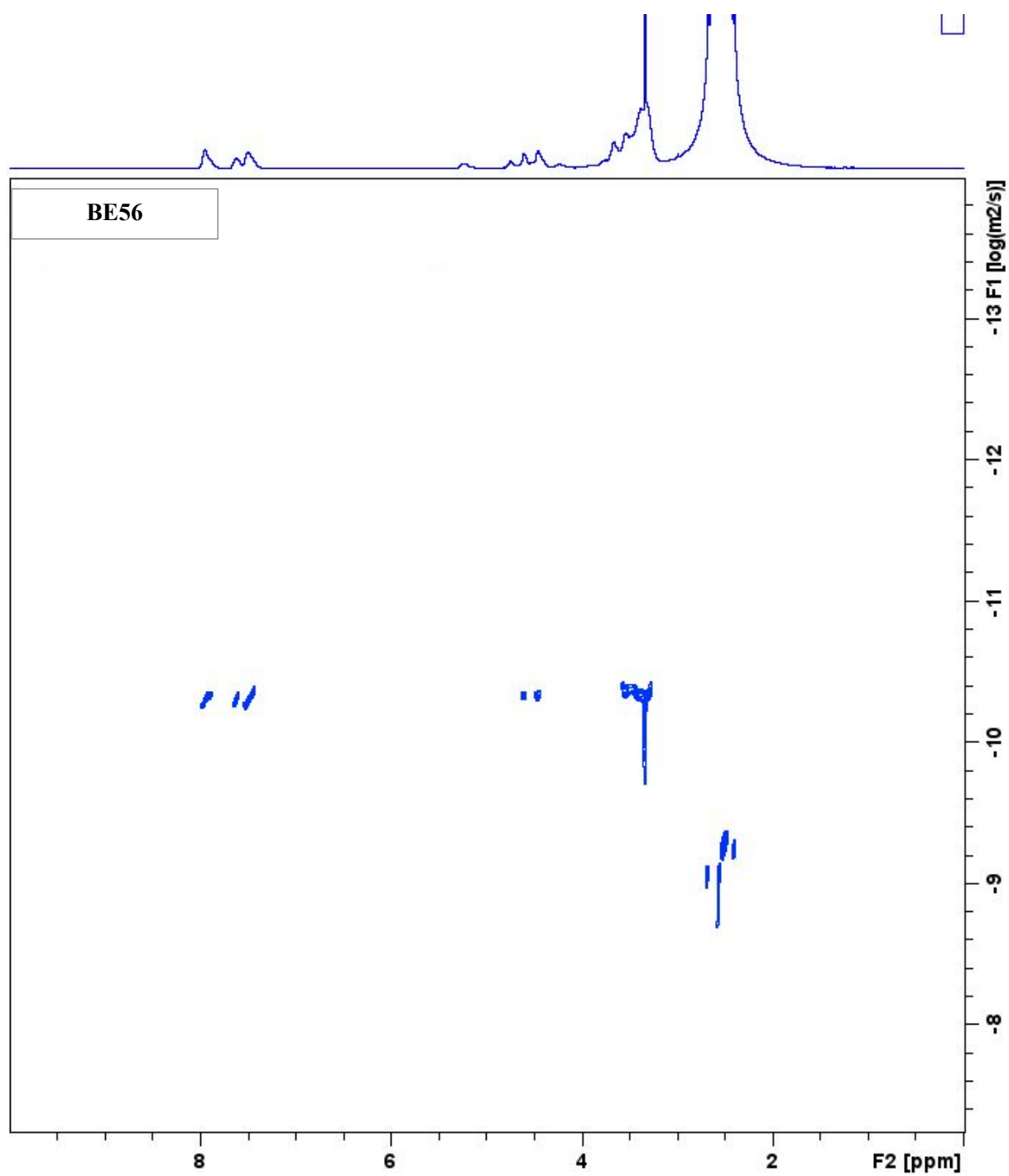


Figure S44. ¹H DOSY NMR spectrum of BE56 recorded in DMSO-d₆.

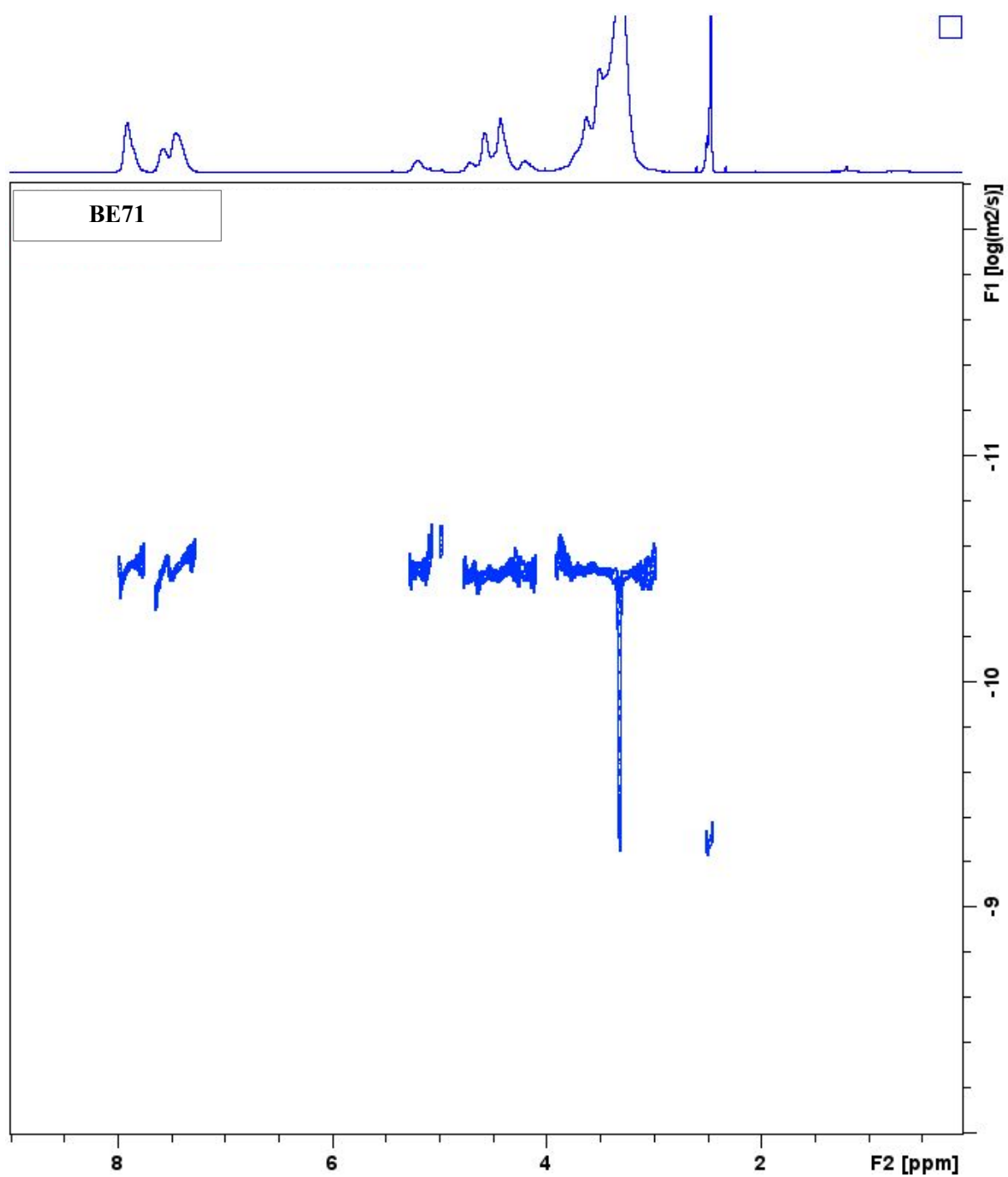


Figure S45. ^1H DOSY NMR spectrum of BE71 recorded in DMSO-d_6 .

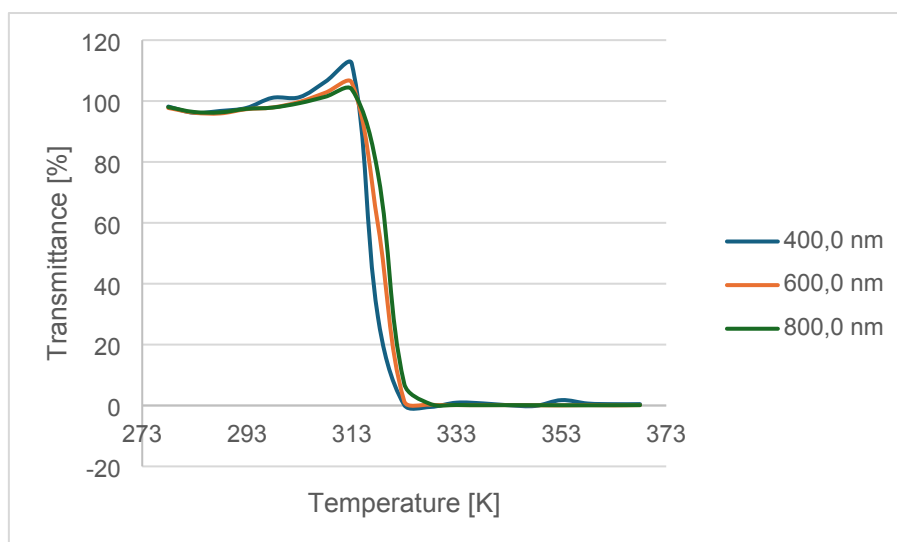


Figure S46. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of PC32 at concentration equal to 50 mg/ml

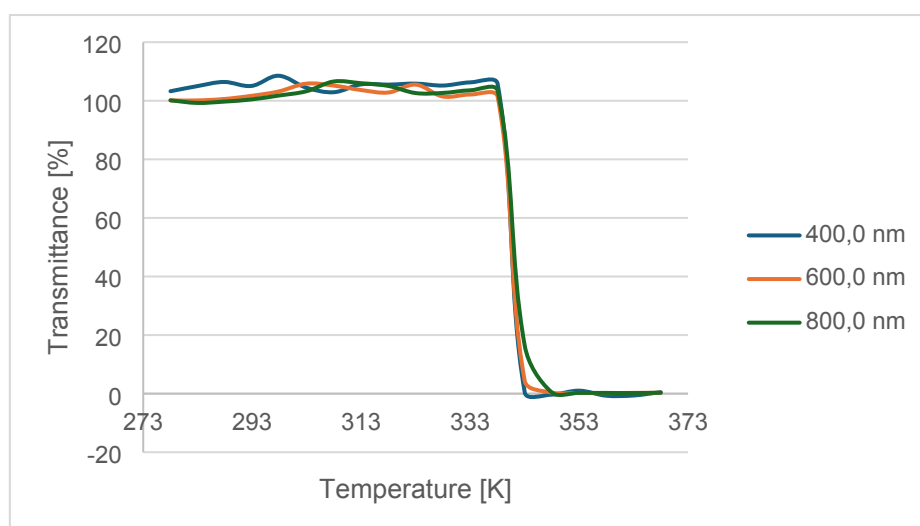


Figure S47. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of PC32 at concentration equal to 100 mg/ml

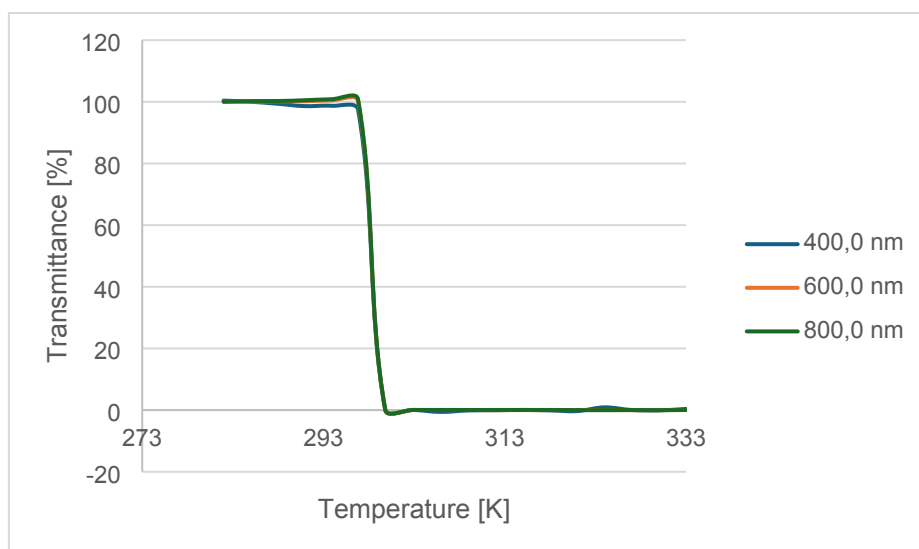


Figure S48. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of PC38 at concentration equal to 50 mg/ml

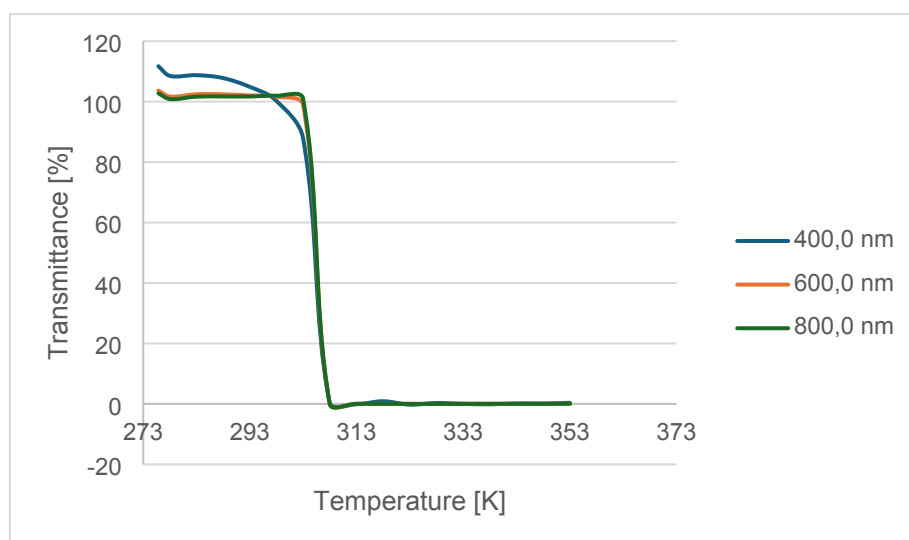


Figure S49. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of PC38 at concentration equal to 100 mg/ml

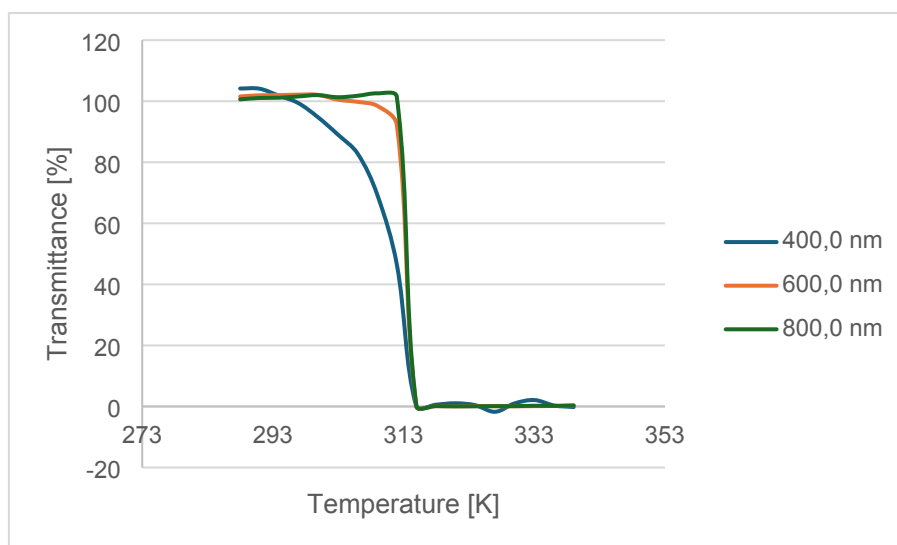


Figure S50. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of PC38 at concentration equal to 150 mg/ml

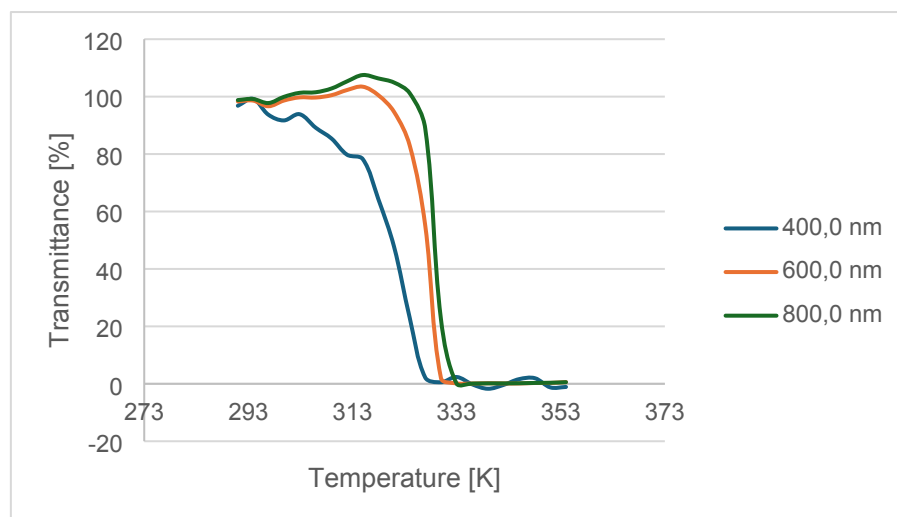


Figure S51. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of PC38 at concentration equal to 275 mg/ml

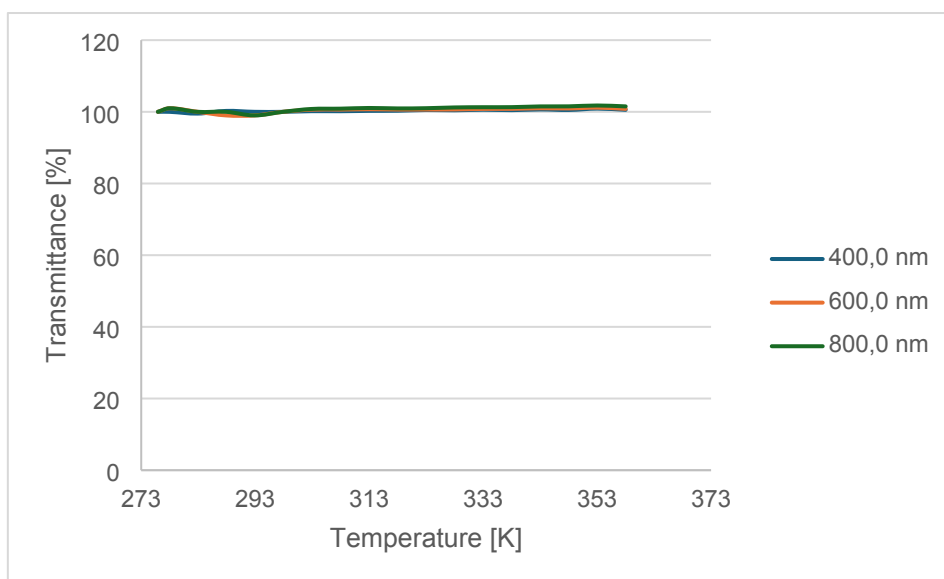


Figure S52. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of PC46 at concentration equal to 0,06mg/ml

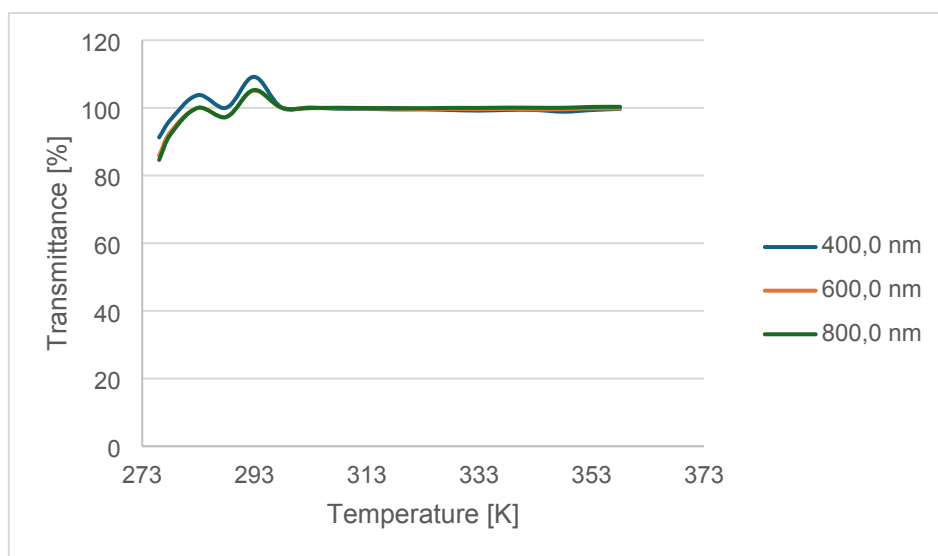


Figure S53. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of PC46 at concentration equal to 0,12mg/ml

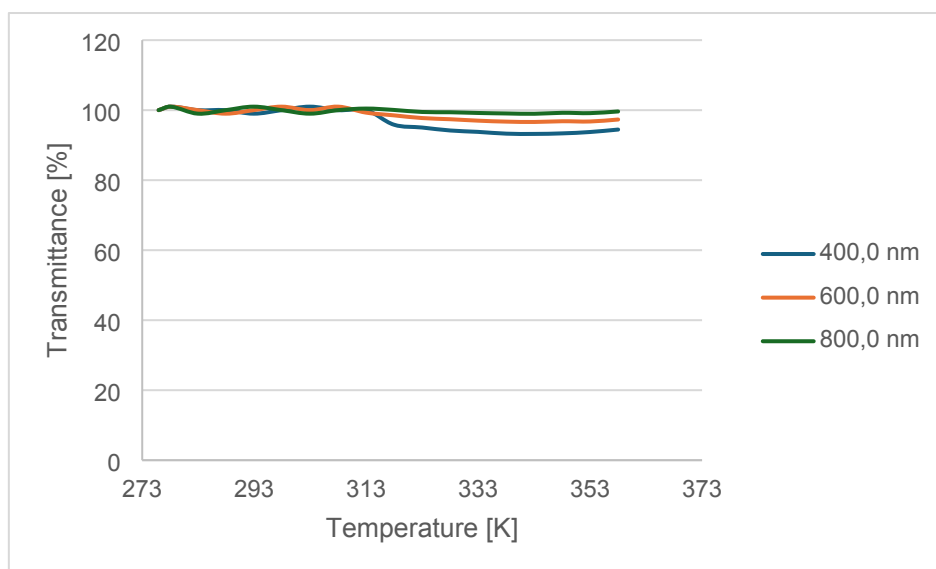


Figure S54. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of PC46 at concentration equal to 0,24mg/ml

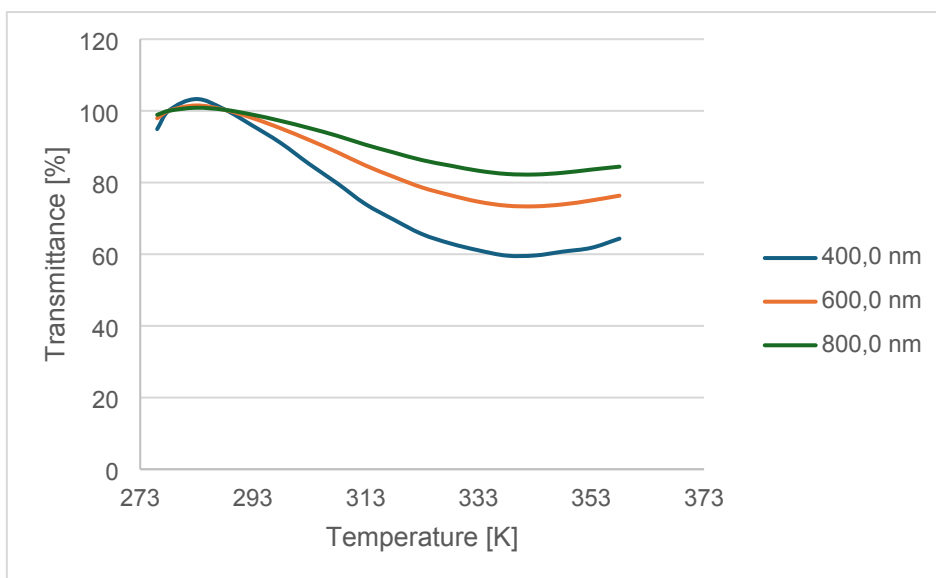


Figure S55. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of PC46 at concentration equal to 0,47mg/ml

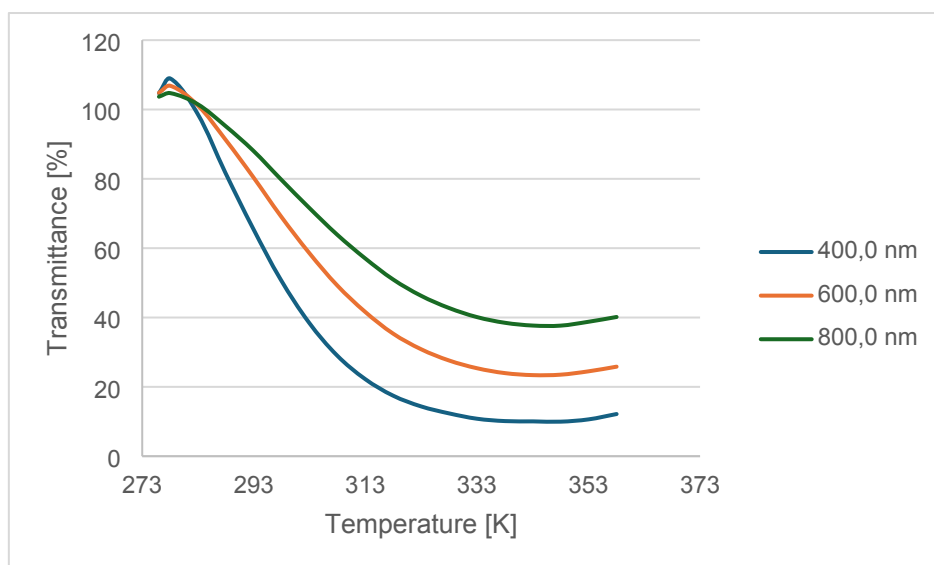


Figure S56. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of PC46 at concentration equal to 0,94mg/ml

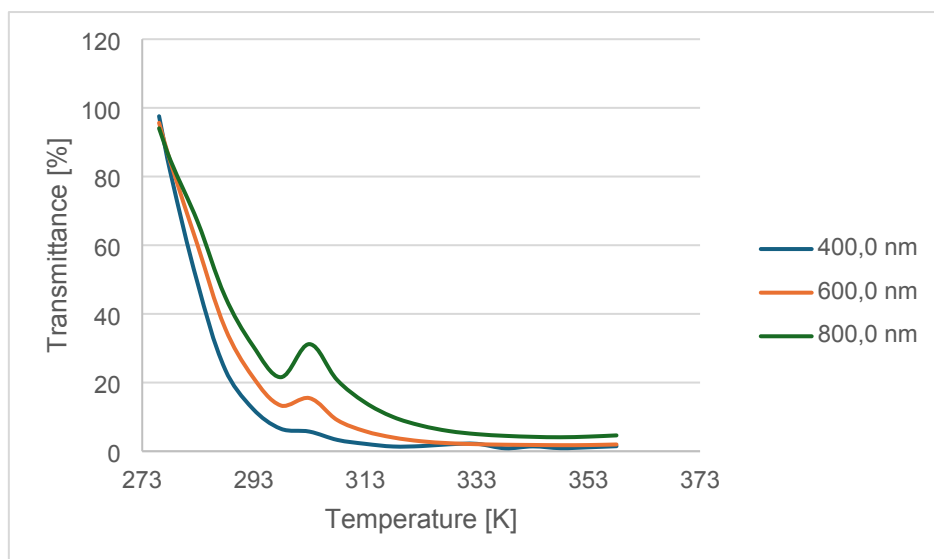


Figure S57. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of PC46 at concentration equal to 1,88mg/ml

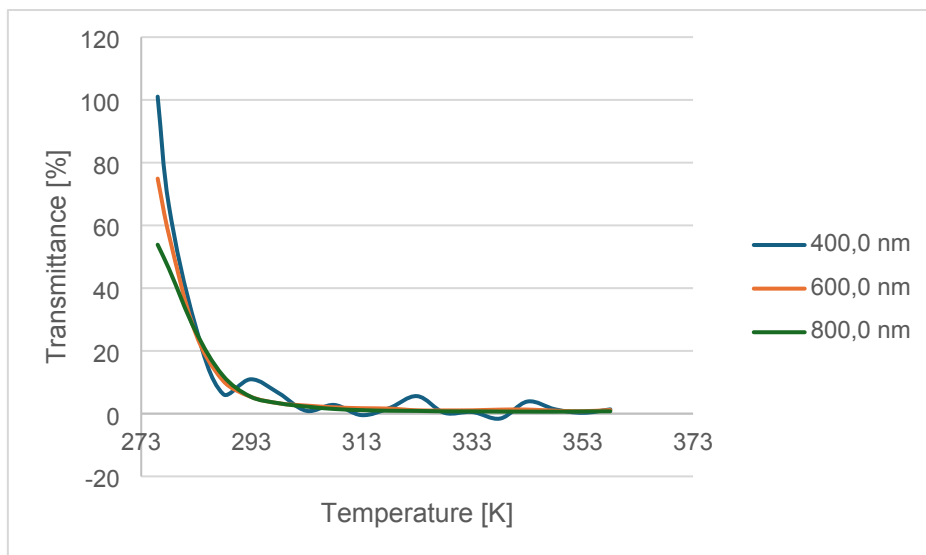


Figure S58. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of PC46 at concentration equal to 3,75mg/ml

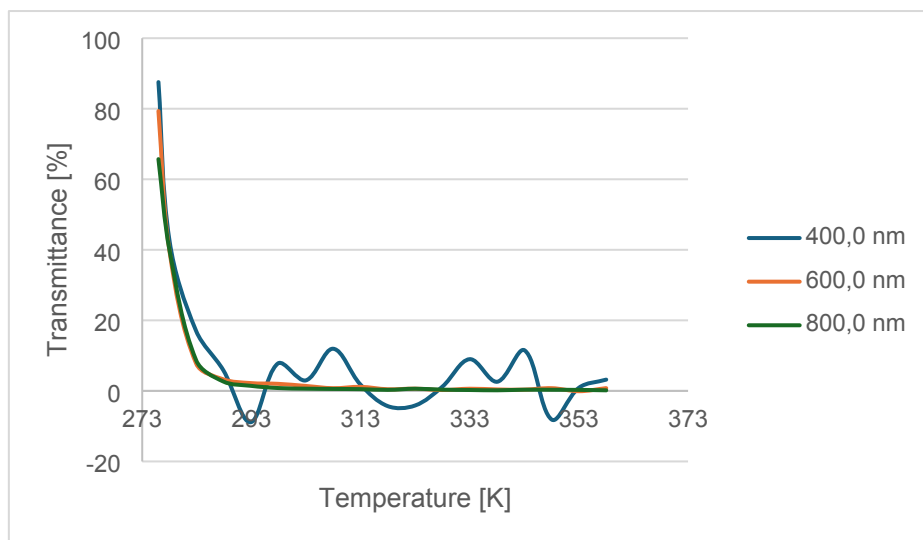


Figure S59. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of PC46 at concentration equal to 7,5mg/ml

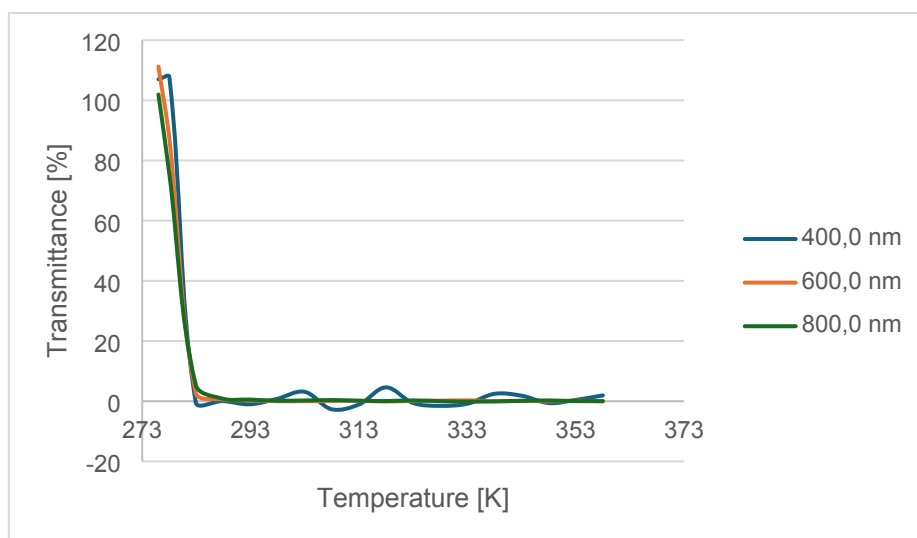


Figure S60. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of PC46 at concentration equal to 15mg/ml

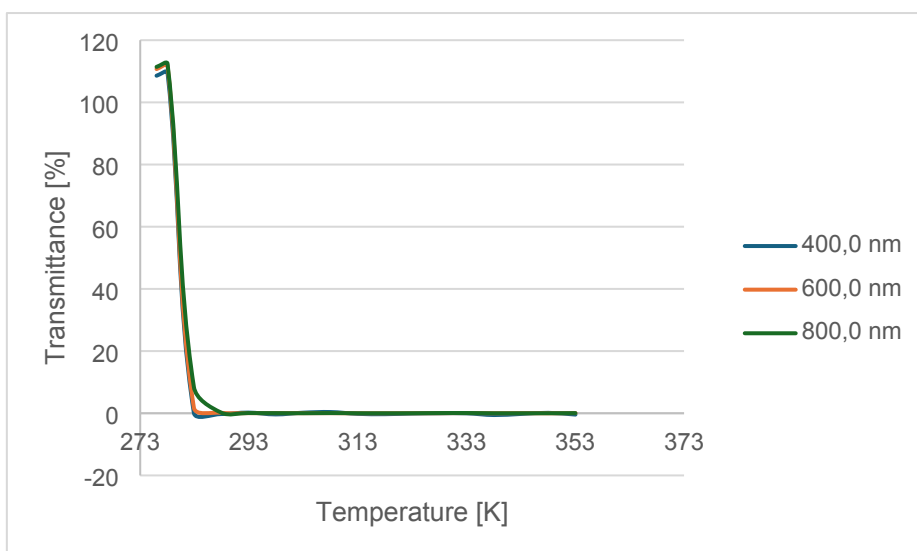


Figure S61. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of PC46 at concentration equal to 25mg/ml

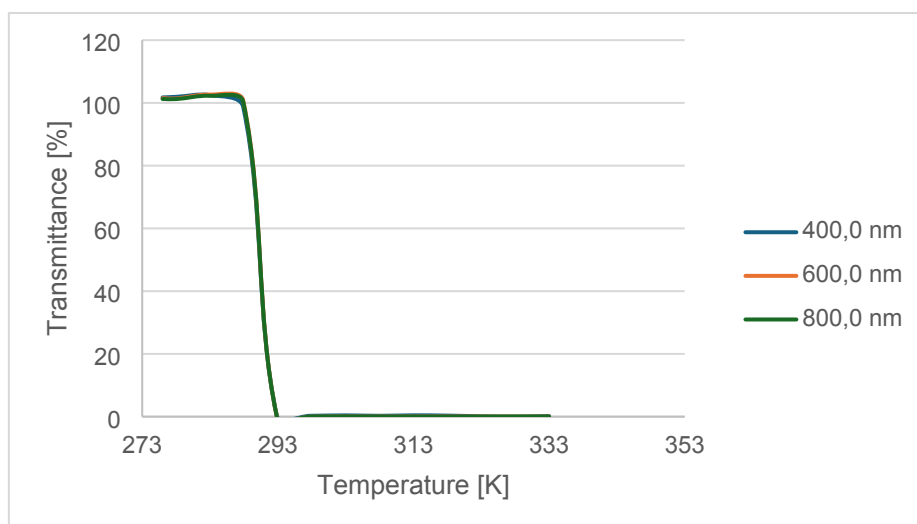


Figure S62. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of PC46 at concentration equal to 50mg/ml

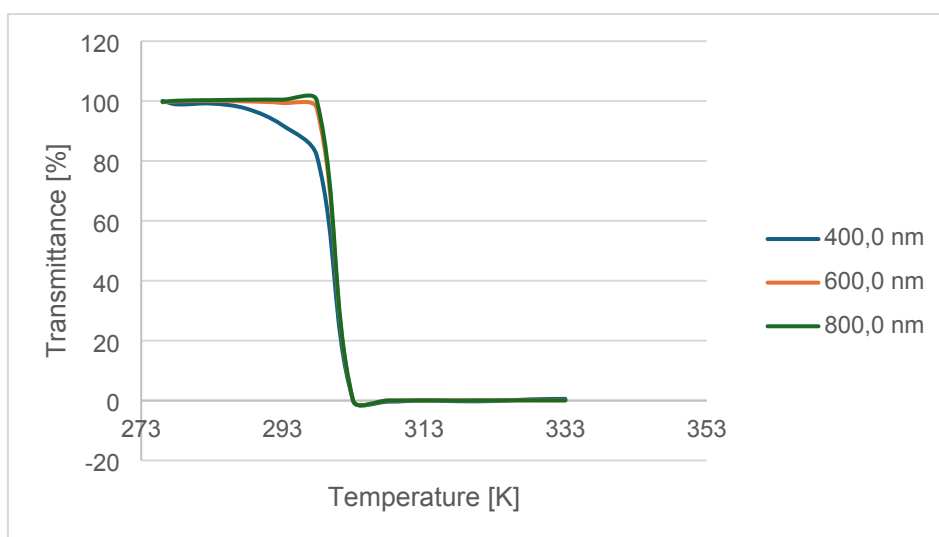


Figure S63. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of PC46 at concentration equal to 100mg/ml

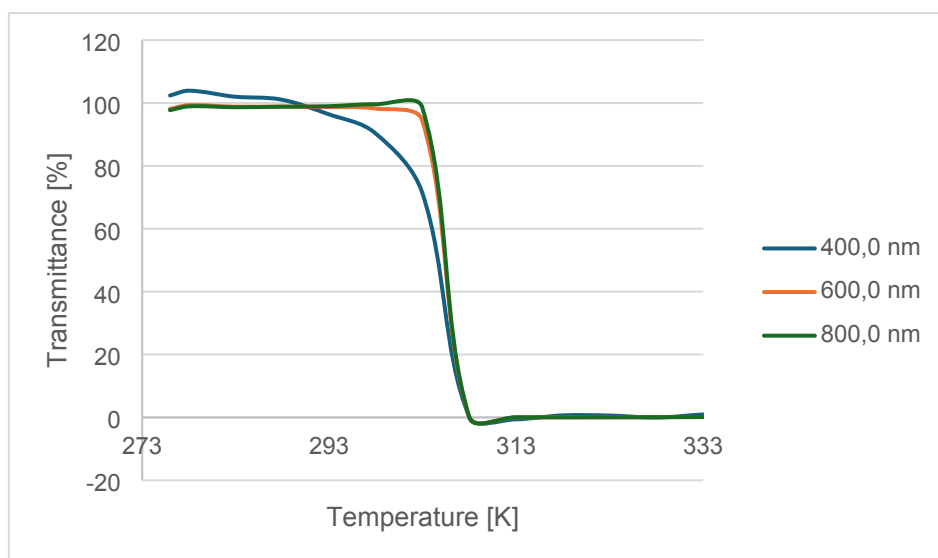


Figure S64. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of PC46 at concentration equal to 150mg/ml

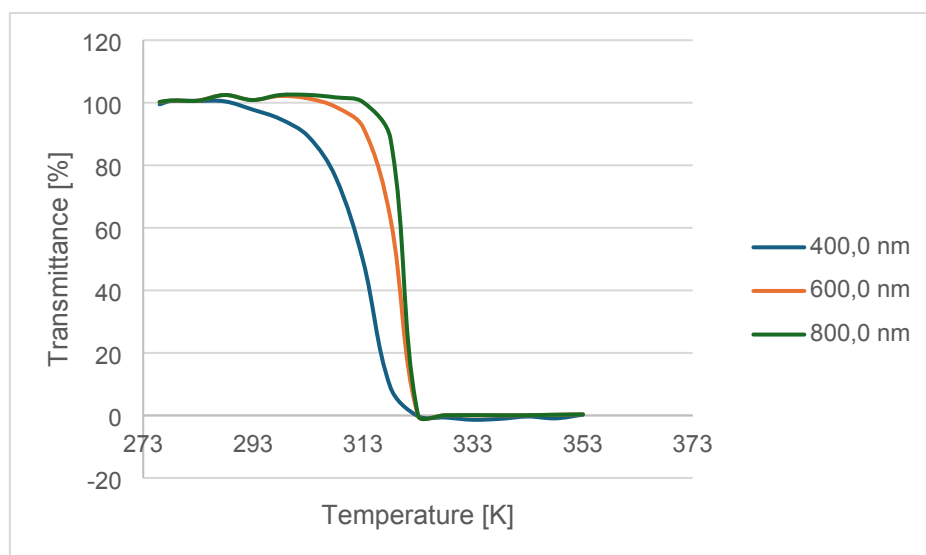


Figure S65. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of PC46 at concentration equal to 275 mg/ml

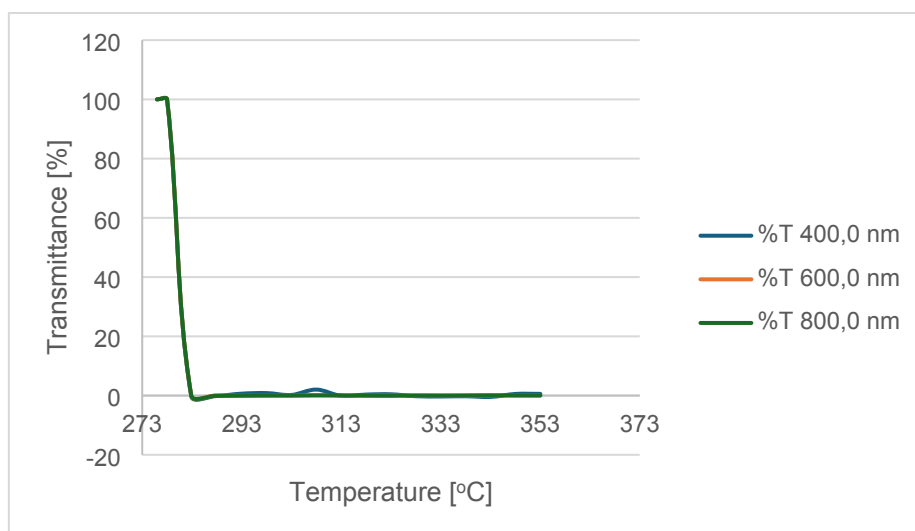


Figure S66. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of PC55 at concentration equal to 50 mg/ml

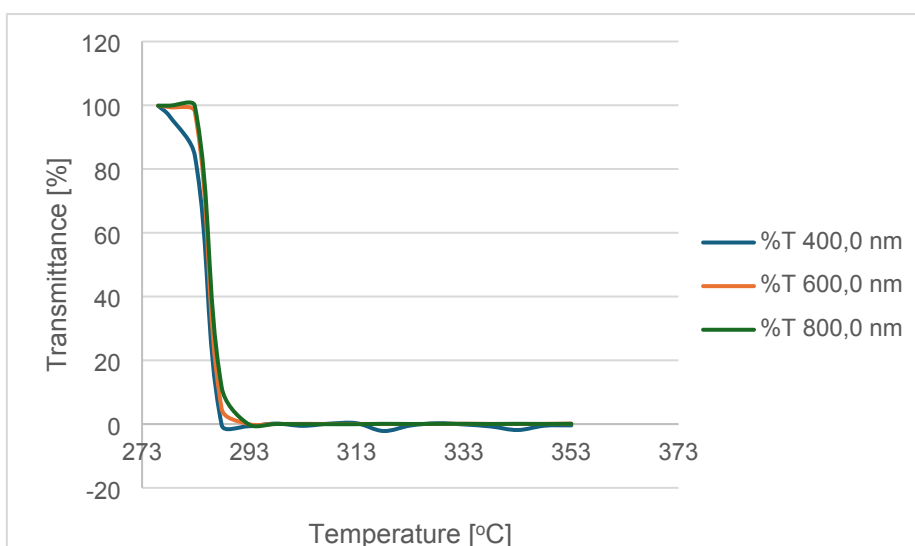


Figure S67. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of PC55 at concentration equal to 100 mg/ml

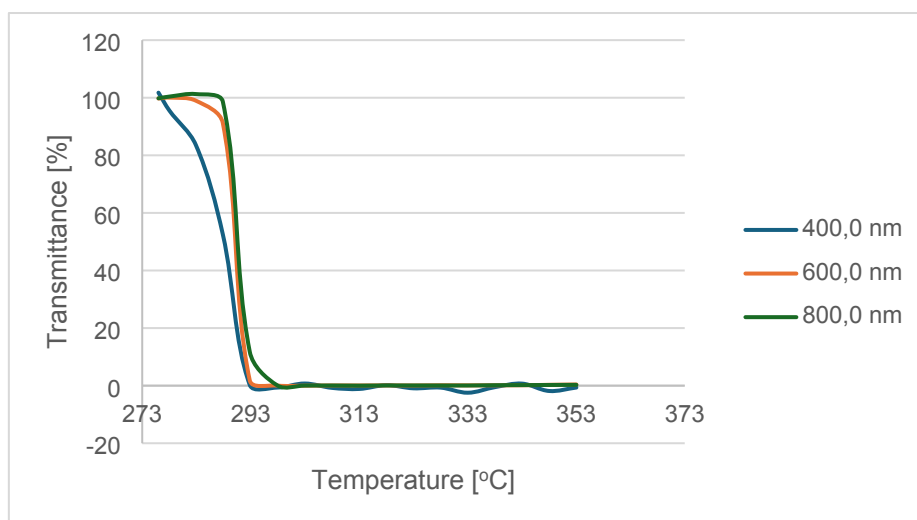


Figure S68. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of PC55 at concentration equal to 150 mg/ml

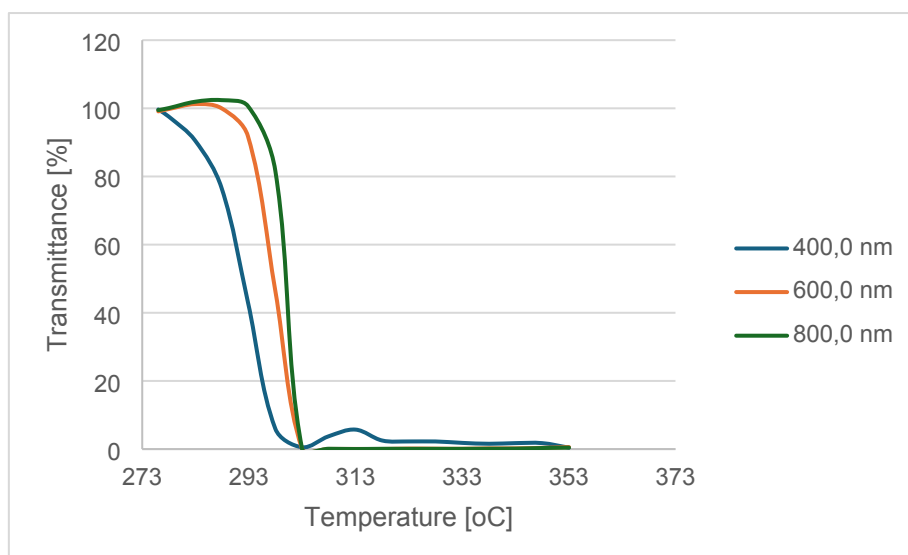


Figure S69. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of PC55 at concentration equal to 275 mg/ml

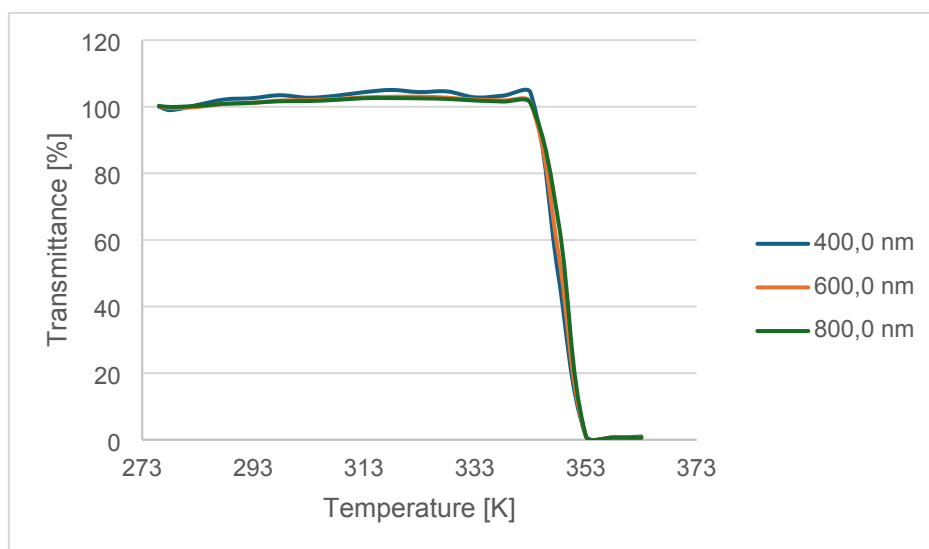


Figure S70. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of BE42 at concentration equal to 50 mg/ml

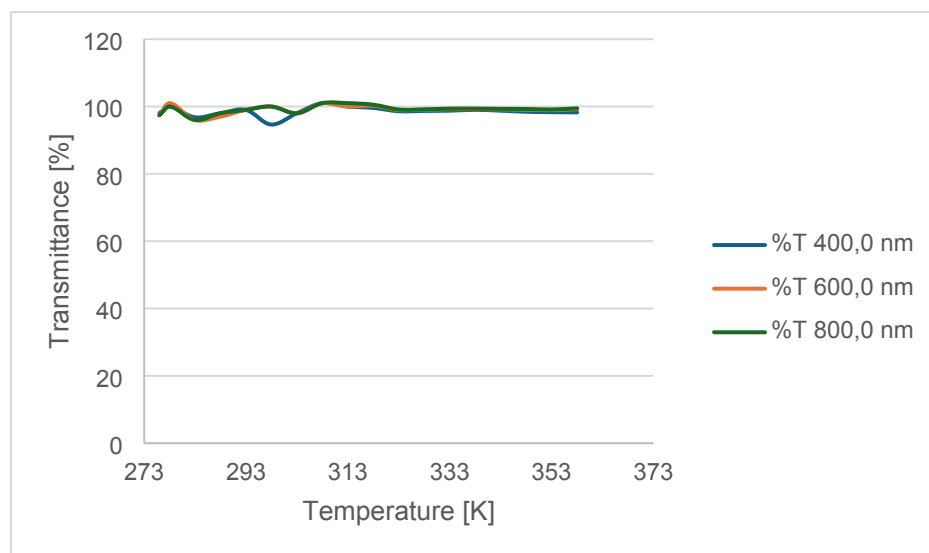


Figure S71. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of BE46 at concentration equal to 0,12mg/ml

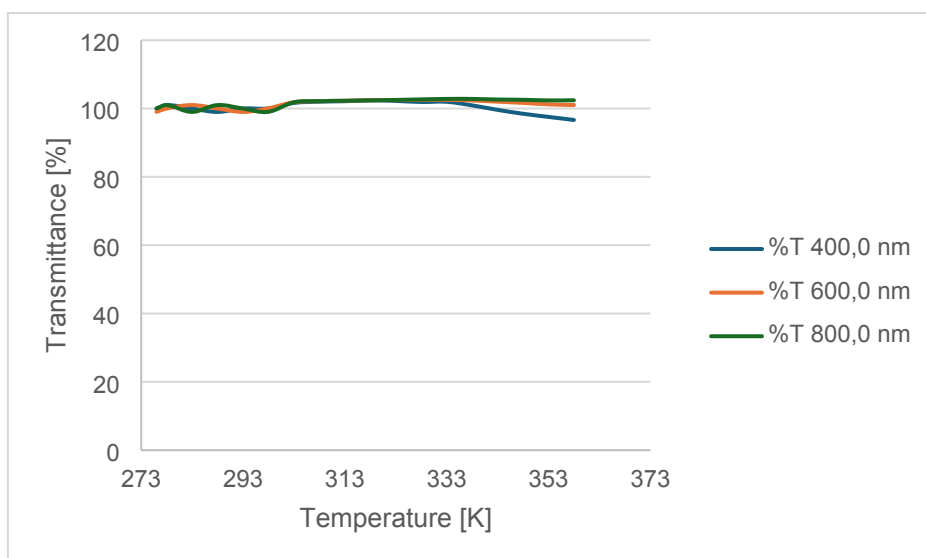


Figure S72. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of BE46 at concentration equal to 0,24mg/ml

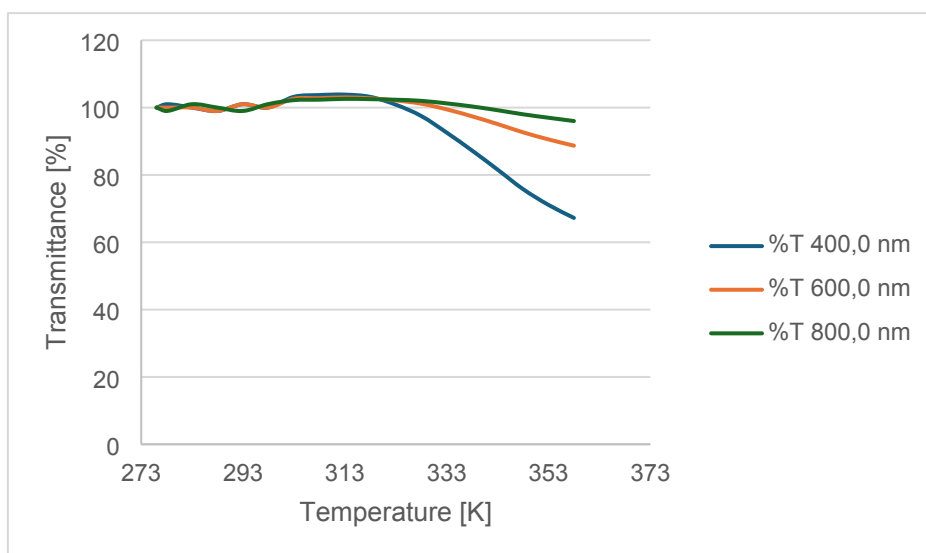


Figure S73. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of BE46 at concentration equal to 0,47mg/ml

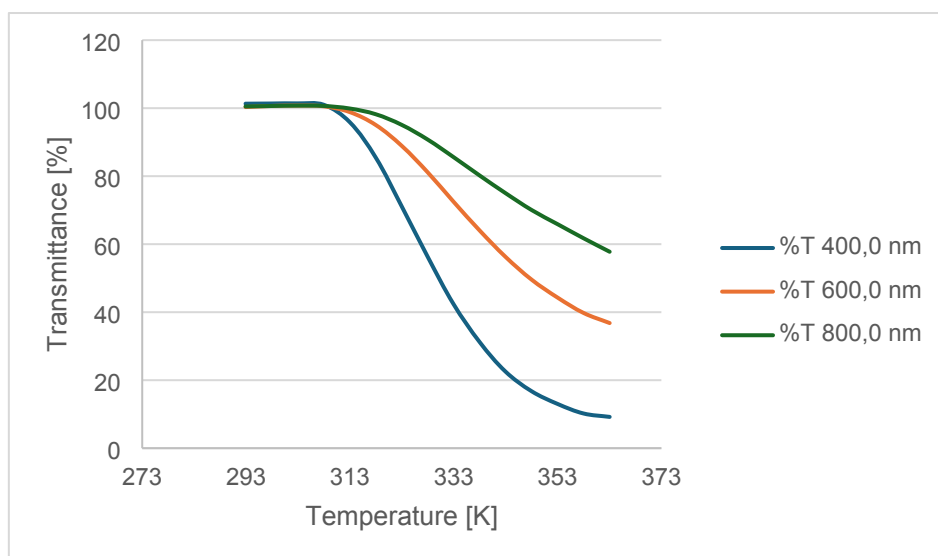


Figure S74. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of BE46 at concentration equal to 0,94mg/ml

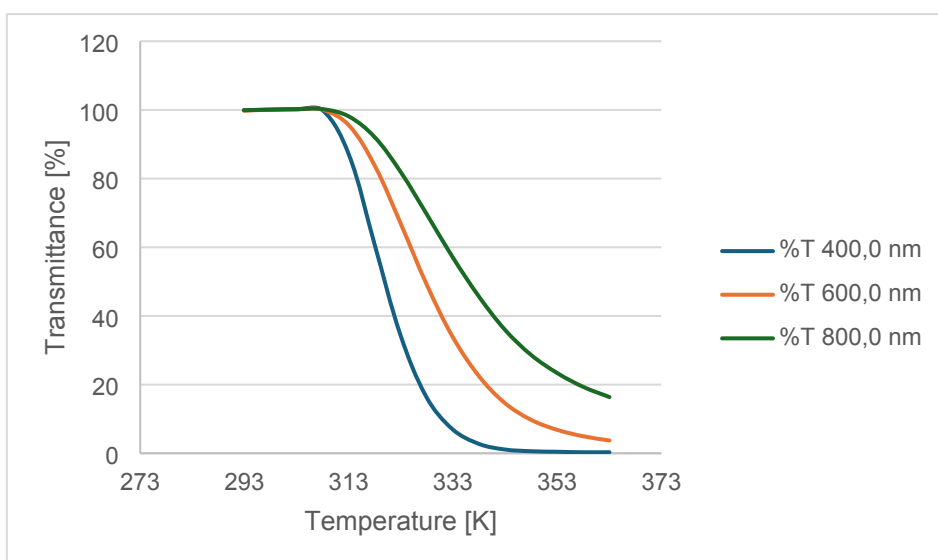


Figure S75. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of BE46 at concentration equal to 1,88mg/ml

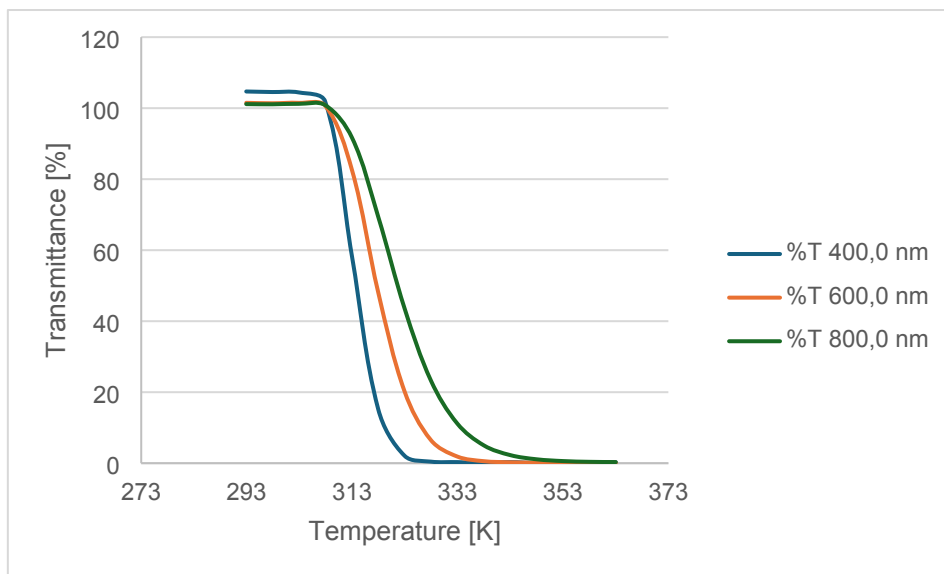


Figure S76. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of BE46 at concentration equal to 3,75mg/ml

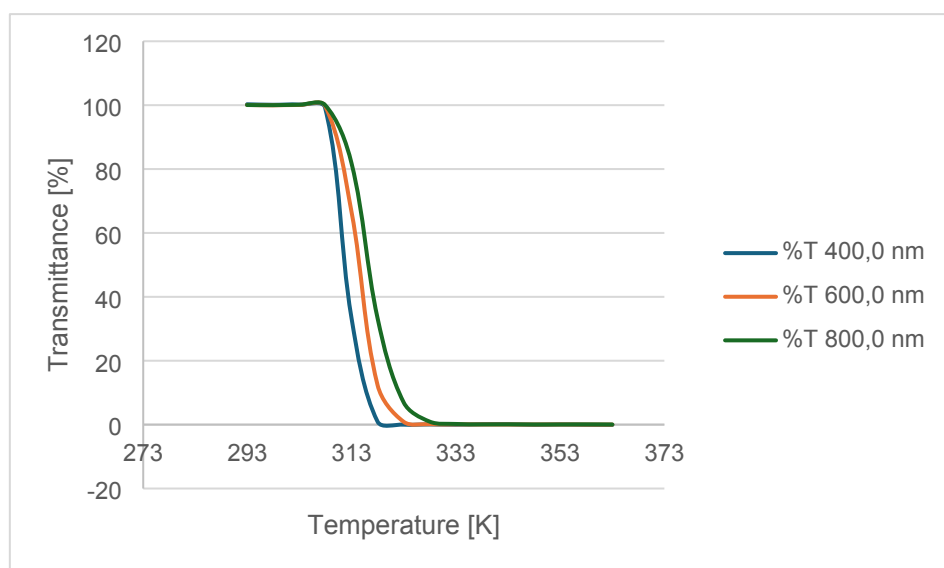


Figure S77. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of BE46 at concentration equal to 7,5mg/ml

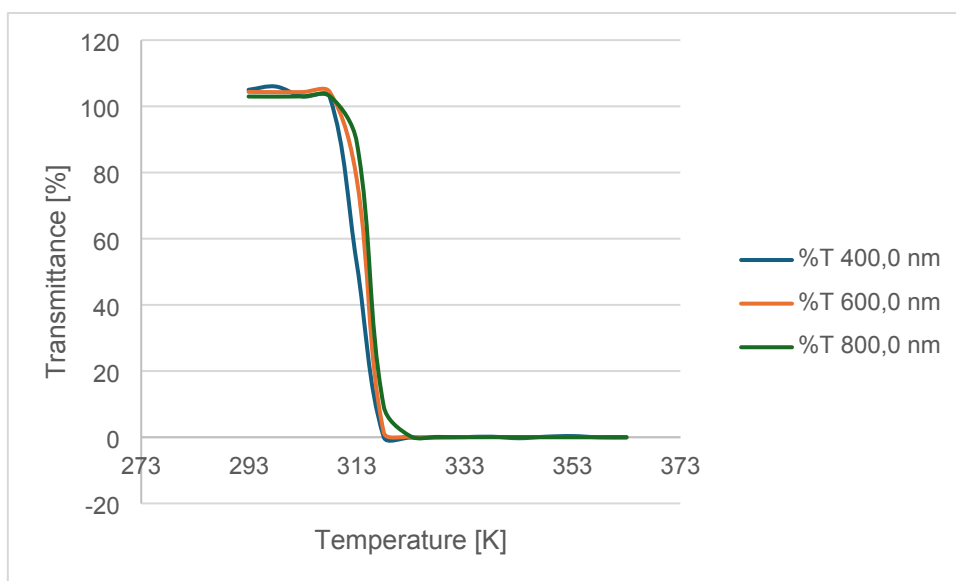


Figure S78. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of BE46 at concentration equal to 15mg/ml

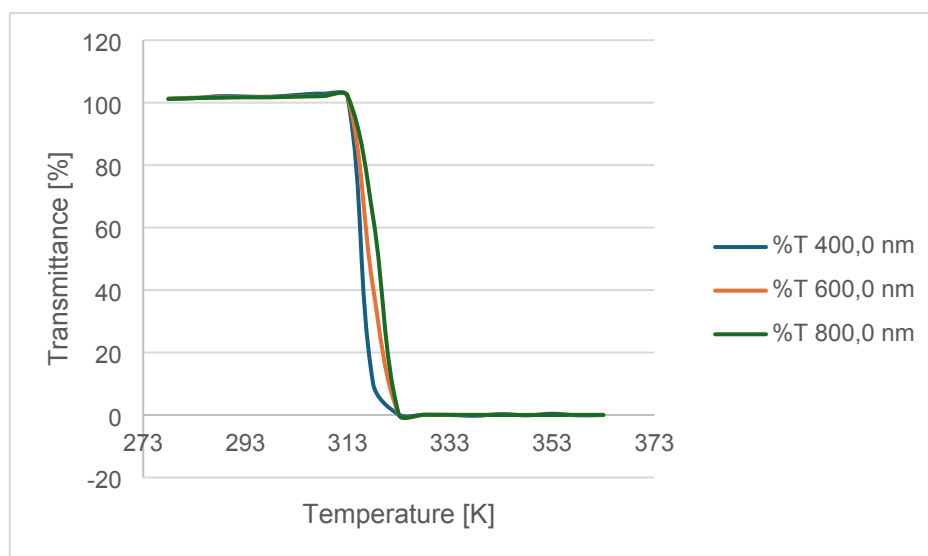


Figure S79. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of BE46 at concentration equal to 25mg/ml

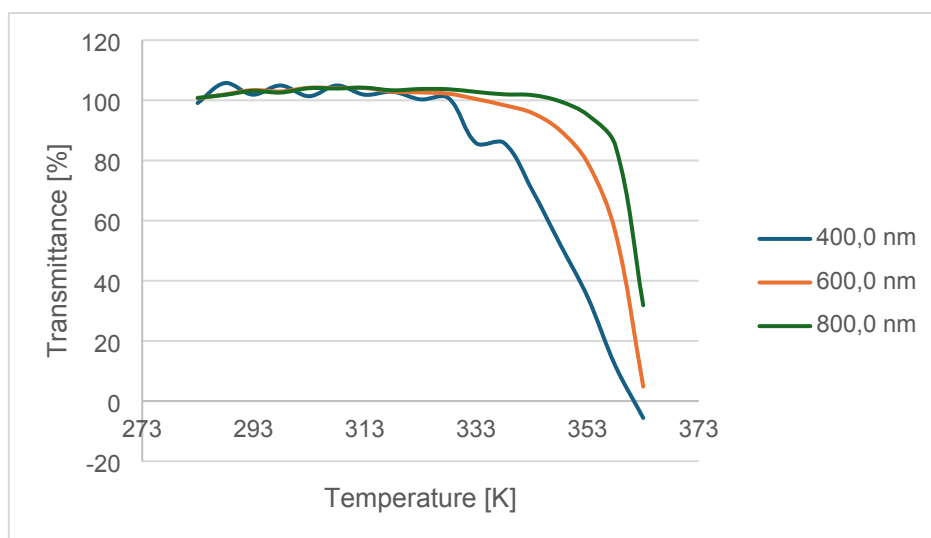


Figure S80. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of BE46 at concentration equal to 50 mg/ml

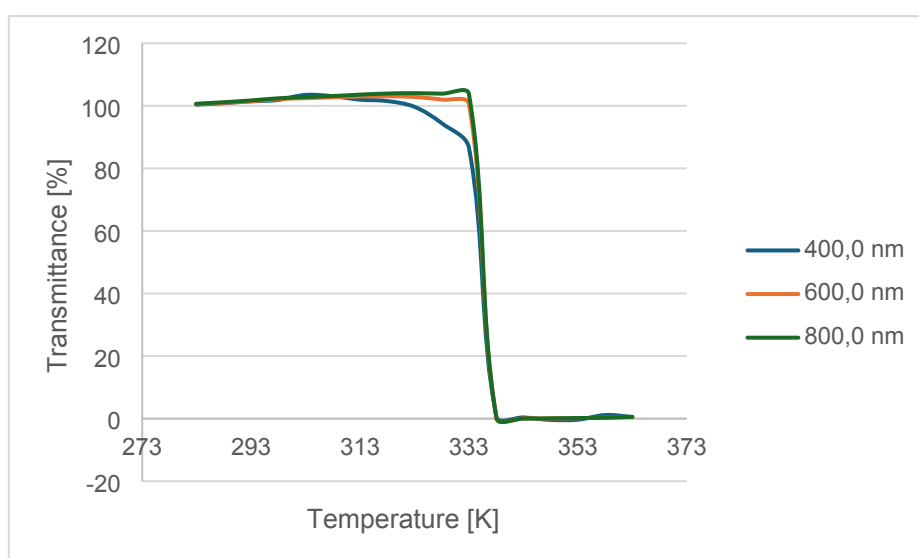


Figure S81. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of BE46 at concentration equal to 100 mg/ml

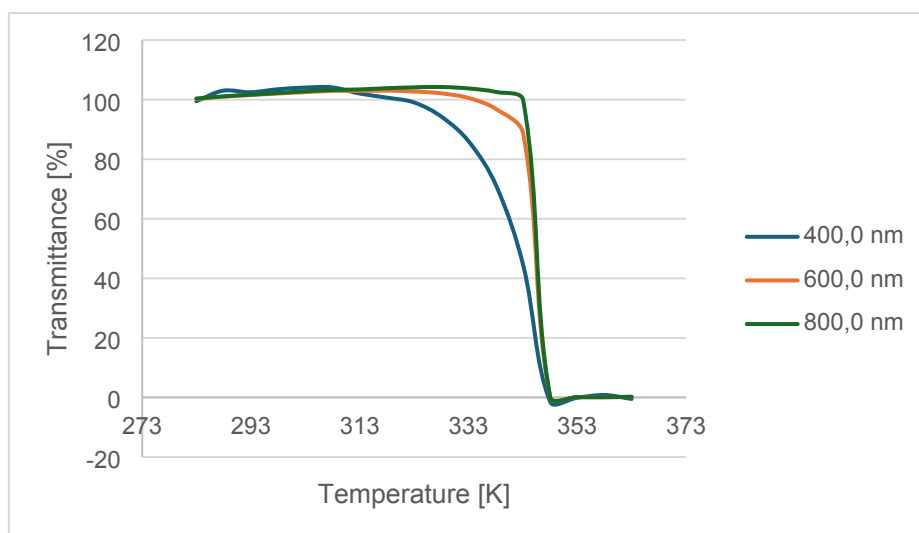


Figure S82. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of BE46 at concentration equal to 150 mg/ml

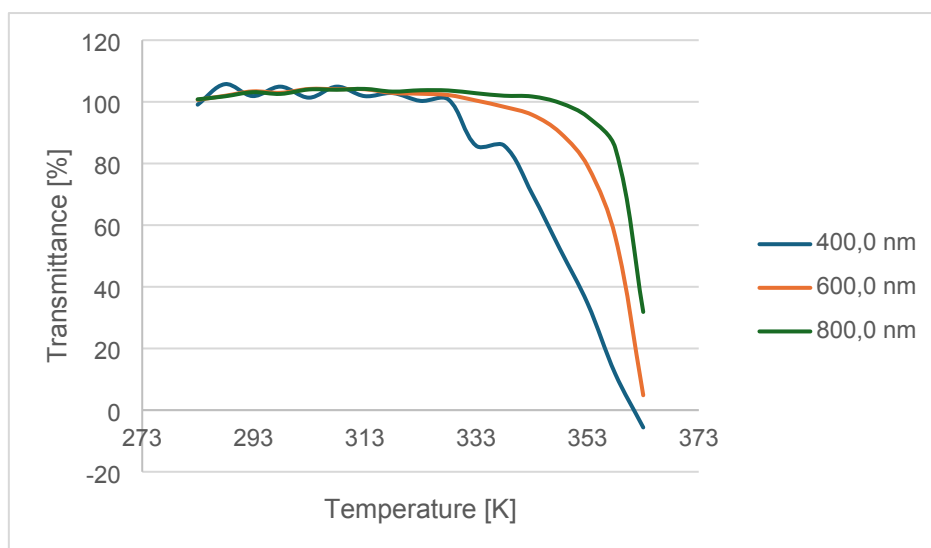


Figure S83. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of BE46 at concentration equal to 275 mg/ml

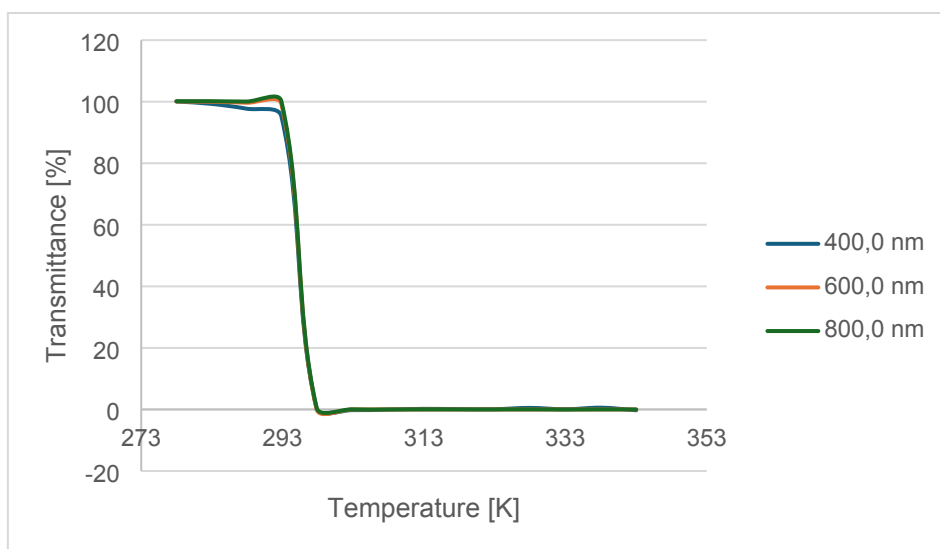


Figure S84. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of BE54 at concentration equal to 50 mg/ml

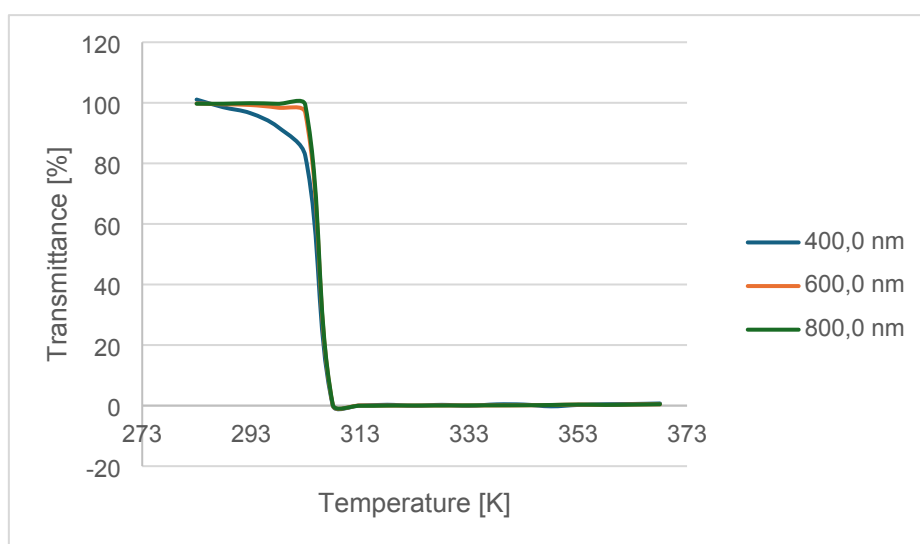


Figure S85. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of BE54 at concentration equal to 100 mg/ml

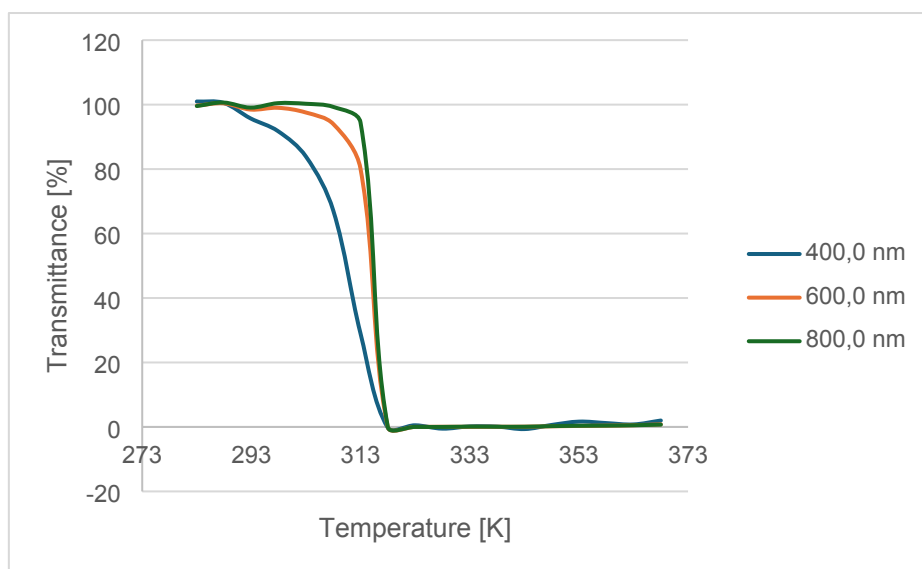


Figure S86. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of BE54 at concentration equal to 150 mg/ml

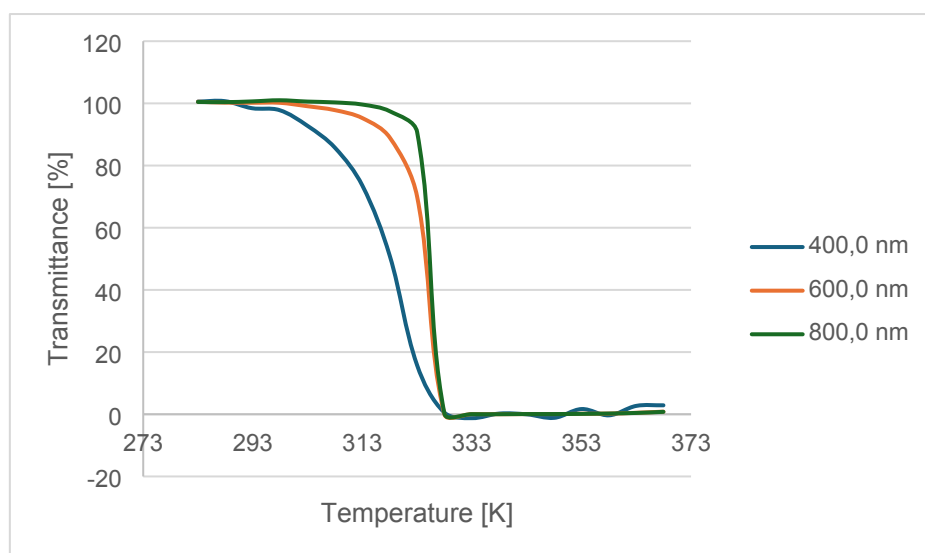


Figure S87. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of BE54 at concentration equal to 275 mg/ml

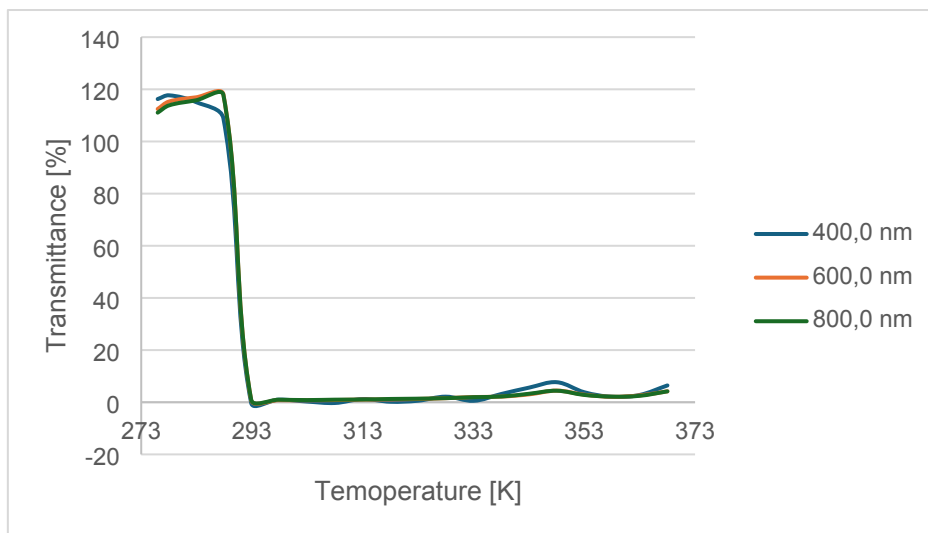


Figure S88. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of BE56 at concentration equal to 50 mg/ml

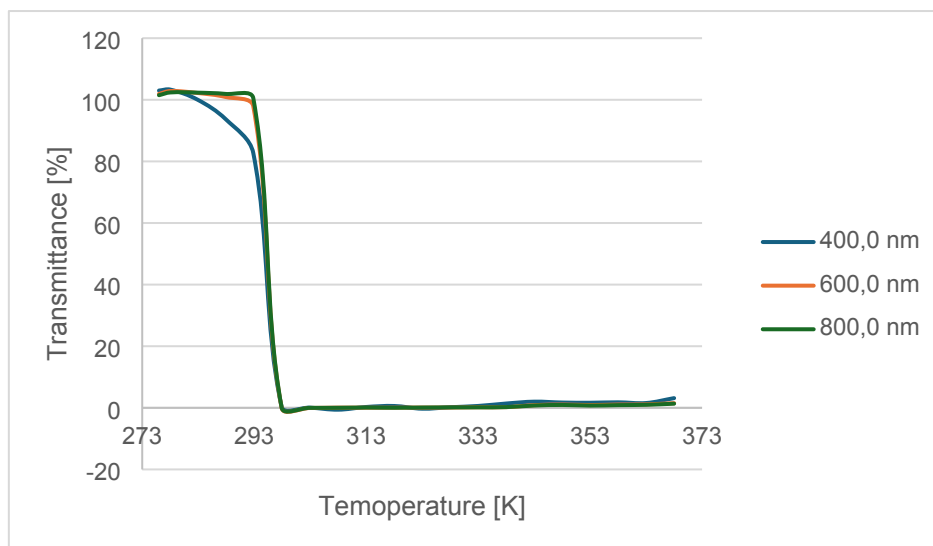


Figure S89. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of BE56 at concentration equal to 100 mg/ml

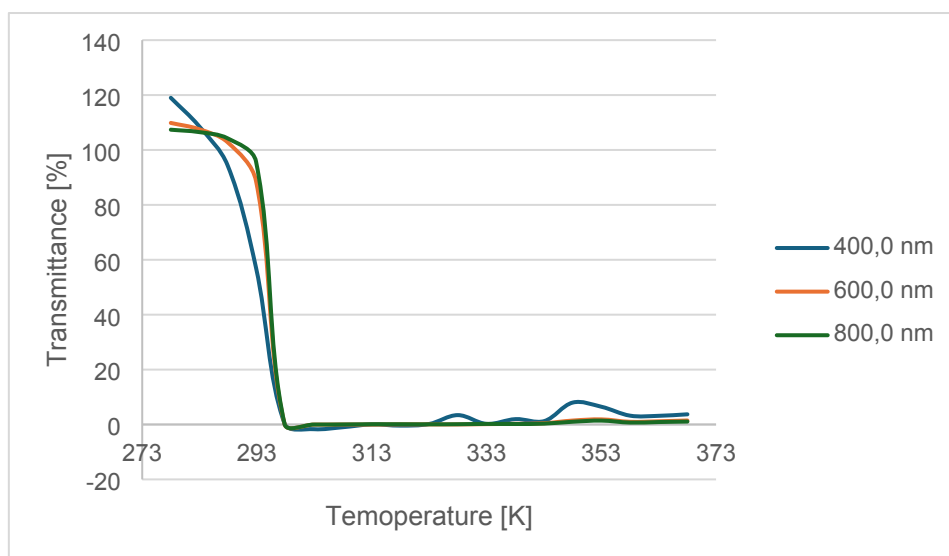


Figure S90. The dependence of transmittance on temperature for the aqueous solution of BE56 at concentration equal to 150 mg/ml

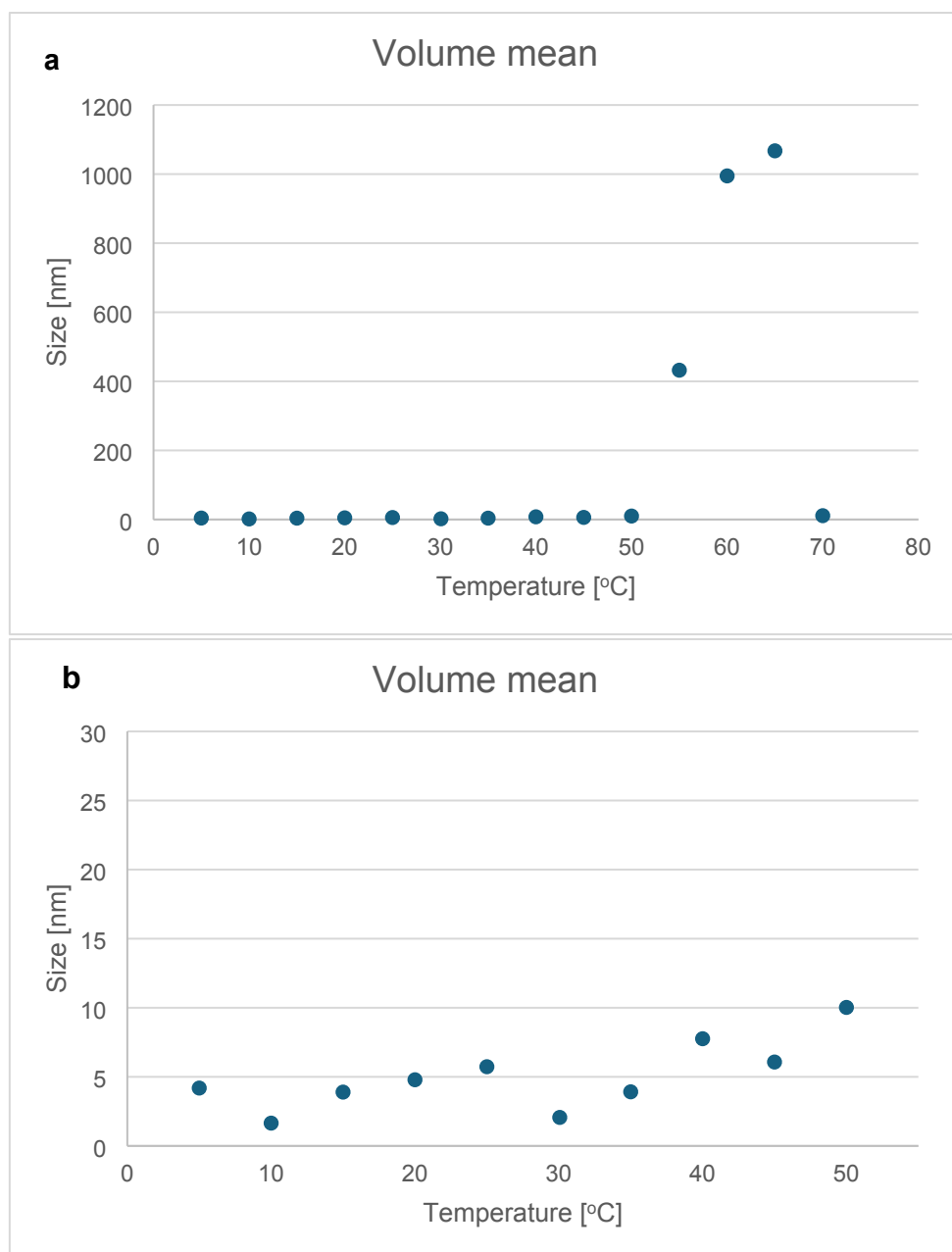


Figure S91. The dependence of the diameter of BE46 macromolecules in water ($c=30$ mg/mL) on temperature.

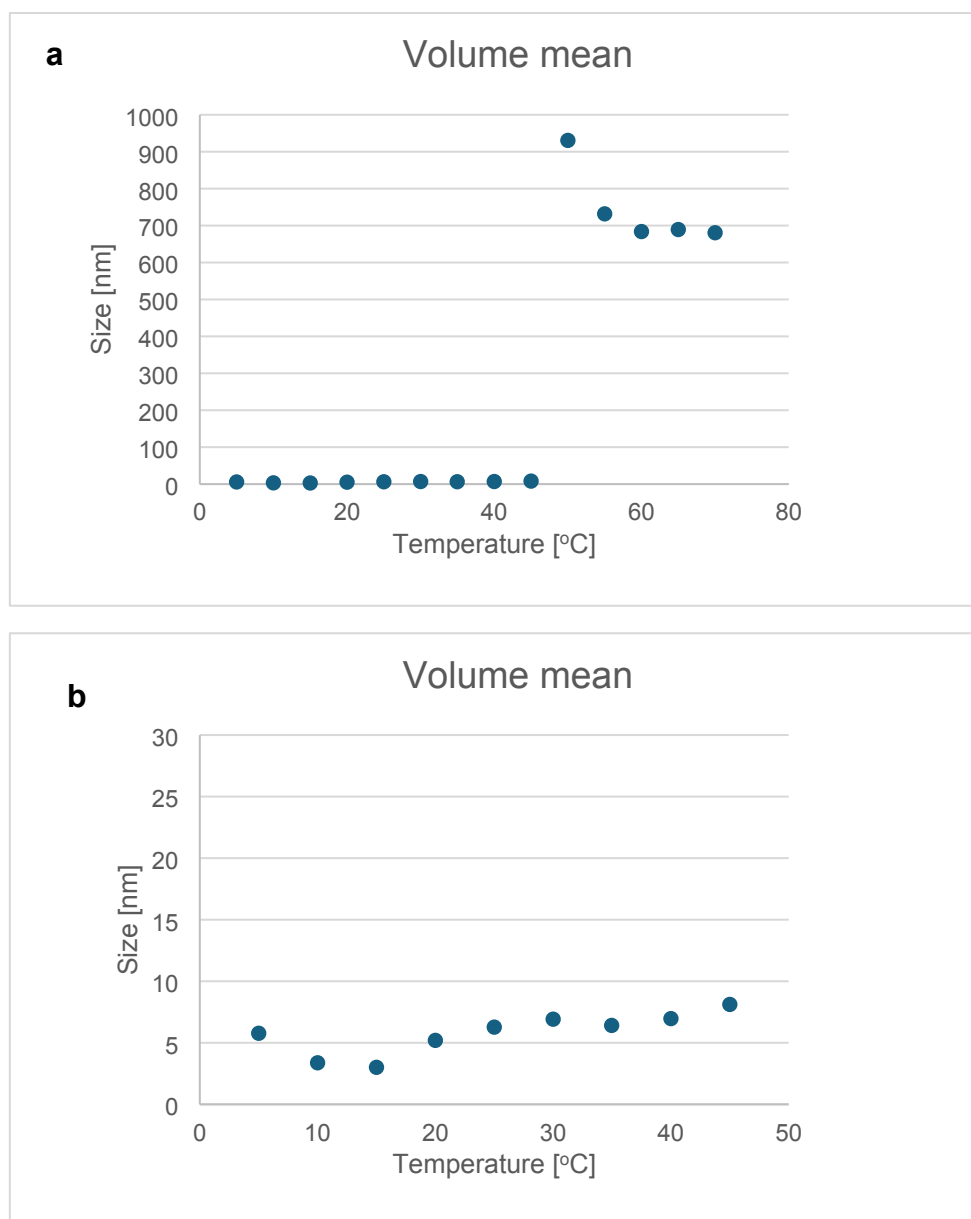


Figure S92 The dependence of the diameter of BE46 macromolecules in water (c=15 mg/mL) on temperature.

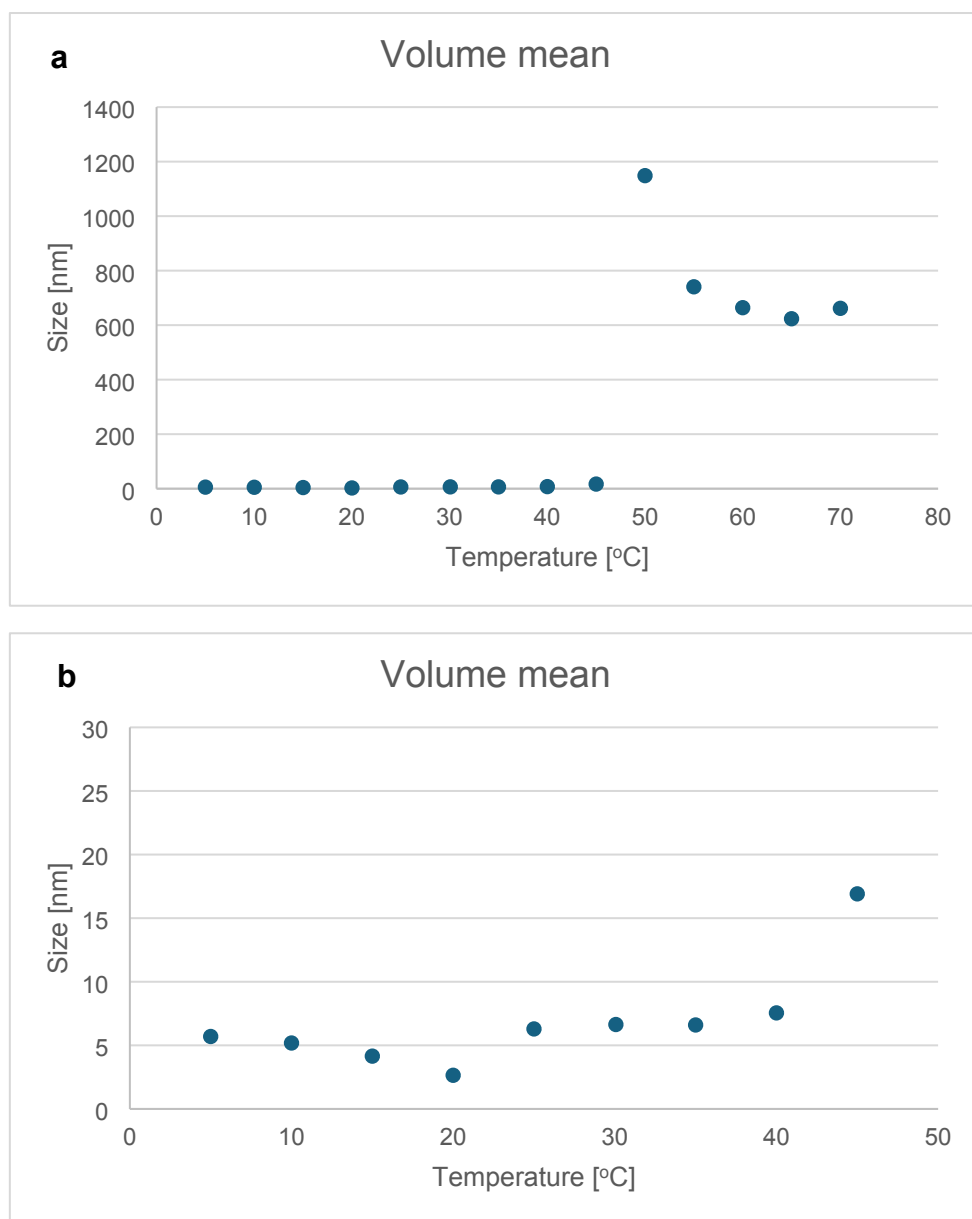


Figure S93. The dependence of the diameter of BE46 macromolecules in water (c= 7.5 mg/mL) on temperature.

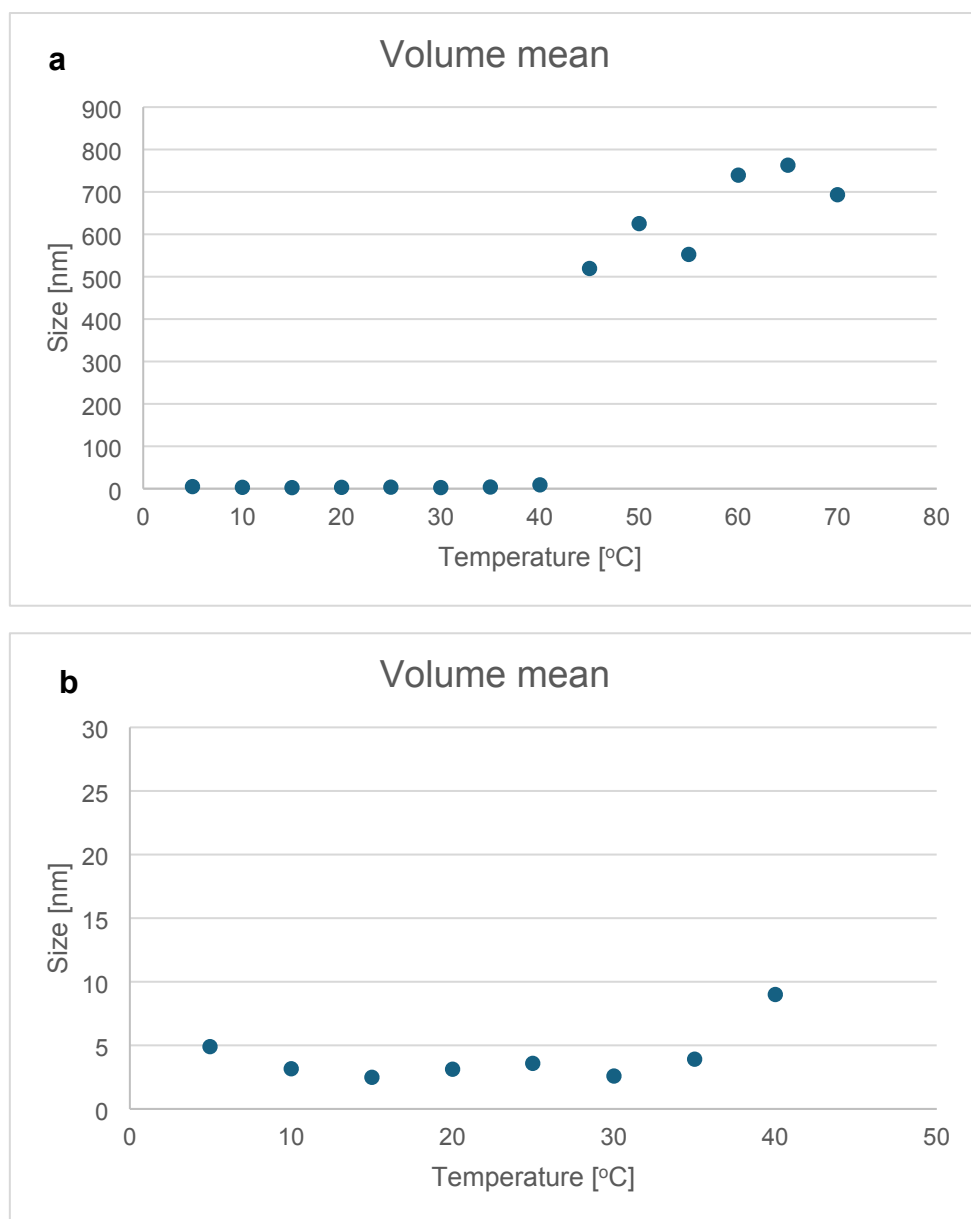


Figure S94. The dependence of the diameter of BE46 macromolecules in water (c= 1.88 mg/mL) on temperature.

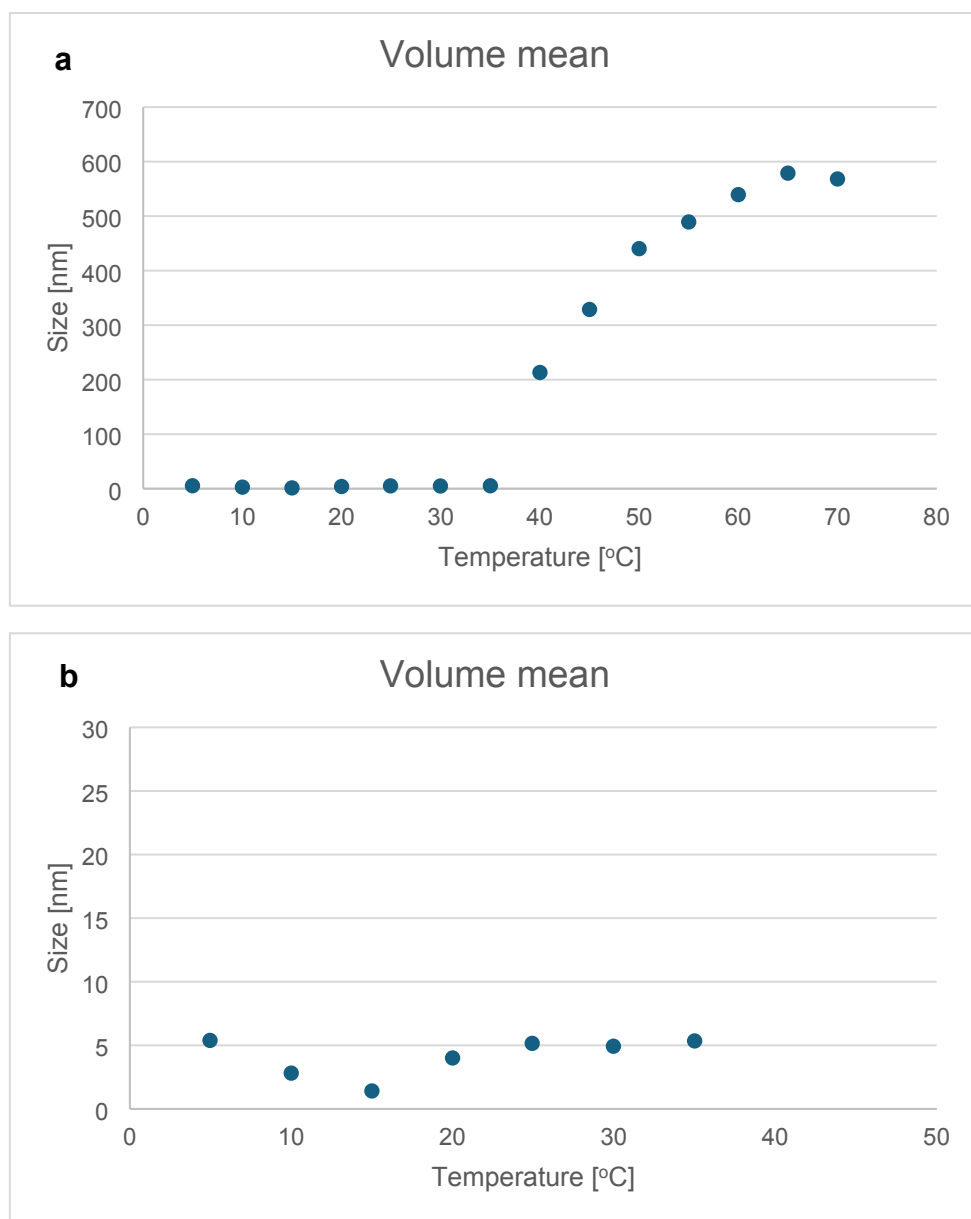


Figure S95. The dependence of the diameter of BE46 macromolecules in water ($c=0.94$ mg/mL) on temperature.

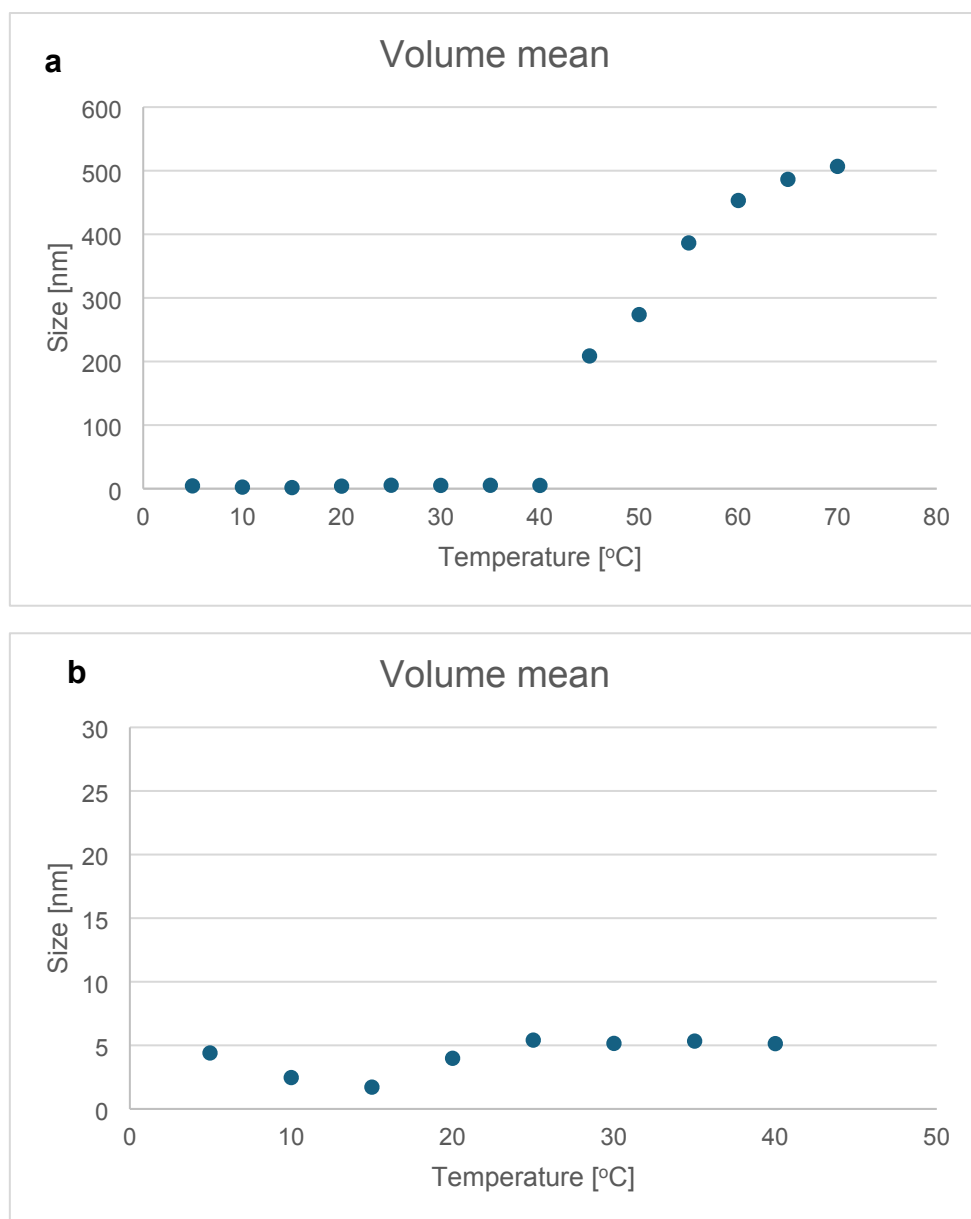


Figure S96. The dependence of the diameter of BE46 macromolecules in water (c= 0.47 mg/mL) on temperature.

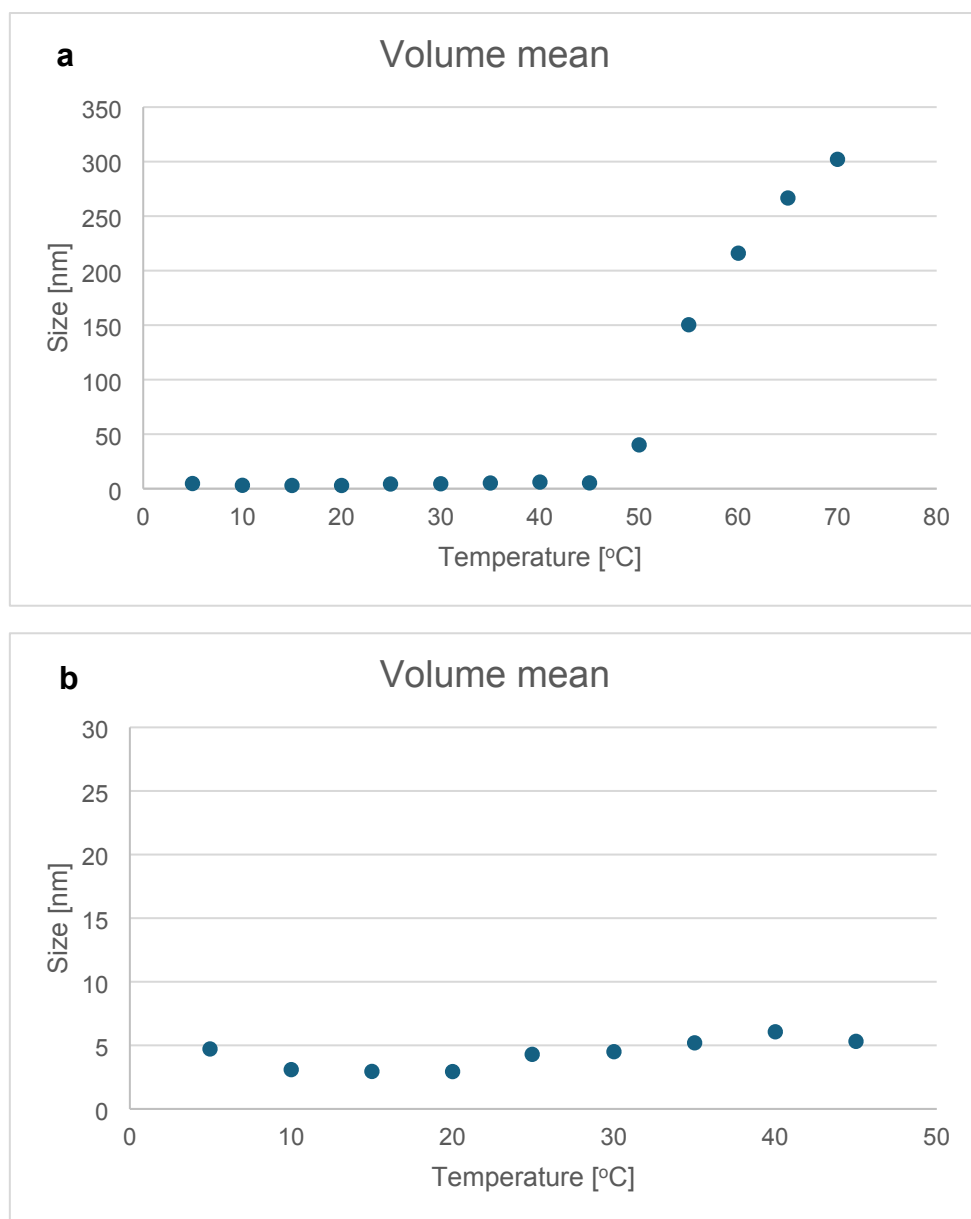


Figure S97. The dependence of the diameter of BE46 macromolecules in water (c=0.24 mg/mL) on temperature.

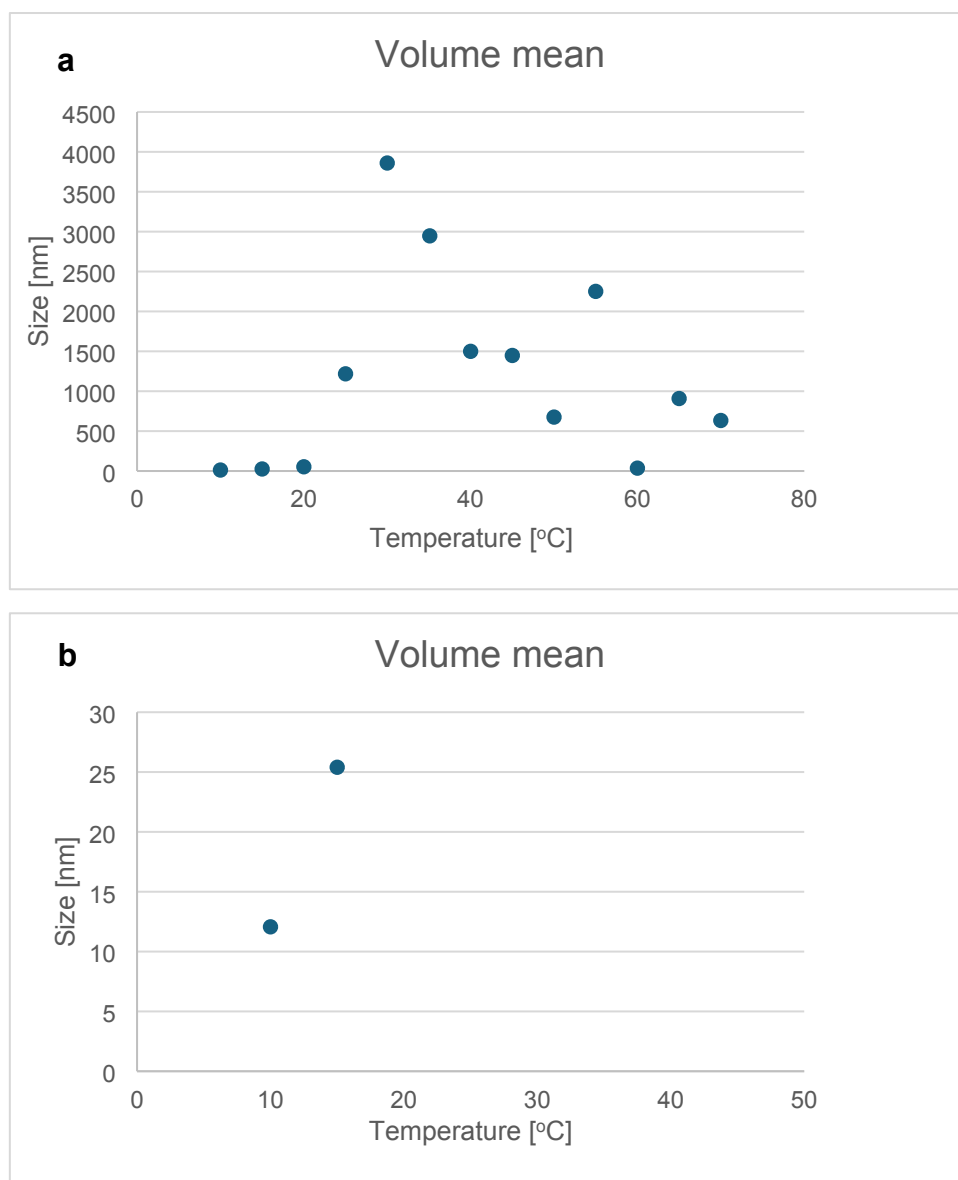


Figure S98. The dependence of the diameter of PC46 macromolecules in water ($c=50$ mg/mL) on temperature.

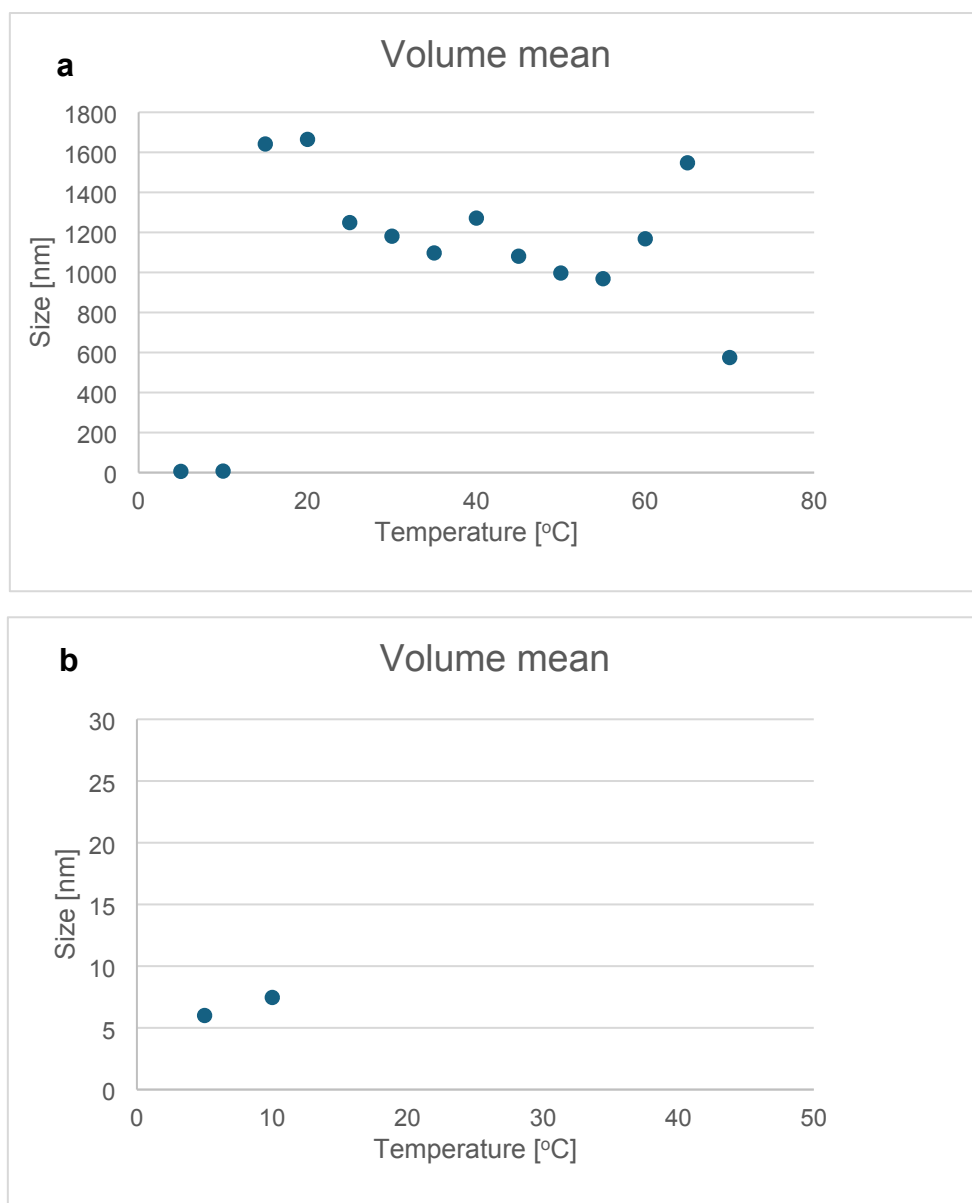


Figure S99. The dependence of the diameter of PC46 macromolecules in water ($c=7.5$ mg/mL) on temperature.

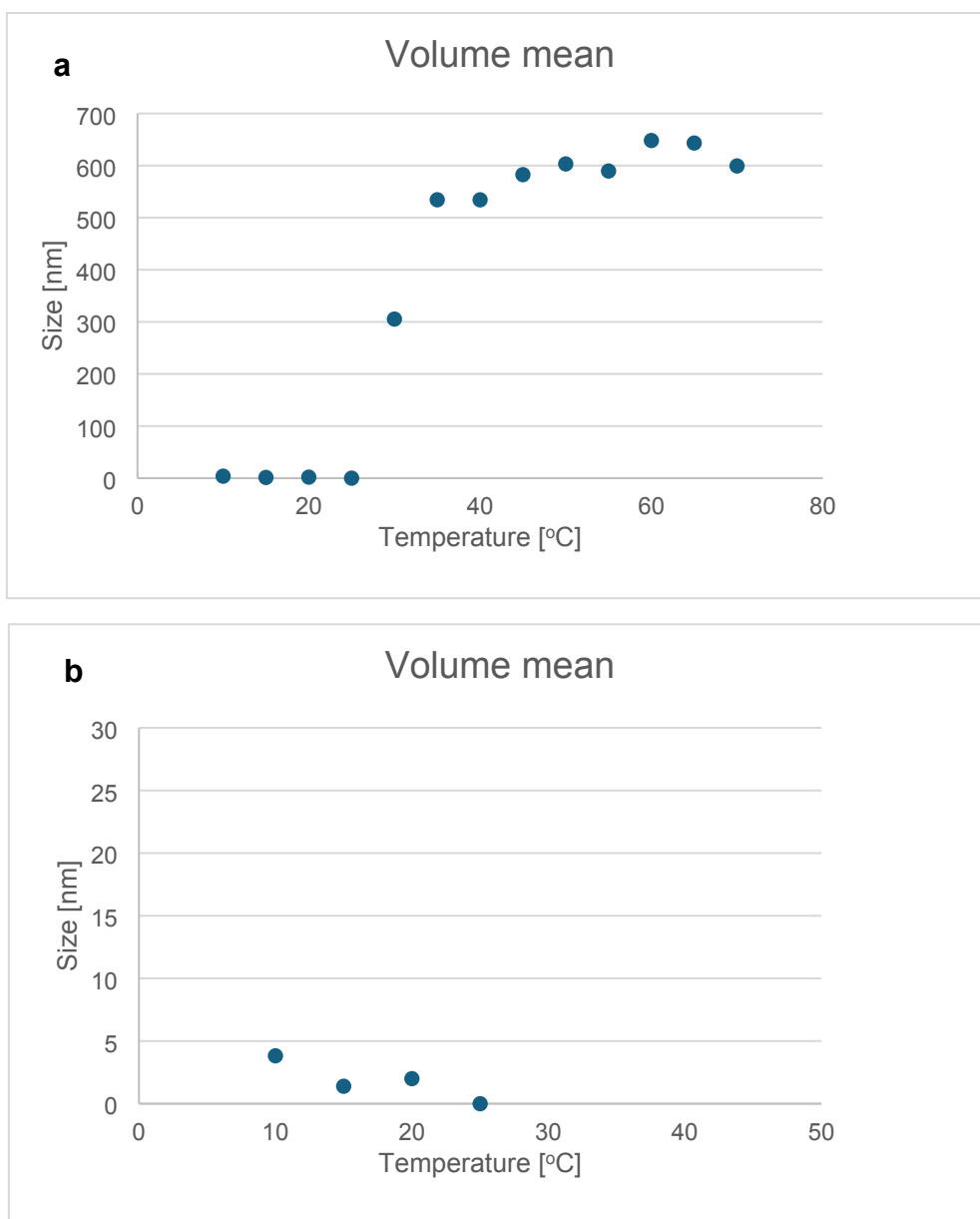


Figure S100. The dependence of the diameter of PC46 macromolecules in water ($c = 0.47$ mg/mL) on temperature.

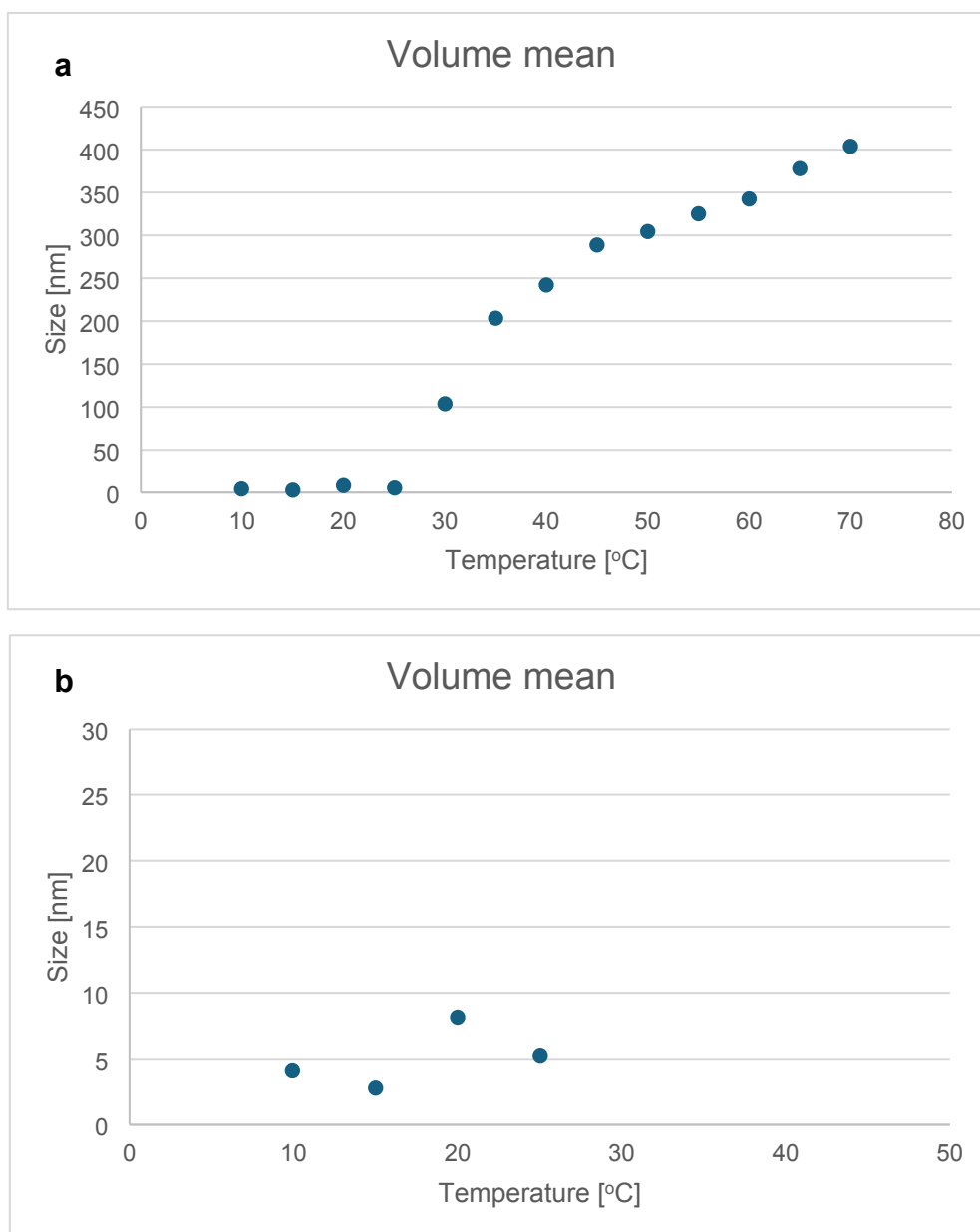


Figure S101. The dependence of the diameter of PC46 macromolecules in water (c=0.24 mg/mL) on temperature.

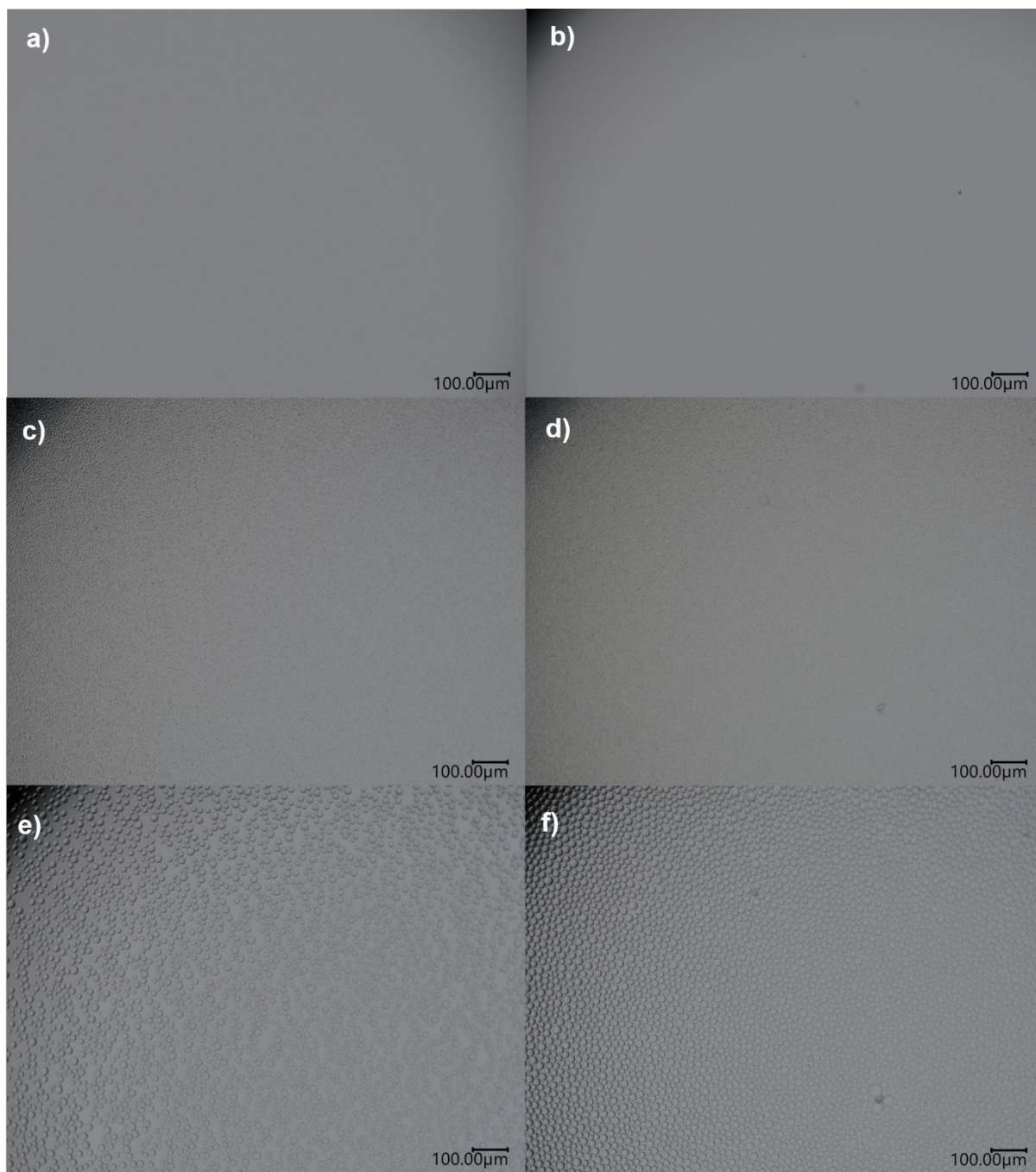


Figure S102. Optical microscope images of BE46 (a, c, e) and PC38 (b, d, f) recorded at temperature below the cloud point, at the cloud point and above the cloud point of polymer, respectively.

Additional data obtained from MD LAMMPS simulations of HbPGLs BE50^M and PC50^M molecules (representing experimental samples BE46 and PC46) in water with 150 mg/ml polymer concentration and TIP4P/2005 - OPLS-AA potentials at different temperatures. The experimental value of cloud point temperature for BE46 was 345,15 K and 313,55 K for PC46.

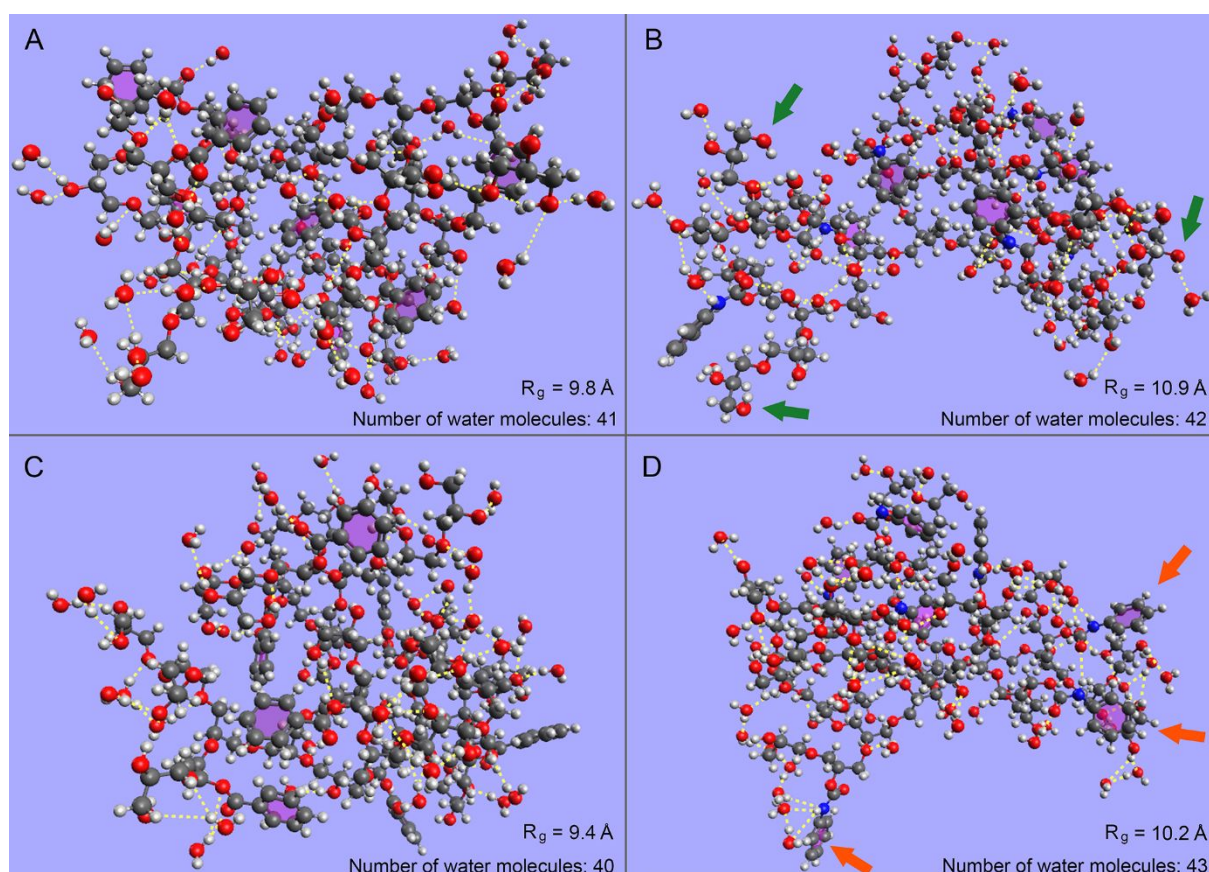


Figure S103. The optimized structures of the hydrophobized HbPGLs macromolecule BE50^M at A) 298 K and C) 353 K (above the experimental cloud point), and PC50^M at B) 298 K and D) 318 K (above the experimental cloud point). Only the first hydration sphere, i.e., molecules directly interacting with a given macromolecule are shown, the rest of water molecules is not presented for clarity. In the figure B, arrows indicate hydrophilic groups and, in figure D, hydrophobic groups, which are located outside the macromolecule. Numbers indicate the values of radius of gyration.

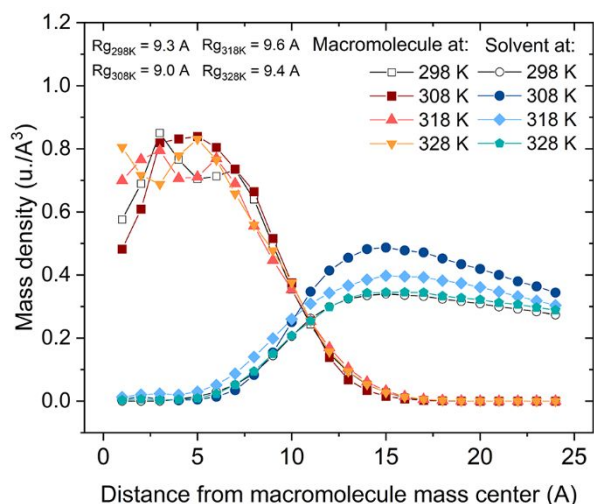


Figure S104. Time-averaged density profiles of macromolecule and water on the distance from a macromolecule centre of mass determined at different temperatures, i.e., below and above the cloud point of PC50^M. Experimental cloud point of PC50^M. Macromolecules came from simulations using TIP3P and Amber18 potentials.

The phase transition mechanism for PC50^M was confirmed by additional calculations using a different set of potentials: TIP3P and Amber 18. Due to the use of different force fields, the phase transition occurs at a different temperature than for OPLS-AA and TIP4P/2005, which is a more reliable set due to a very good representation of the behaviour, i.e. density, of water in a wide temperature range for TIP4P/2005 water simulations.

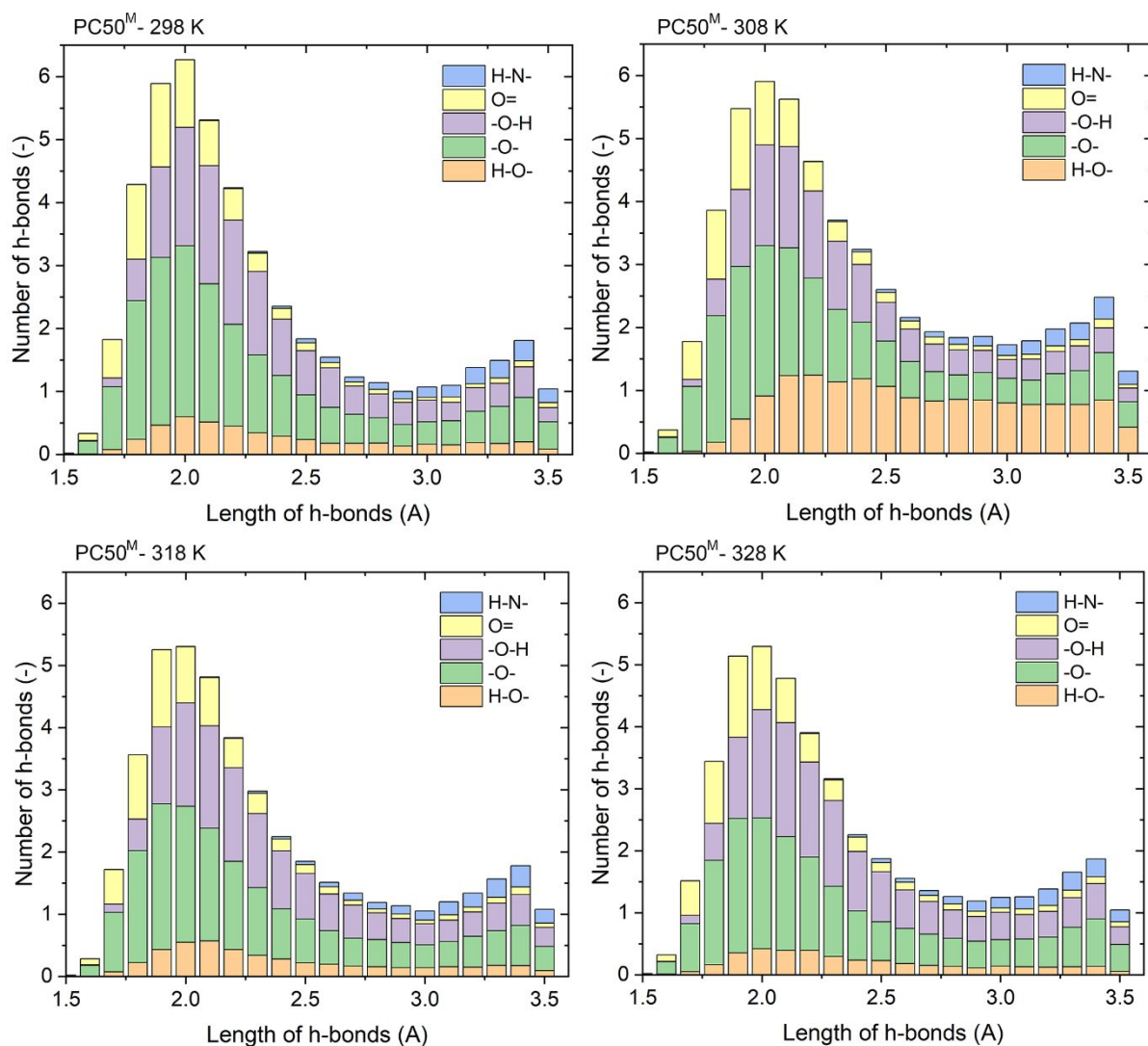


Figure S105. Time-averaged H-bond grouped histograms between the PC50^M macromolecule and water, determined at different temperatures (the bottom ones are for temperatures above the experimental cloud point of PC46).

In the figure the following hydrogen bonds are shown:

- H-N- - the hydrogen in the water molecule and the oxygen of the amide group
- =O - the hydrogen in the water molecule and the oxygen of the carbonyl group
- O-H - the hydrogen in the water molecule and the oxygen of the hydroxyl group
- O- - the hydrogen in the water molecule and the oxygen of the ether group
- H-O- - the oxygen in the water molecule and the hydrogen of the hydroxyl group

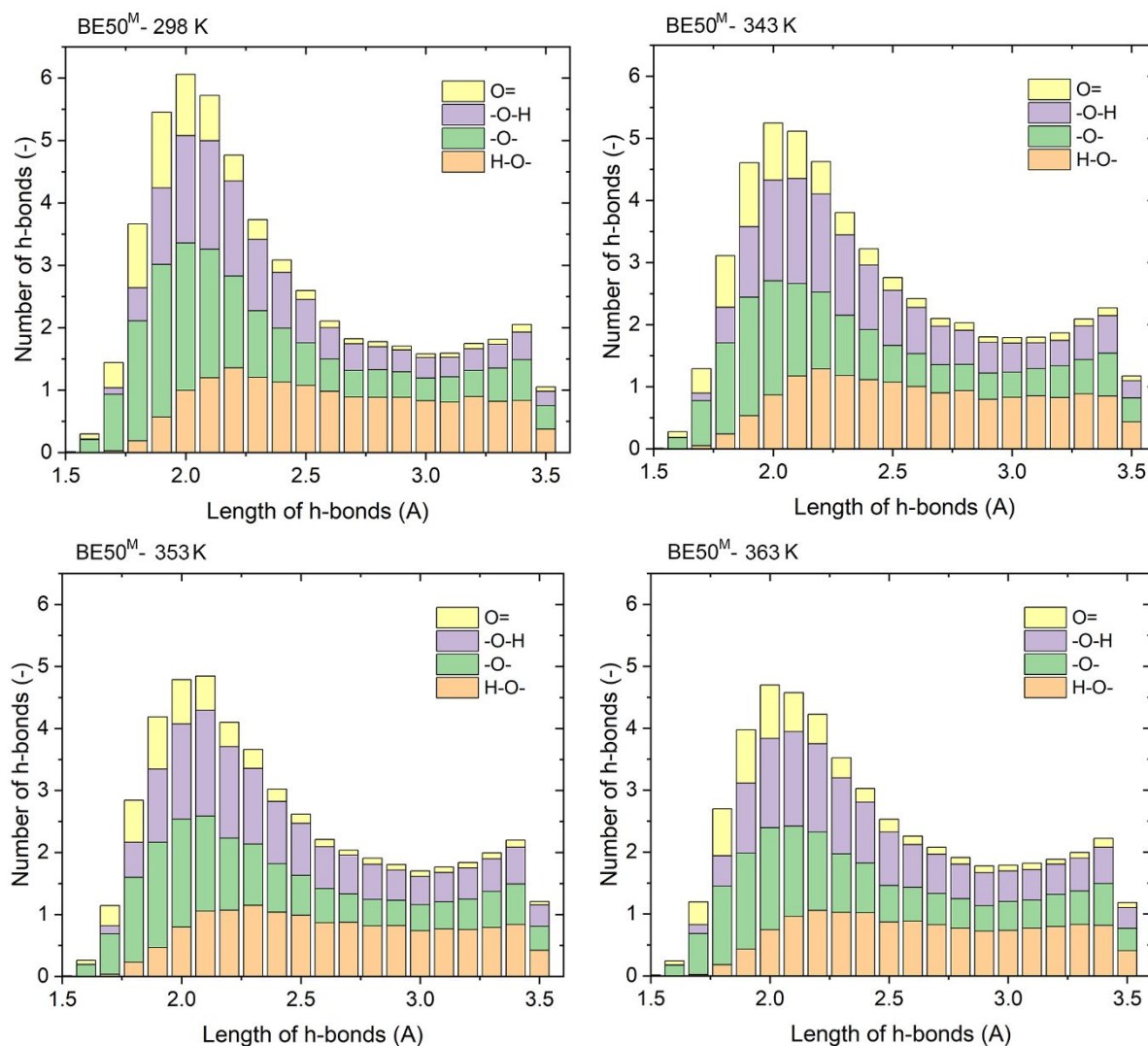


Figure S106. Time-averaged H-bond grouped histograms between the BE50^M macromolecule and water, determined at different temperatures (the bottom ones are for temperatures above the experimental cloud point of BE46).

In the figure the following hydrogen bonds are shown:

- =O - the hydrogen in the water molecule and the oxygen of the carbonyl group
- O-H - the hydrogen in the water molecule and the oxygen of the hydroxyl group
- O- - the hydrogen in the water molecule and the oxygen of the ether group
- H-O- - the oxygen in the water molecule and the hydrogen of the hydroxyl group

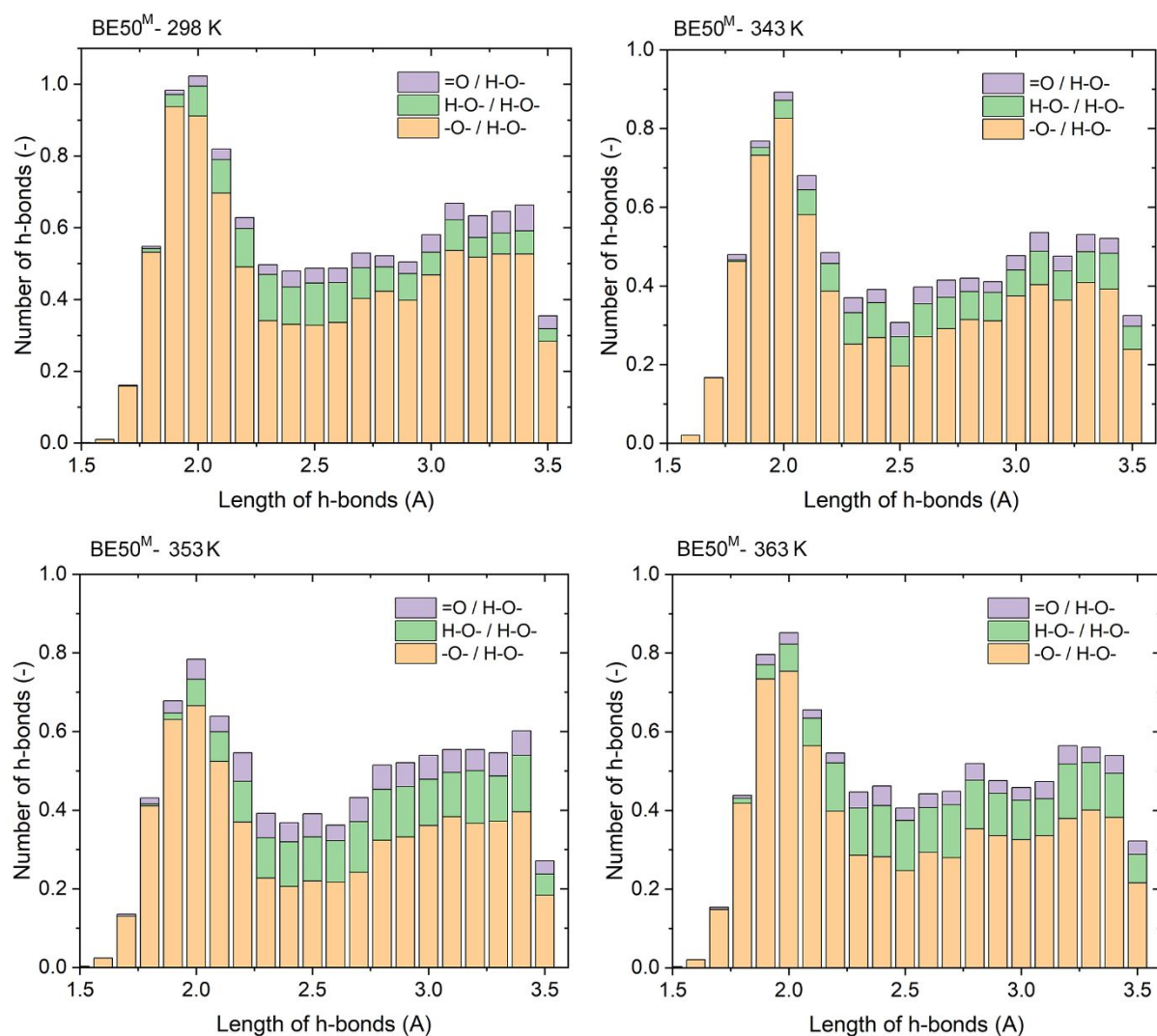


Figure S107. Time-averaged H-bond grouped histograms between hydrophilic groups of the BE50^M macromolecule, determined at different temperatures (the bottom ones are for temperatures above the experimental cloud point of BE46).

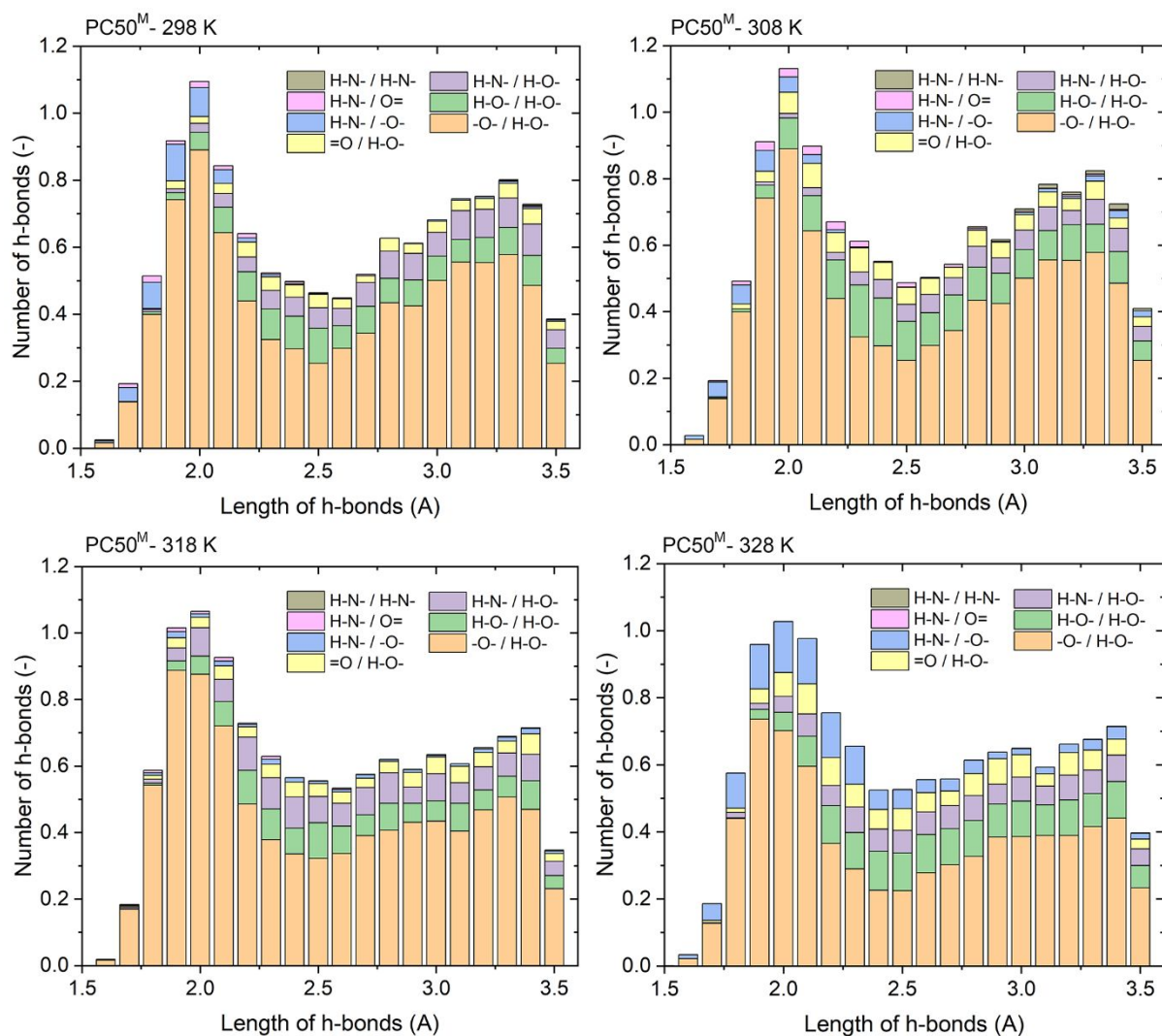


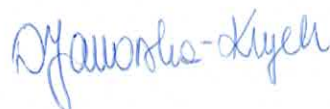
Figure S108. Time-averaged H-bond grouped histograms between hydrophilic groups of the PC50^M macromolecule, determined at different temperatures (the bottom ones are for temperatures above the experimental cloud point of PC46).

Łódź, dn. 23.10.2024r.

Mgr inż. Daria Jaworska-Krych
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk
ul. Sienkiewicza 112
90-363 Łódź

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że mój udział w pracy „Thermosensitive Behavior of Internally Phenyl-Enriched Hyperbranched Polyglycidols in Water – The influence of a Covalent Bond Used for the Hydrophobization” (Jaworska-Krych D., Gosecka M., Maczugowska P. Hałagan K., Szutkowski K., Gosecki M., Urbaniak M., Kozanecki M, Macromolecules, 2024, 57, 19, 9135-9156) polegał na przeprowadzeniu syntezy polimerów, scharakteryzowaniu otrzymanych struktur, przeprowadzenia i analizie wyników otrzymanych metodą spektroskopii UV-Vis oraz Ramana.



Łódź, dn. 23.10.2024r.

Dr hab. Monika Gosecka, prof. CBMiM
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk
ul. Sienkiewicza 112
90-363 Łódź

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że mój udział w pracy „Thermosensitive Behavior of Internally Phenyl-Enriched Hyperbranched Polyglycidols in Water – The influence of a Covalent Bond Used for the Hydrophobization” (Jaworska-Krych D., Gosecka M., Maczugowska P. Hałagan K., Szutkowski K., Gosecki M., Urbaniak M., Kozanecki M, Macromolecules, 2024, 57, 19, 9135-9156) polegał na przygotowaniu koncepcji badawczej, analizie i interpretacji wyników, oraz napisaniu artykułu i przygotowaniu odpowiedzi na recenzje.

MGosecka

Mgr inż. Paulina Maczugowska
Katedra Fizyki Molekularnej
Wydział Chemiczny
Politechnika Łódzka
ul. Żeromskiego 116
90-543 Łódź

Łódź, 23.10.2024

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, iż mój udział w pracy „Thermosensitive Behavior of Internally Phenyl-Enriched Hyperbranched Polyglycidols in Water – The Influence of a Covalent Bond Used for Hydrophobization” (Jaworska-Krych D., Gosecka M., Maczugowska p., Hałagan K., Szutkowski K., Gosecki M., Urbaniak M., Kozanecki M., *Macromolecules*, 2024, 57, 19, 9135-9156) polegał na przeprowadzeniu symulacji komputerowych metodami Dynamiki Molekularnej (MD) z wykorzystaniem oprogramowania *LAMMPS* oraz na dokonaniu analizy wyników symulacji komputerowych MD przeprowadzonych z wykorzystaniem oprogramowania *LAMMPS* i *VASARA*.

mgr inż. Paulina Maczugowska



Łódź, dn. 23.10.2024r.

Dr hab. inż. Krzysztof Hałagan
Katedra Fizyki Molekularnej
Wydział Chemiczny
Politechnika Łódzka
ul. Żeromskiego 116
90-543 Łódź

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że mój udział w pracy „Thermosensitive Behavior of Internally Phenyl-Enriched Hyperbranched Polyglycidols in Water – The influence of a Covalent Bond Used for the Hydrophobization” (Jaworska-Krych D., Gosecka M., Maczugowska P. Hałagan K., Szutkowski K., Gosecki M., Urbaniak M., Kozanecki M, *Macromolecules*, 2024, 57, 19, 9135-9156) polegał na przeprowadzeniu obliczeń komputerowych metodą mechaniki kwantowej, przygotowaniu środowiska symulacji komputerowej metodą MD LAMMPS oraz analizie otrzymanych wyników.

Krzysztof Hałagan



UNIwersYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU

Centrum NanoBioMedyczne

Poznań, dn. 23.10.2024r.

Dr hab. Kosma Szutkowski, prof. UAM
Centrum Nanobiomedyczne
Uniwersytet Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Wszechnicy Piastowskiej 3
61-614 Poznań

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że mój udział w pracy „Thermosensitive Behavior of Internally Phenyl-Enriched Hyperbranched Polyglycidols in Water – The influence of a Covalent Bond Used for the Hydrophobization” (Jaworska-Krych D., Gosecka M., Maczugowska P. Hałagan K., Szutkowski K., Gosecki M., Urbaniak M., Kozanecki M, Macromolecules, 2024, 57, 19, 9135-9156) polegał na przeprowadzeniu i analizie wyników symulacji komputerowych metodą MD YASARA oraz wyznaczeniu współczynników dyfuzji makrocząsteczek.

ul. Wszechnicy Piastowskiej 3, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 67 04
cnbmadm@amu.edu.pl

www.cnbm.amu.edu.pl

Łódź, dn. 23.10.2024r.

Dr Mateusz Gosecki
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk
ul. Sienkiewicza 112
90-363 Łódź

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że mój udział w pracy „Thermosensitive Behavior of Internally Phenyl-Enriched Hyperbranched Polyglycidols in Water – The influence of a Covalent Bond Used for the Hydrophobization” (Jaworska-Krych D., Gosecka M., Maczugowska P. Hałagan K., Szutkowski K., Gosecki M., Urbaniak M., Kozanecki M, Macromolecules, 2024, 57, 19, 9135-9156) polegał na przeprowadzeniu pilotażowych reakcji syntezy polimeru oraz opracowaniu grafik.

Gosecki

Łódź, dn. 23.10.2024r.

Inż. Małgorzata Urbaniak
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk
ul. Sienkiewicza 112
90-363 Łódź

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że mój udział w pracy „Thermosensitive Behavior of Internally Phenyl-Enriched Hyperbranched Polyglycidols in Water – The influence of a Covalent Bond Used for the Hydrophobization” (Jaworska-Krych D., Gosecka M., Maczugowska P. Hałagan K., Szutkowski K., Gosecki M., Urbaniak M., Kozanecki M, Macromolecules, 2024, 57, 19, 9135-9156) polegał na syntezie i oczyszczaniu polimerów.



Łódź, dn. 30.10.2024r.

Prof. dr hab. inż. Marcin Kozanecki
Katedra Fizyki Molekularnej
Wydział Chemiczny
Politechnika Łódzka
ul. Żeromskiego 116
90-543 Łódź

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że mój udział w pracy „Thermosensitive Behavior of Internally Phenyl-Enriched Hyperbranched Polyglycidols in Water – The influence of a Covalent Bond Used for the Hydrophobization” (Jaworska-Krych D., Gosecka M., Maczugowska P. Hałagan K., Szutkowski K., Gosecki M., Urbaniak M., Kozanecki M, *Macromolecules*, 2024, 57, 19, 9135-9156) polegał na analizie widm wykonanych przy pomocy spektroskopii podczerwieni.



Signed by /
Podpisano przez:

Marcin Ziemowit
Kozanecki
Politechnika Łódzka

Date / Data: 2024-
10-31 09:29