



**SZKOŁA DOKTORSKA
BioMedChem**

Uniwersytetu Łódzkiego
i Instytutów Polskiej
Akademii Nauk w Łodzi



Bartosz Kopka

Praca doktorska:

**Sieci z poli(2-izopropenylo-2-oksazoliny) jako
wielofunkcyjne materiały o zadanych właściwościach**

Doctoral thesis:

**Networks based on poly(2-isopropenyl-2-oxazoline)
as multifunctional materials with tailored properties**

- Promotor/Supervisor

dr hab. Małgorzata Baśko

Dział Funkcjonalnych Polimerów i Materiałów Polimerowych
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN

- Promotor pomocniczy/Assistant Supervisor

dr Bartłomiej Kost

Dział Funkcjonalnych Polimerów i Materiałów Polimerowych
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN

Składam serdeczne podziękowania Pani Promotor

dr hab. Małgorzacie Baśko

za opiekę merytoryczną, cierpliwość i wyrozumiałość w trakcie realizacji pracy, a także za wyjątkowe wsparcie mentorskie.

Szczególne podziękowania składam Promotorowi pomocniczemu

dr. Bartłomiejowi Kostowi

za jego nieskończone pokłady cierpliwości oraz wyrozumiałości, za cenne wskazówki oraz poświęcony czas, za pełnienie roli nauczyciela i przewodnika z powołania.

Z całego serca dziękuję

Kolegom i Koleżankom z Zespołu Polimerów Reaktywnych i Supramolekularnych

za wyjątkową, przyjazną atmosferę oraz pomoc w trakcie wykonywania badań.



Praca finansowana w ramach projektu badawczego OPUS NCN: 2020/37/B/ST5/03302

pt. „Amfifilowe sieci z poli(izopropenylo-2-oksazoliny) i alifatycznych poliestrów jako
wielofunkcyjne materiały o zadanych właściwościach”

Praca doktorska wykonana w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk w Łodzi

Spis treści:

Przedmowa	6
Streszczenie w języku polskim	8
Streszczenie w języku angielskim	10
1. Wstęp	12
1.1. Poli(2-izopropenylo-2-oksazolina) (PiPOx) jako reaktywny hydrofilowy polimer	12
1.2. Polilaktyd (PLA) i polikaprolakton (PCL) jako bloki budulcowe złożonych struktur polimerowych	15
1.3. Wpływ modyfikacji poliestrów na właściwości fizykochemiczne	17
1.4. Kowalencyjne sieci polimerowe z PiPOx	21
2. Cel pracy	23
3. Opis badań	24
3.1. Synteza poli(2-izopropenylo-2-oksazoliny)	24
3.2. Synteza polimerowych bloków sieciujących (HOOC-poli(tlenek etylenu)-COOH, HOOC-polilaktyd-COOH, HOOC-polikaprolakton-COOH)	25
3.3. Synteza i charakterystyka kowalencyjnych sieci polimerowych	27
3.3.1. Otrzymywanie sieci z poli(2-izopropenylo-2-oksazoliny) i poli(tlenku etylenu)	27
3.3.2. Otrzymywanie sieci z poli(2-izopropenylo-2-oksazoliny) i poliestrowych bloków sieciujących	30
3.3.3. Otrzymywanie porowatych sieci z poli(2-izopropenylo-2-oksazoliny) i poliestrowych bloków sieciujących	34
3.4. Zastosowania otrzymanych sieci polimerowych	36
3.4.1. Hydrożele antybakteryjne	36
3.4.2. Podłoża do hodowli komórek	37
4. Wyniki nieopublikowane	37
4.1. Materiały i metody	37
4.1.1. Materiały	37
4.1.1.1. Odczynniki chemiczne	37
4.1.1.2. Podłoża mikrobiologiczne	38
4.1.1.3. Mikroorganizmy	39
4.1.1.4. Rośliny	39
4.1.2. Opis metod stosowanych w pracy doktorskiej – wyniki nieopublikowane	39
4.1.2.1. Otrzymanie PiPOx na drodze polimeryzacji rodnikowej	39
4.1.2.2. Otrzymanie HOOC-PLA ₃₀₀₀ -COOH, HOOC-PCL ₃₀₀₀ -COOH na drodze kationowej polimeryzacji z otwarciem pierścienia L-laktydu	39

4.1.2.3. Przygotowanie hydrożeli -----	40
4.1.2.4. Adsorbenty metali i barwników -----	41
4.1.2.5. Przygotowanie hydrożeli o właściwościach przeciwgrzybiczych i przeciwbakteryjnych -----	42
4.1.2.6. Przygotowanie nośników leków -----	43
4.1.2.7. Badania uwalniania leku -----	44
4.1.2.8. Przygotowanie podłoża do hodowli roślin -----	44
4.2. Opis badań -----	45
4.2.1. Zastosowanie otrzymanych sieci polimerowych -----	45
4.2.1.1. Sorbenty zanieczyszczeń -----	45
4.2.1.2. Hydrożele o właściwościach przeciwgrzybiczych i przeciwbakteryjnych -----	47
4.2.1.3. Nośniki leków -----	49
4.2.1.4. Podłoża do hodowli roślin -----	54
5. Podsumowanie -----	58
6. Literatura -----	59
7. Spis wszystkich publikacji i osiągnięć -----	71
Publikacje -----	71
Komunikaty ustne -----	71
Postery -----	72
8. Oświadczenia współautorów i załączone publikacje -----	74

Przedmowa

Przedstawiona rozprawa doktorska zatytułowana „Sieci z poli(2-izopropenylo-2-oksazoliny) jako wielofunkcyjne materiały o zadanych właściwościach” składa się z trzech oryginalnych, monotematycznych publikacji i jednej pracy przeglądowej, opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, znajdujących się na tzw. Liście Filadelfijskiej oraz wyników nieopublikowanych. Autoreferat, który jest komentarzem do załączonych publikacji, rozpoczynają streszczenia w języku polskim i angielskim.

Przedstawiona dysertacja zawiera opis przeprowadzonych badań, stanowiąc przewodnik po głównych osiągnięciach naukowych, które zostały szerzej zaprezentowane w załączonych publikacjach oraz dyskusję nieopublikowanych wyników dotyczących zastosowań otrzymanych sieci w roli sorbentów zanieczyszczeń wodnych, hydrożeli o właściwościach przeciwwgrzybiczych i przeciwbakteryjnych, nośników leków i podłoży do hodowli roślin. Kopie czterech publikacji naukowych w języku angielskim, uzupełnione o opisy badań dodatkowych zamieszczono w sekcjach „Supplementary information”. Załączono również oświadczenia współautorów dotyczące ich wkładu w realizację poszczególnych etapów pracy.

Cykl publikacji szczegółowo opisuje realizację podstawowych badań nad otrzymywaniem nowej klasy wielofunkcyjnych sieci polimerowych, składających się z hydrofilowych bloków poli(2-izopropenylo-2-oksazoliny) oraz wybranych wielkocząsteczkowych segmentów sieciujących (polieterów lub poliestrów), charakterystykę otrzymanych materiałów oraz wyniki wskazujące ich potencjalne zastosowania.

W zakres pracy doktorskiej wchodzi następujące publikacje:

- P1. Kopka B., Kost B., Rajkowska K., Pawlak A., Kunicka-Styczyńska A., Biela T., Basko M., A simple strategy for efficient preparation of networks based on poly(2-isopropenyl-2-oxazoline), poly(ethylene oxide), and selected biologically active compounds: Novel hydrogels with antibacterial properties, **Soft Matter**, **2021**, **17**, **10683-10695**.
- P2. Kopka B., Kost B., Pawlak A., Tomaszewska A., Krupa A., Basko M., Covalent segmented polymer networks composed of poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) and selected aliphatic polyesters: designing biocompatible amphiphilic materials containing degradable blocks, **Soft Matter**, **2023**, **19**, **6987-6999**.

- P3. Kopka B., Kost B., Pawlak A., Bąk-Sypień I., Brzeziński M., Tomaszewska A., Krupa A., Józwiak P., Basko M., Biocompatible, porous hydrogels composed of aliphatic polyesters and poly(2-isopropenyl-2 oxazoline). Their application as scaffolds for bone tissue regeneration, **Soft Matter**, **2024**, **20**, 6655–6667.
- P4. Kopka B., Kost B., Basko M., Poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) as a reactive polymer for materials development, **Polymer Chemistry**, **2022**, **13**, 4736-4746.

Badania wykonano w ramach projektu pt. „Amfifilowe sieci z poli(izopropenylo-2-oksazoliny) i alifatycznych poliestrów jako wielofunkcyjne materiały o zadanych właściwościach” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki na podstawie decyzji UMO-2020/37/B/ST5/03302.

Streszczenie w języku polskim

Celem niniejszej pracy doktorskiej było otrzymanie i charakterystyka nowej klasy wielofunkcyjnych, segmentowych sieci polimerowych, zbudowanych z hydrofilowych bloków poli(2-izopropenylo-2-oksazoliny) (PiPOx) oraz wybranych polimerowych segmentów sieciujących : poli(tlenku etylenu) (PEO), polilaktydu (PLA) i polikaprolaktanu (PCL). Przedmiotem badań była również ocena możliwości potencjalnego zastosowania danych materiałów w roli nośników substancji biologicznie czynnych, rusztowań do hodowli komórkowych, sorbentów do usuwania zanieczyszczeń z wody oraz podłoża do hodowli roślinnych.

Zasadniczym etapem badań było przygotowanie reaktywnych bloków polimerowych, które umożliwiają tworzenie sieciowanych układów o strukturze kontrolowanej poprzez dobór komponentów oraz gęstość węzłów kowalencyjnych. W tym celu w pierwszym etapie zsyntetyzowano bloki PiPOx oraz segmenty sieciujące o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych zawierające końcowe grupy karboksylowe (HOOC-PEO-COOH, HOOC-PLA-COOH, HOOC-PCL-COOH). W przypadku polieteru modyfikacja końcowych grup hydroksylowych (wprowadzenie grup karboksylowych) została przeprowadzona metodą enzymatyczną, przy użyciu bezwodnika bursztynowego oraz enzymu lipazy B z *Candida antarctica* (CALB) użytego w roli biokatalizatora. Do funkcjonalizacji poliestrów (PLA i PCL) zastosowano estryfikację grup hydroksylowych bezwodnikiem bursztynowym w obecności 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan (DABCO) jako katalizatora. Otrzymane reaktywne polimery scharakteryzowano za pomocą dostępnych metod z włączeniem magnetycznego rezonansu jądrowego ^1H -NMR oraz ^{13}C -NMR, chromatografii z wykluczeniem objętości (SEC), termogravimetrii (TGA), skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC) oraz spektroskopii absorpcyjnej (FT-IR). Uzyskano dobrze zdefiniowane, telecheliczne polimery, zawierające na obu końcach makrocząsteczki grupy -COOH, które w dalszym etapie pełniły rolę wielkocząsteczkowych „rozgałęźniaczy” dla hydrofilowych segmentów PiPOx-u. Umożliwiło to wytwarzanie kowalencyjnych sieci poprzez prostą reakcję addycji między pierścieniami oksazoliny i grupami karboksylowymi. Odpowiedni dobór warunków pozwolił na przeprowadzanie reakcji sieciowania bez udziału katalizatora oraz bez generowania produktów ubocznych. Wyniki potwierdziły, że utrzymanie odpowiedniego stosunku jednostek estrowych do pierścieni bocznych oksazoliny pozwala na otrzymywanie tą względnie prostą metodą sieci z dużą wydajnością (udział frakcji nierozpuszczalnej > 93). Ponadto opracowano warunki syntezy

umożliwiające wprowadzenie porowatości, co znacząco zwiększyło zdolność materiałów do sorpcji wody.

Otrzymane nieporowate i porowate materiały scharakteryzowano pod kątem składu i właściwości fizykochemicznych za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego w ciele stałym ($^{13}\text{CP-MAS}$ NMR), TGA, DSC, skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM), metody spektroskopii dyspersji energii (EDS) oraz spektroskopii FT-IR.

Przeprowadzono również badania, których celem była ocena potencjału aplikacyjnego uzyskanych nieporowatych i porowatych materiałów. W toku przeprowadzonych badań stwierdzono, iż otrzymane segmentowe sieci kowalencyjne wykazują multifunkcyjny charakter i mogą znaleźć zastosowanie m.in. jako rusztowania do hodowli komórkowych, systemy dostarczania substancji biologicznie czynnych (leków), sorbenty do usuwania zanieczyszczeń z wody oraz podłoża do uprawy roślin.

Streszczenie w języku angielskim

The aim of this doctoral thesis was the synthesis and characterization of a new class of multifunctional, segmented polymer networks composed of hydrophilic poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) (PiPOx) blocks and selected crosslinking polymeric segments – poly(ethylene oxide) (PEO), polylactide (PLA), and polycaprolactone (PCL). Additionally, the study evaluated the potential application of these materials as carriers for biologically active substances, scaffolds for cell culture, sorbents for water purification, and substrates for plant cultivation.

A main stage of the research involved the preparation of reactive polymer blocks that enabled the formation of crosslinked networks with architecture controlled by the selection of components and covalent crosslinking density. For this purpose, PiPOx blocks and crosslinking segments with diverse physicochemical properties, containing terminal carboxylic acid groups (HOOC-PEO-COOH, HOOC-PLA-COOH, HOOC-PCL-COOH), were synthesized in the first stage. In the case of polyether, modification of terminal hydroxyl groups (to introduce carboxylic groups) was carried out enzymatically using succinic anhydride and lipase B from *Candida antarctica* (CALB) as a biocatalyst. For polyester functionalization (PLA and PCL), esterification of hydroxyl groups with succinic anhydride in the presence of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) as a catalyst was carried out. The obtained reactive polymers were characterized using available methods including proton and carbon nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H -NMR, ^{13}C -NMR), size-exclusion chromatography (SEC), thermogravimetric analysis (TGA), differential scanning calorimetry (DSC), and Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). These well-defined, telechelic polymers containing terminal $-\text{COOH}$ groups at both ends of the macromolecule served as macromolecular “branching agents” for the hydrophilic PiPOx segments. This enabled the formation of covalently crosslinked networks through a simple addition reaction between oxazoline rings and carboxyl groups. Appropriate selection of reaction conditions allowed to carry out crosslinking reaction without use of catalyst and without the generation of by-products.

The results confirmed that maintaining the appropriate ratio of ester units to oxazoline side rings allows the formation of networks with high efficiency using this relatively simple method (insoluble fraction > 93%). Furthermore, synthesis conditions were developed to introduce porosity, significantly increasing the water sorption capacity of the materials.

The obtained non-porous and porous materials were characterized in terms of composition and physicochemical properties using solid-state ^{13}C CP-MAS NMR, TGA, DSC,

scanning electron microscopy (SEM), energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS), and FT-IR spectroscopy.

Application potential studies of both non-porous and porous materials were also carried out. These studies showed that the obtained segmented covalent networks exhibit multifunctional properties and may find application as scaffolds for cell culture, drug delivery systems, sorbents for water purification, and substrates for plant cultivation.

1. Wstęp

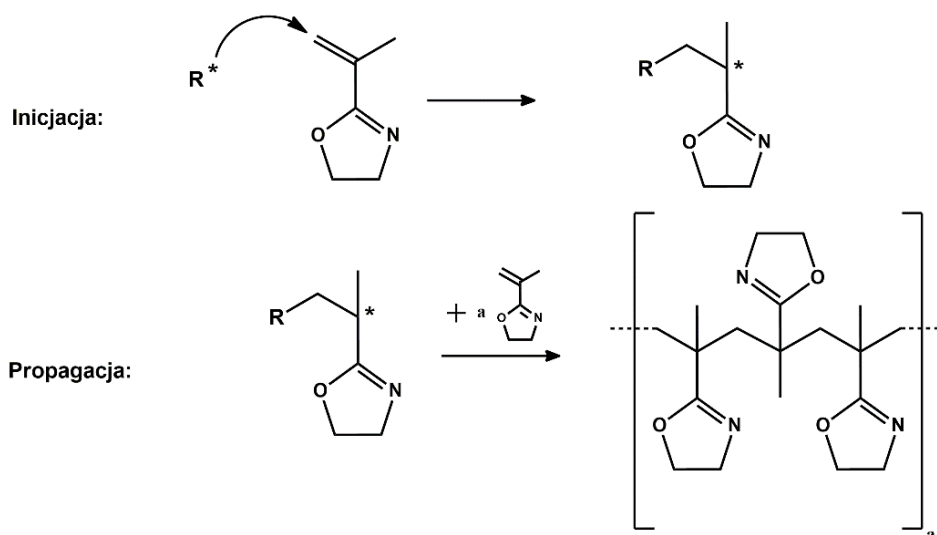
1.1. Poli(2-izopropenylo-2-oksazolina) (PiPOx) jako reaktywny, hydrofilowy polimer

W ostatnich dekadach polimery zyskały ogromną popularność we współczesnym życiu dzięki unikalnemu połączeniu cech, takich jak dobra wytrzymałość mechaniczna, łatwość przetwarzania oraz stosunkowo niskie koszty produkcji. Tworzywa polimerowe coraz częściej zastępują tradycyjne materiały takie jak szkło, drewno, czy stal, znajdując zastosowanie w wielu branżach przemysłu, między innymi w budownictwie, motoryzacji, przemyśle spożywczym, energetycznym, medycznym, kosmetycznym i farmaceutycznym¹. W biomedycynie, ze względu na dobrą rozpuszczalność w wodzie (hydrofilowość) i biogodność najczęściej stosuje się poli(glikol etylenowy) (PEG), poli(kwas akrylowy), poli(alkohol winylowy), poli(winylopirolidon) i poli(akrylamid)². Polimery te mogą pełnić rolę zagęstników, stabilizatorów, nośników leków czy komponentów hydrożeli. Najszerzej stosowany poli(glikol etylenowy) od dawna był uważany za cząsteczkę nieimmunogenną i stosowany ze względu na zdolność do ochrony białek przed układem odpornościowym gospodarza³. Jednak powszechne stosowanie PEG-u i PEG-ylowanych pochodnych w produktach farmaceutycznych i kosmetycznych powoduje coraz częstsze występowanie skutków ubocznych, w tym coraz częstsze występowania reakcji alergicznych³⁻⁵. Rośnie więc świadomość, że w dłuższej perspektywie mogą pojawić się pewne ograniczenia w stosowaniu PEG-u i dlatego poszukuje się nowych hydrofilowych polimerów, które mogą poszerzyć gamę polimerów hydrofilowych^{4,5}.

Jednym z polimerów spełniających wymagania dotyczące odpowiednich właściwości fizykochemicznych jest poli(2-izopropenylo-2-oksazolina). Monomer wykorzystywany do syntezy (iPOx) należy do związków bifunkcyjnych, zawierających w cząsteczce dwa reaktywne centra: grupę winylową oraz pierścień oksazolinowy⁶⁻⁹. Polimeryzacja iPOx-u, która zachodzi z udziałem grupy winylowej prowadzi do otrzymania polimeru o węglowym szkielecie głównym, w którym pierścień oksazoliny pozostaje zamknięty i stanowi element łańcucha bocznego. Taka struktura otwiera szerokie możliwości dalszej funkcjonalizacji i modyfikacji materiału.

Polimeryzację iPOx-u można przeprowadzić przy użyciu różnych, powszechnie stosowanych technik polimeryzacji, co czyni ten monomer szczególnie uniwersalnym. Wśród wykorzystywanych metod znajdują się klasyczna polimeryzacja rodnikowa, polimeryzacja anionowa, polimeryzacja z addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha (z języka angielskiego: reversible addition-fragmentation chain transfer - RAFT)¹⁰, polimeryzacja

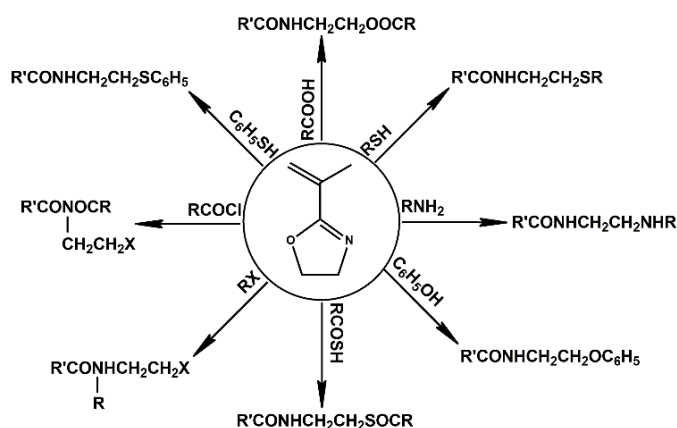
rodnikowa z odwracalną dezaktywacją (z języka angielskiego: reversible-deactivation radical polymerization - RDRP)¹¹, polimeryzacja plazmowa^{12,13}, czy polimeryzacja z przeniesieniem grupy (z języka angielskiego: group transfer polymerization - GTP)¹⁴. Jednakże, ze względu na łatwość reakcji, najczęściej stosuje się polimeryzację anionową lub rodnikową. Polimeryzacja anionowa pozwala na otrzymanie polimeru z dobrą kontrolą masy molowej i o niskiej dyspersyjności^{15,16}. Wymaga ona jednak przeprowadzenia polireakcji w temperaturze poniżej -20 °C, co utrudnia cały proces. Klasyczną polimeryzację rodnikową przeprowadza się w temperaturze od 60 do 80 °C z użyciem azobis(izobutyronitrylu) (AIBN) jako inicjatora. Proces ten prowadzi do otrzymania polimeru o dużej masie cząsteczkowej. Ze względu na słabą kontrolę procesu polimeryzacji rodnikowej, otrzymany produkt charakteryzuje się dyspersyjnością powyżej 2.0^{8,15}. Co ważne, polimeryzacja rodnikowa umożliwia korzystanie z reagentów bez konieczności ich intensywnego oczyszczania oraz pozwala na produkcję polimerów na dużą skalę. Schemat polimeryzacji anionowej i rodnikowej przedstawiono na Rys. 1.



Rys 1. Schemat wzrostu łańcucha PiPOx na drodze polimeryzacji anionowej i rodnikowej; * oznacza rodnik lub anion^{8,16}.

PiPOx jest polimerem, który można otrzymać stosując wiele wcześniej wspomnianych metod, a ostateczny wybór metody polimeryzacji zależy od wymaganej masy molowej oraz specyficznych potrzeb użytkownika. Polimer ten charakteryzuje się dobrą rozpuszczalnością w wodzie i w wielu rozpuszczalnikach organicznych. Badania stabilności w wodzie wykazały, że łańcuch polimerowy jest stabilny w warunkach obojętnych i zasadowych (pH 8 i 9)¹⁷. W warunkach kwaśnych obserwuje się proces degradacji polegający na hydrolizie pierścieni bocznych, co może prowadzić np. do procesu sieciowania. Wykazano również biogodność i immunomodulujący charakter polimeru w kilku niezależnych badaniach^{7,18–20}.

Obecność reaktywnych pierścieni oksazolinowych w bocznych łańcuchach poli(2-izopropenylo-2-oksazoliny) otwiera szerokie możliwości funkcjonalizacji tego polimeru. Pięciorzędowy, heterocykliczny pierścień oksazoliny może brać udział w różnorodnych reakcjach addycji, prowadzących do tworzenia stabilnych adduktów o charakterze kowalencyjnym. Dzięki temu możliwa jest łatwa i selektywna modyfikacja struktury polimeru, co umożliwia dopasowanie jego właściwości do konkretnych zastosowań, na przykład w inżynierii biomateriałów, nośnikach leków czy systemach reagujących na bodźce środowiskowe (Rys. 2)^{9,21}. Większość reakcji pomiędzy pierścieniem oksazoliny, a wybranymi reagentami wymaga obecności katalizatorów lub podwyższonej temperatury, jednakże, w przypadku kwasów karboksylowych i tioli reakcje addycji mogą przebiegać z wysoką wydajnością bez użycia katalizatorów⁶.



Rys 2. Reakcja pierścienia oksazoliny z odczynnikami zawierającymi różne grupy funkcyjne^{9,21}.

Poli(2-izopropenylo-2-oksazolina) jest coraz częściej wykorzystywana jako reaktywny, rozpuszczalny w wodzie polimer, umożliwiający uzyskanie funkcjonalnych materiałów o złożonej strukturze, który z powodzeniem może zastąpić obecnie stosowane hydrofilowe polimery. PiPOx należy do klasy hydrofilowych i reaktywnych polimerów, stanowiąc obiecującą alternatywę dla PEG-u w licznych zastosowaniach biomedycznych. Umożliwia to potencjalne zwiększenie bezpieczeństwa oraz funkcjonalności projektowanych materiałów. Szczególnie istotne są jego biogodność oraz właściwości immunomodulujące, które czynią go potencjalnym zamiennikiem PEG-u^{7,18–20}, którego powszechne stosowanie zaczyna stanowić problem, ze względu na wzrost liczby odnotowanych reakcji alergicznych w bezpośrednim kontakcie z organizmem człowieka^{3–5}. Obecność pierścienia oksazoliny w łańcuchu bocznym polimeru pozwala na przeprowadzenie wielu modyfikacji²¹, bez konieczności wcześniejszej funkcjonalizacji polimeru, co stanowi istotną przewagę w porównaniu do PEG-u. Dodatkowo, brak obecności katalizatorów i ubocznych

produktów reakcji podczas modyfikowania pierścienia oksazoliny związkami zawierającymi grupy tiolowe czy karboksylowe⁶, niweluje obecność niepożądanych zanieczyszczeń, które mogą wpływać na toksyczność otrzymanych materiałów.

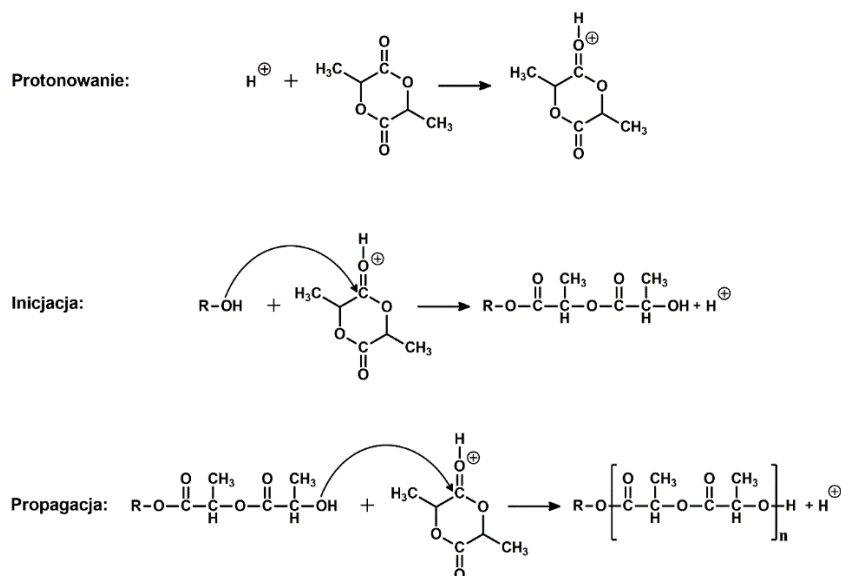
1.2. Polilaktyd (PLA) i polikaprolakton (PCL) jako bloki budulcowe złożonych struktur polimerowych

Polilaktyd i polikaprolakton należą do dużej rodziny alifatycznych poliestrów, czyli polimerów zawierających w swoim głównym łańcuchu powtarzalną jednostkę estrową²². Ta klasa polimerów znajduje zastosowanie jako specjalistyczne materiały biomedyczne lub tworzywa termoplastyczne wyróżniające się zdolnością do kompostowania, po wymaganym czasie użytkowania.

PLA można otrzymać w wyniku polikondensacji kwasu mlekowego lub na drodze polimeryzacji cyklicznego dimeru kwasu mlekowego (laktydu (LA))²³. PLA należy do ważnej grupy polimerów które mogą być otrzymywane z surowców odnawialnych np. w procesie fermentacji cukrów pochodzących z roślin (np: trzciny cukrowej, kukurydzy, czy buraków cukrowych)²⁴. PCL jest polimerem ϵ -kaprolaktonu (ϵ -CL), który można syntetyzować z surowców ropopochodnych²⁵. W przemyśle ϵ -CL otrzymuje się stosując metodę Baeyera-Villigera, która polega na utlenieniu cykloheksanonu, za pomocą peroksokwasów np. kwas nadoctowy²⁶. Najbardziej powszechną metodą syntezy PLA-u i PCL-u jest polimeryzacja z otwarciem pierścienia, która pozwala na otrzymanie poliestrów z dobrą kontrolą masy molowej (M_n w zakresie od 10^3 do 10^6 g/mol) oraz niską dyspersją²⁷.

W przemyśle stosuje się polimeryzację według mechanizmu koordynacyjno-insercyjnego, który wymaga obecności metalicznego katalizatora. Najczęściej w tej roli stosowane są związki cyny (np. oktanian cyny(II) ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$) ze względu na dużą aktywność katalityczną i dobrą rozpuszczalność w układzie polimeryzacyjnym^{27,28}. Jednakże pewnym problemem związanym z zastosowaniem związków cyny do polireakcji jest ich obecność w końcowym produkcie. Wiele zastosowań polimerów, szczególnie jako materiały w obszarze biomedycyny i elektroniki²⁹, wymaga usunięcia niepożądanych zanieczyszczeń resztkowych, takich jak jony metali powstające z katalizatorów ponieważ mogą zakłócać działanie układów biologicznych, lub wpływać niekorzystnie na właściwości (elektroniczne lub optyczne) przygotowanego materiału. Zawartość cyny w polimerach przeznaczonych do zastosowań medycznych powinna mieścić się w przedziale 20-50 ppm^{30,31}. Z tego powodu polimery otrzymane na drodze polimeryzacji koordynacyjnej z użyciem cyny wymagają skomplikowanych i czasochłonnych etapów oczyszczania³⁰,

prowadzących do podwyższenia kosztów produkcji. W kontekście tych ostatnich uwag, nastąpił szeroki rozwój metod polimeryzacji cyklicznych estrów prowadzonych w tzw. warunkach „metal-free”, z wykorzystaniem mocnych zasad organicznych (amin, fosfin lub fosfazenów), karbenów i kwasów protonowych, co zapewniło alternatywne podejście do procesów z udziałem metalicznych katalizatorów^{29,32}. Polimeryzacja kationowa prowadzona w obecności kwasowych katalizatorów może przebiegać w sposób kontrolowany według mechanizmu Aktywowanego Monomeru (AM), z wyłączeniem niepożądanych reakcji ubocznych. Mechanizm AM oprócz kwasowego katalizatora wymaga zastosowania inicjatora, którym najczęściej są alkohole (R-OH lub HO-R-OH). Podczas polimeryzacji według mechanizmu AM, w pierwszym etapie dochodzi do protonowania cyklicznego monomeru, a następnie w wyniku ataku nukleofilowego atomu tlenu z grupy hydroksylowej w inicjatorze na atom α -węgla w protonowanej cząsteczce następuje otwarcie pierścienia i przyłączenia fragmentu alkoholu. Następnie protonowane są kolejne cząsteczki monomeru, które na drodze propagacji włączane są do łańcucha polimeru^{33,34}. W tym czasie funkcję inicjatora przejmuje hydroksyl na końcu rosnącego łańcucha makrocząstki. Mechanizm AM przedstawiono na Rys. 3.



Rys 3. Schemat wzrostu łańcucha polimerowego według mechanizmu AM³³.

Pomimo, że kationowa polimeryzacja według mechanizmu AM nie prowadzi do otrzymania polimerów o bardzo dużych masach molowych to jednak oferuje interesujące możliwości syntetyczne. Ponieważ funkcyjna grupa inicjatora pozostaje w makrocząsteczce, proces może być zastosowany do syntezy reaktywnych poliestrów (makromonomerów) jeśli inicjatorem jest alkohol zawierający również odpowiednie reaktywne ugrupowanie (np. alkohol propargilowy)³⁵. Można również otrzymać telecheliczne poliestry zakończone obustronnie

grupami hydroksylowymi, jeżeli w roli inicjatora będzie zastosowany małowcząsteczkowy diol³³. Sfunkcjonalizowane poliestry są często stosowane jako bloki konstrukcyjne przy otrzymywaniu bardziej złożonych struktur polimerowych. Różnice w właściwościach fizykochemicznych poszczególnych homopolimerów pozwalają na projektowanie materiałów o charakterystyce dostosowanej do określonych i zaplanowanych funkcji.

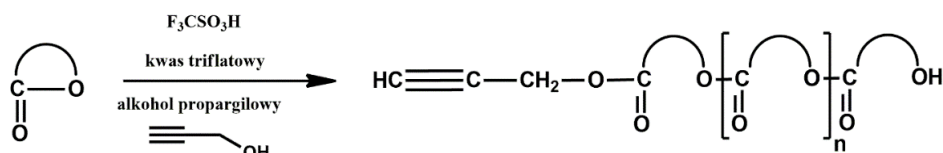
W związku z odmiennymi właściwościami poliestrów, dalszy opis poświęcono szczegółowej charakterystyce dwóch powszechnie stosowanych, poliestrów tj. PLA i PCL. Ze względu na występowanie dwóch centrów chiralnych w cząsteczce laktydu możemy wyróżnić trzy rodzaje PLA: izotaktyczny poli-L-PLA i izotaktyczny poli-D-PLA, charakteryzujący się występowaniem jednakowej konfiguracji absolutnej jednostek powtarzalnych, syndiotaktyczny poli-D,L-PLA, w którym naprzemiennie występują jednostki D i L kwasu mlekowego³⁶, oraz ataktyczny PLA, w którym rozkład jednostek D i L jest przypadkowy. PLA jest termoplastycznym polimerem charakteryzującym się temperaturą przejścia szklistego (T_g) w zakresie 60-65°C oraz temperaturą topnienia (T_m) w zakresie 180-220°C²⁴, co pozwala na jego przetworzenie poprzez termoformowanie w różnych procesach typu wtryskiwanie, przędzenie, czy wytłaczanie²⁴. PCL podobnie jak PLA zalicza się do termoplastów. W temperaturze pokojowej jest miękkim i ciągliwym materiałem, charakteryzującym się niską temperaturą przejścia szklistego -60°C oraz niską temperaturą topnienia 60°C^{37,38}. Obydwa typy poliestrów należą do grupy biozgodnych oraz kompostowalnych polimerów^{24,39,40}, co wpływa na ich szerokie zastosowanie w konstruowaniu bardziej złożonych struktur polimerowych jak np. sieci polimerowych^{41,42}.

1.3. Wpływ modyfikacji poliestrów na właściwości fizykochemiczne

W celu poprawy właściwości fizykochemicznych polimerów stosuje się metody fizycznej lub chemicznej modyfikacji. Metody fizyczne polegają na wytwarzaniu kompozytów lub blend w wyniku mieszania polimerów ze związkami małowcząsteczkowymi, bądź dwóch lub więcej polimerów, o różnych właściwościach fizykochemicznych⁴³. Obecnie najczęściej stosowanymi małowcząsteczkowymi plastifikatorami są ftalany⁴⁴. Wprowadzenie małowcząsteczkowych związków takich jak ftalan dibutyli lub ftalan (2-etyloheksylu) pozwala na zmniejszenie krystaliczności, wpływając na poprawę elastyczności oraz ułatwiając dalsze przetwarzanie kompozytów^{44,45}. Fizyczne mieszanie PLA lub PCL ze związkami wielkowcząsteczkowymi (polimery), może prowadzić do poprawy mechanicznej wytrzymałości, elastyczności czy termicznej stabilności otrzymanych blend polimerowych⁴³. Jednakże, metoda ta posiada często pewne

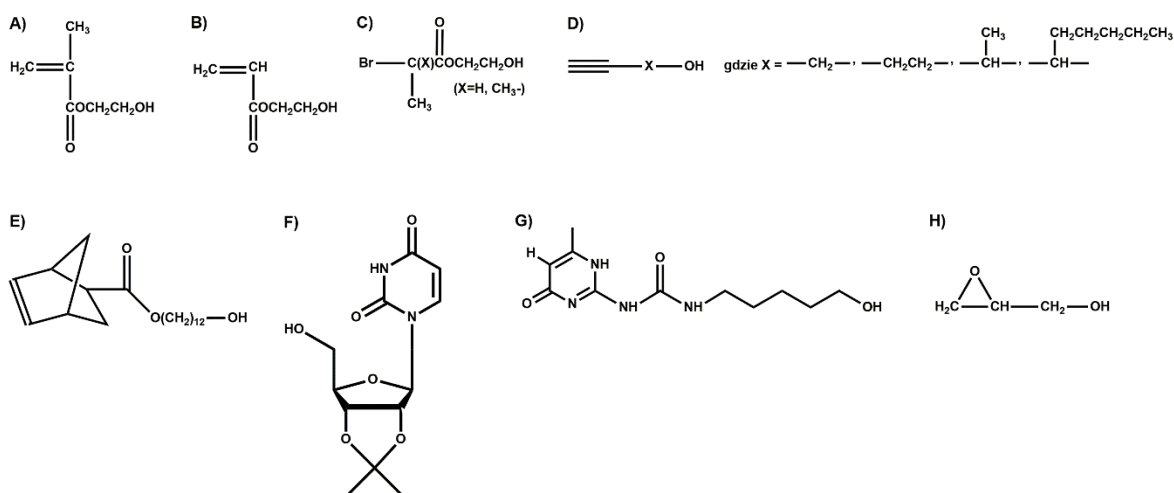
ograniczenia, wynikające na przykład z różnicy mieszalności poszczególnych składników, co prowadzi do separacji fazowych i pogorszenia właściwości otrzymanych materiałów⁴⁶.

Właściwości poliestrów można modyfikować, zmieniając ich grupy końcowe lub włączając te polimery w bardziej złożone struktury, takie jak kopolimery, polimery rozgałęzione, usieciowane układy polimerowe czy stereokompleksy. W tym celu bardzo często konieczne jest wprowadzenie do łańcucha określonej grupy funkcyjnej co można dokonać na etapie inicjacji polimeryzacji lub modyfikując istniejące już grup końcowe polimeru^{47–52}. Pierwsza metoda polega na przeprowadzeniu polimeryzacji, w obecności inicjatora, który w swojej strukturze zawiera określoną reaktywną grupę funkcyjną. Proces ten umożliwia włączenie cząsteczki inicjatora do łańcucha polimeru na etapie polimeryzacji, tak jak to zilustrowano dla kationowej polimeryzacji cyklicznego estru prowadzonej w obecności alkoholu propargilowego (Rys. 4.).



Rys. 4. Poliestry zawierające wiązania nienasycone w końcowej grupie wprowadzone za pomocą inicjatora³⁵.

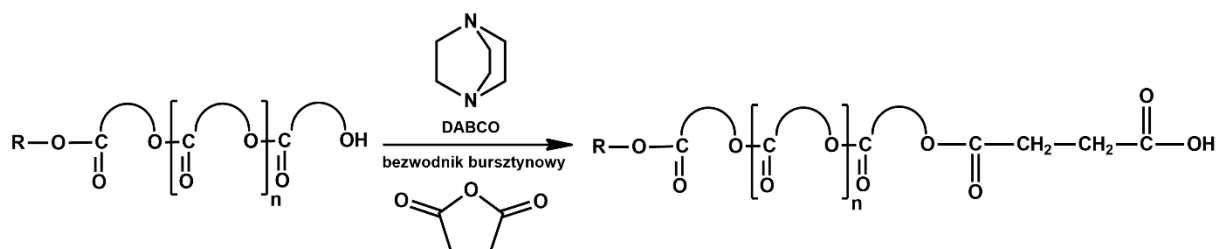
Istnieje szeroka biblioteka związków chemicznych zawierających określone grupy funkcyjne, które znajdują zastosowanie jako inicjatory w procesie polimeryzacji LA-u bądź CL-u (Rys. 5.).



Rys. 5. Biblioteka inicjatorów wykorzystywanych w polimeryzacji LA, zawierających określone grupy funkcyjne: A) metakrylan 2-hydroksyetylu (HEMA), B) 2-hydroksyetyloakrylan (HEA), C) 2-hydroksyetylo-2-bromo-2-metylopropanian (HBMP) lub 2-hydroksyetylo- α -bromopropionian (HEBP), D) alkohol propargilowy, 3-butyn-1-ol, 3-butyn-2-ol i 1-oktyn-3-ol, E) norborneny z jedną lub dwiema grupami alkoholowymi, F) 2-ureido-4(1H)-pyrimidynon (UPy), G) 2',3'-O-izopropylidyna-urydyna, H) glicydol⁵³.

Przykładowo, zastosowanie 2-ureido-4(1H)-pyrimidynonu (UPy) jako inicjatora polimeryzacji LA, pozwala na otrzymanie polimeru posiadającego w łańcuchu specjalne ugrupowanie, zdolne do tworzenia silnych wiązań wodorowych⁴⁷, natomiast użycie kwasu cholowego w tej roli prowadzi do otrzymania PLA o właściwościach promujących adhezję i proliferację komórek fibroblastów mysich 3T3 oraz ludzkich komórek śródbłona ECV304⁴⁹. Dodatkowo, przy użyciu α -aminokwasów, L-argininy lub L-cytruliny zainicjowano polimeryzację LA i ϵ -CL, otrzymując PLA i PCL o potencjalnym działaniu wspierającym odporność organizmu, regulującym uwalnianie hormonów, oraz wpływającym na rozluźnienie naczyń krwionośnych⁴⁸.

Inną metodą chemicznej modyfikacji są reakcje, polegające na modyfikacji obecnych hydroksylowych grup końcowych w łańcuchu polimeru co pozwala na wprowadzenie innych, pożądanych grup funkcyjnych do łańcucha makrocząsteczek (Rys. 6.)⁵⁰.

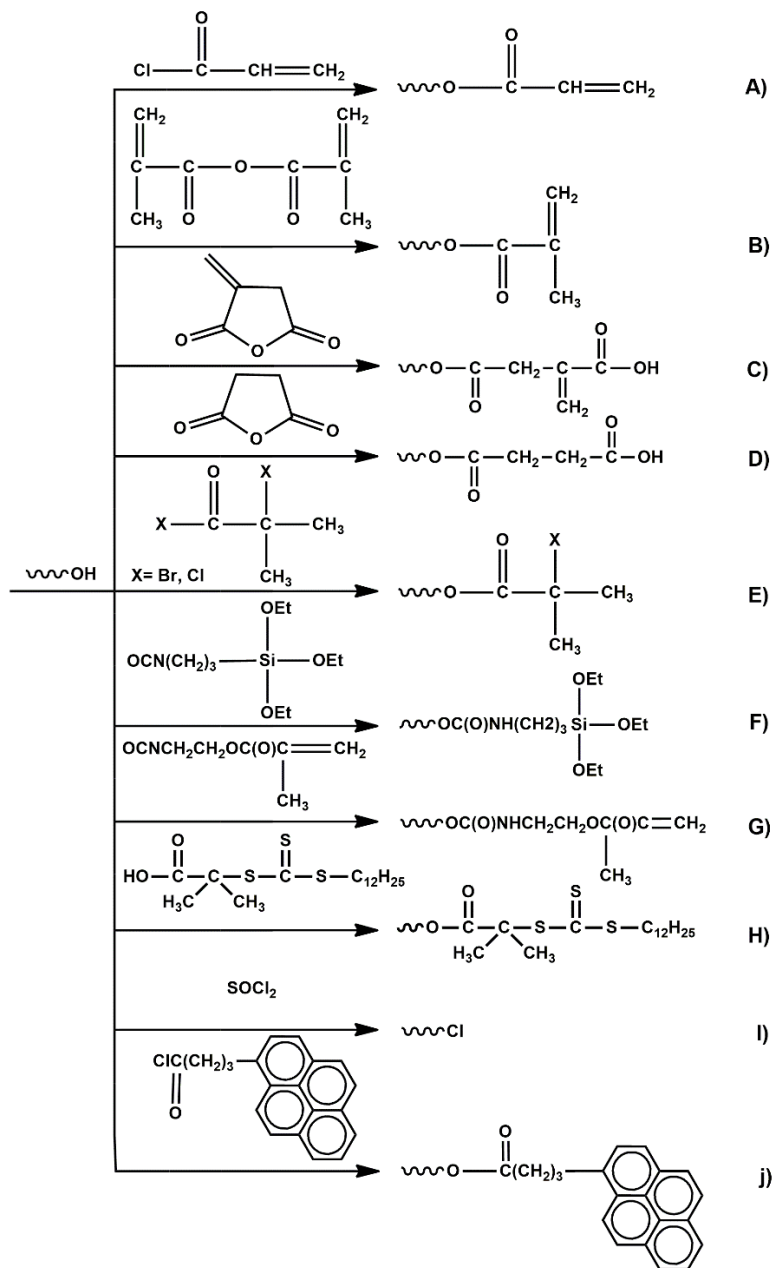


Rys. 6. Poliester zawierający końcową grupę funkcyjną wprowadzoną poprzez estryfikację bezwodnikiem bursztynowym⁵⁰.

Przykładem takiej reakcji jest estryfikacja grupy hydroksylowej z zastosowaniem bezwodnika bursztynowego i DABCO jako katalizatora. W tym przypadku, zmodyfikowanie grup hydroksylowych PLA-u grupami karboksylowymi pozwoliło na zwiększenie termicznej stabilności gwieździstych polilaktydów zwiększając maksymalną temperaturę rozkładu polimerów o 30 °C w porównaniu do gwieździstych PLA-ów zakończonych grupami hydroksylowymi⁵⁰. Ponadto, zastąpienie grupy -OH, grupami -NH₂ lub -Cl, umożliwiło zwiększenie stabilności termicznej PLA o 60 °C⁵¹. Wprowadzenie grupy -NH₂ w miejsce grupy -OH w polikaprolaktonie poprawiło biokompatybilność materiału względem ludzkich komórek śródbłona, promując ich adhezję i proliferację⁵².

Ponadto, zastosowano szereg związków posiadających pożądane grupy funkcyjne, umożliwiające modyfikację poliesterów na etapie post-polimeryzacyjnym, poprzez reakcję z końcowymi grupami hydroksylowymi obecnymi w łańcuchu makrocząsteczki (Rys. 7). Tego typu podejście pozwoliło na precyzyjne dostosowanie struktury i właściwości polilaktydu, co jest szczególnie istotne w kontekście zastosowań biomedycznych i inżynierii materiałowej⁵³.

Warto również dodać, iż metodę modyfikacji grup końcowych stosuje się głównie dla poliestrów o małej i średniej masie molowej, w przeciwieństwie do polimerów o dużej masie molowej, w których wpływ grup końcowych na właściwości polimeru jest minimalny, ze względu na ich niewielki udział molowy w polimerze⁵⁴.



Rys. 7. Biblioteka związków wykorzystywanych w reakcji post-polimeryzacji PLA, zawierających określone grupy funkcyjne: A) chlorek akryloilu, B) bezwodnik metakrylowy (MAAH), C) bezwodnik itakonowy, D) bezwodnik bursztynowy, E) bromek α -bromoizobutyrylu lub chlorek 2-chloro-2-metylopropanoilu, F) (3-izocyjanianopropylo)trietoksylan, G) izocyjanian metakryloiloxyetylu, H) S-1-Dodecylo-S'-(α,α' -dimetylo- α'' -kwas octowy) tritiowęglan (DDACT), i) chlorek tionylu, j) chlorek kwasu 4-(1-pireno)butanowego⁵³.

1.4. Kowalencyjne sieci polimerowe z PiPOx

Kowalencyjne sieci polimerowe to złożone, rozgałęzione struktury w których liniowe łańcuchy polimerów połączone są między sobą trwałymi wiązaniami chemicznymi⁵⁵. Otrzymane w ten sposób materiały polimerowe charakteryzują się lepszą stabilnością wymiarową, wytrzymałością mechaniczną i stabilnością termiczną, w porównaniu do ich liniowych odpowiedników gdyż w rezultacie wytworzenia kowalencyjnych węzłów nie tracą swojej stabilności strukturalnej podczas działania czynników zewnętrznych. Wzajemne kowalencyjne powiązanie łańcuchów w sieciach nadaje im najbardziej charakterystyczną właściwość jaką jest odporność na rozpuszczanie i zdolność do pęcznienia w kompatybilnych rozpuszczalnikach⁵⁶. Właściwości fizykochemiczne sieci polimerowych mogą być regulowane przez dobór elementów budulcowych jak również gęstość rozmieszczenia węzłów⁵⁷⁻⁵⁹. Szczególnie interesujące są na przykład sieci amfifilowe uzyskiwane przez kowalencyjne związanie łańcuchów hydrofilowych i hydrofobowych. Otrzymane w ten sposób materiały stanowią specjalistyczną klasę sieci zdolnych do interakcji i pęcznienia zarówno w hydrofilowym, jak i hydrofobowym środowisku^{56,60}.

Obecnie jednym z szeroko stosowanych rodzajów sieci polimerowych są hydrożele które charakteryzują się zdolnością do pochłaniania dużych ilości wody, bez utraty stabilności strukturalnej. Hydrożele mogą być wykorzystywane jako systemy dostarczania leków, filtry do wody, opatrunki, rusztowania do hodowli komórkowych, czy jako materiał w inżynierii tkankowej². Tradycyjne metody pozwalające na otrzymanie sieci polimerowych zawierających trwałe, kowalencyjne węzły wykorzystują sprzęganie łańcuchów polimerowych wyposażonych w odpowiednie grupy funkcyjne, (ko)polimeryzację telechelicznych makromonomerów oraz multifunkcyjnych monomerów⁶¹⁻⁶⁴. Jednakże stosowanie tych metod wiąże się z koniecznością wcześniejszej funkcjonalizacji polimerów. Na przykład, aby uzyskać sieci oparte na hydrofilowych PEG-ach w wyniku rodnikowej polimeryzacji, wymagana jest obecność grup nienasyconych np. (akrylowych, winylowych itp.) w łańcuchu polimeru co często uzyskuje się przy stosowaniu reagentów wykazujących toksyczne działanie⁶¹⁻⁶³. Dodatkowo, tego rodzaju reakcja sieciowania jest przeprowadzana w obecności związków chemicznych, które często są toksyczne co wymusza intensywne i czasochłonne doczyszczanie otrzymanych materiałów. Skutkuje to znacznym wydłużeniem procesu otrzymywania sieci i dodatkowymi kosztami produkcji^{61,62}. Ponadto wprowadzone grupy funkcyjne mogą mieć negatywny wpływ na stabilność chemiczną polimeru, prowadząc do jego przyspieszonej degradacji w podwyższonej temperaturze czy

w skutek działania wilgoci⁵¹. Dlatego poszukuje się alternatywnych, biologicznie nieszkodliwych metod, w których proces sieciowania może zostać przeprowadzony *in situ*, bez powstawania toksycznych produktów ubocznych.

W związku z tym PiPOx jest odpowiednim polimerem do otrzymania biozgodnych, zdolnych do pęcznienia w wodzie, kowalencyjnie usieciowanych materiałów polimerowych o potencjalnym zastosowaniu w biomedycynie. Obecność reaktywnego pierścienia oksazoliny w łańcuchu bocznym polimeru pozwala na otrzymanie kowalencyjnie usieciowanych materiałów, na drodze prostej reakcji addycji¹⁹. Stosując proste, nietoksyczne, krótkie kwasy di-karboksylowe o różnej długości łańcucha jako segmenty sieciujące PiPOx, otrzymano serię hydrożeli różniących się stopniem pęcznienia w wodzie¹⁹. Wykorzystanie tego typu kwasów do sieciowania PiPOx prowadzi do powstania sieci o słabych właściwościach mechanicznych. Zastosowanie specjalnie zaprojektowanego, di-karboskylowego kwasu pillar[5]arenowego do sieciowania PiPOx-y⁶⁵, umożliwiło wprowadzenie przestrzenie rozbudowanych jednostek do struktury sieci, poprawiając właściwości mechaniczne otrzymanych sieci, między innymi odporność na ściskanie i rozciąganie oraz rozpraszanie energii. Uzyskany materiał wykazał również potencjał jako adsorbent w procesach oczyszczania wody, w wyniku adsorpcji fenoli oraz barwników (błękit metylenowy i czerwień metylowa). Dodatkowo, PiPOx zawierający fluorouracyl umożliwił opracowanie nośnika leku o kontrolowanym procesem uwalniania substancji aktywnej, który można wykorzystać w terapii nowotworowej, poprzez bezpośrednie wstrzyknięcie w obszar guza⁶⁶.

2. Cel pracy

Sieci polimerowe ze względu na specyficzną strukturę i właściwości są przedmiotem szerokich badań o charakterze poznawczym i aplikacyjnym. Jak wspomniano we wstępie szczególnie poszukuje się układów, w których reakcje prowadzące do sieciowania można prowadzić w stosunkowo prostych układach bez konieczności stosowania katalizatorów i bez generowania toksycznych produktów ubocznych.

Celem pracy doktorskiej było otrzymanie nowej klasy wielofunkcyjnych sieci polimerowych składających się z hydrofilowych bloków poli(2-izopropenylo-2-oksazoliny) (PiPOx) i wybranych polimerowych segmentów sieciujących poli(tlenku etylenu), polilaktydu oraz polikaprolaktonu o zróżnicowanej charakterystyce fizykochemicznej. Zakładano, że zastosowanie reaktywnych bloków sieciujących charakteryzujących się różnymi wartościami temperatury zeszklenia (T_g), i temperatury topnienia (T_m) oraz powinowactwem do wody pozwoli na otrzymanie kowalencyjnych sieci segmentowych o regulowanych właściwościach mechanicznych i zróżnicowanym charakterze hydrofobowo-hydrofilowym.

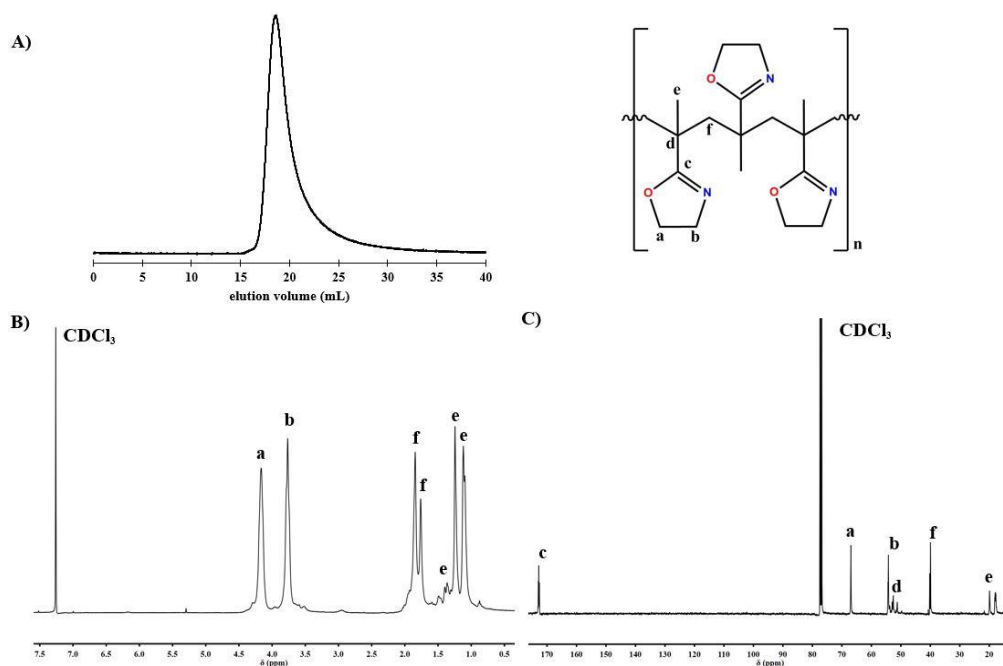
W ramach pracy zostały zrealizowane następujące zadania badawcze:

- Synteza poli(2-izopropenylo-2-oksazoliny) z wykorzystaniem polimeryzacji rodnikowej.
- Synteza polimerowych segmentów sieciujących zawierających karboksylowe grupy końcowe o różnych masach molowych.
- Otrzymanie i charakterystyka sieci z poli(2-izopropenylo-2-oksazoliny) i poli(tlenku etylenu)
- Otrzymanie i charakterystyka sieci z poli(2-izopropenylo-2-oksazoliny) i poliestrów
- Otrzymanie i charakterystyka porowatych sieci z poli(2-izopropenylo-2-oksazoliny) i poliestrów
- Zbadanie potencjału aplikacyjnego otrzymanych materiałów w różnorodnych obszarach jako:
 - Hydrożele antybakteryjne
 - Podłoża do hodowli komórek
 - Sorbenty zanieczyszczeń
 - Podłoża do hodowli roślin

3. Opis badań

3.1. Synteza poli(2-izopropenylo-2-oksazolinylu)

Pierwszym etapem pracy było otrzymanie PiPOx na drodze rodnikowej polimeryzacji stosując AIBN jako inicjator^{8,15}. Polimeryzację rodnikową wybrano ze względu na dobrze poznany i opisany w literaturze mechanizm wzrostu makrocząsteczki, który jest technicznie prostszy do przeprowadzenia w porównaniu z innymi metodami polimeryzacji^{10–14}. Dodatkowo polimeryzacja rodnikowa nie wymaga skomplikowanego i wieloetapowego procesu oczyszczania reagentów, co ułatwia cały proces syntezy i obniża koszty wytworzenia polimeru. Proces polimeryzacji rodnikowej monomeru prowadzono w masie, w temperaturze 60 °C, osiągając konwersję 97% po 24h. Otrzymano polimer o masie molowej $M_n = 140\,000$ g/mol i współczynnik dyspersji $\bar{D} = 1.75$ (według chromatografii SEC prowadzonej w wodzie, detektor MALLS) (Rys. 8.).



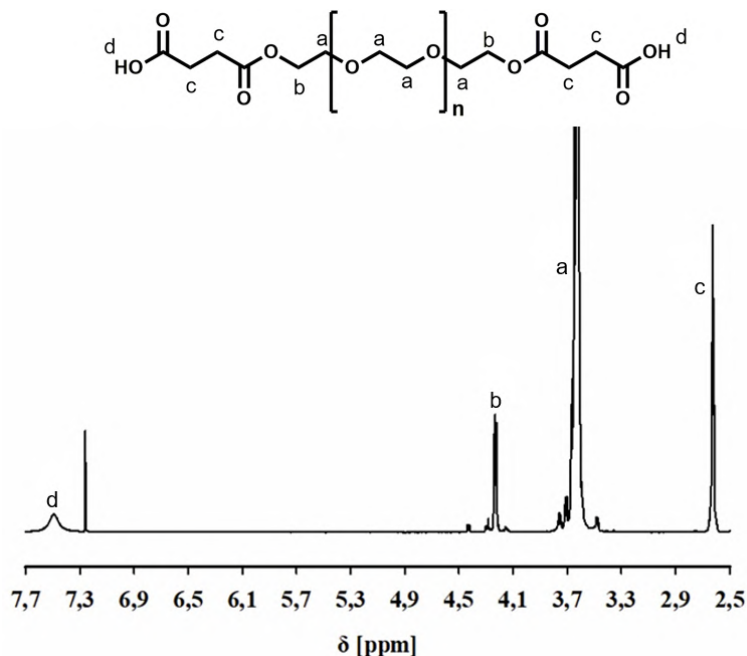
Rys. 8. Charakterystyka PiPOx: A) chromatogram SEC (H₂O), B) widmo ¹H NMR, C) widmo ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃).

Strukturę polimeru potwierdzono za pomocą metod spektroskopowych. W widmach ¹H-NMR oraz ¹³C-NMR zaobserwowano obecność sygnałów charakterystycznych dla łańcucha węglowego i zamkniętego pierścienia oksazolinylu (Rysunek 8B i 8C). W widmie FT-IR potwierdzono obecność charakterystycznych sygnałów pochodzących od pierścienia oksazolinylu przy wartościach 1651 cm⁻¹ (-C=N) oraz 1118 cm⁻¹ (-C-O). Dodatkowo właściwości termiczne polimeru scharakteryzowano za pomocą TGA i DSC. Na termogramie TGA zaobserwowano szeroki pik degradacji PiPOx w zakresie od 200 do 470 °C. Otrzymany polimer charakteryzował

się amorficzną strukturą, na co wskazuje brak pików T_m . Analizy potwierdziły otrzymanie reaktywnego, hydrofilowego polimeru o założonej strukturze. Przeprowadzone badania i uzyskane wyniki zostały opisane w publikacji P1.

3.2. Synteza polimerowych bloków sieciujących (HOOC-poli(tlenek etylenu)-COOH, HOOC-polilaktyd-COOH, HOOC-polikaprolakton-COOH)

Kluczowym etapem pracy było przygotowanie dobrze zdefiniowanych segmentów sieciujących zawierających reaktywne grupy karboksylowe zdolne do addycji do pierścienia oksazoliny. W tym celu wybrano trzy polimery o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych: PLA, PCL oraz PEO, dla których przeprowadzono modyfikację grup końcowych za pomocą bezwodnika bursztynowego. Związek ten umożliwił wprowadzenie grup karboksylowych na drodze estryfikacji i otrzymanie telechelicznych polimerów, które pełniły rolę wielkocząsteczkowych rozgałęziaczy. W przypadku PEO-u przeprowadzono proces enzymatycznej modyfikacji hydroksylowych grup końcowych przy użyciu bezwodnika bursztynowego i enzymu lipaza B z *Candida antarctica* (CALB) w roli biokatalizatora. Otrzymany reaktywny polimer PEO zawierający na obu końcach łańcucha grupy -COOH scharakteryzowano za pomocą ^1H -NMR (Rys. 9.), oraz za pomocą FT-IR.



Rys. 9. Widmo ^1H NMR di-karboksylowego poli(tlenku etylenu) (HOOC-PEO-COOH).

W widmie ^1H NMR liniowego HOOC-PEO-COOH, zaobserwowano sygnał w zakresie 2.6 ppm świadczący o obecności grup $\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COOH}$ pochodzących od otwartego bezwodnika bursztynowego. Sygnał przy przesunięciu 4.2 ppm odpowiada zestryfikowanej grupie

-OH w PEO. Dodatkowo sygnał obecny w widmie FT-IR, w zakresie 1721 cm^{-1} pochodzący od grupy karbonylowej (-C=O) potwierdził otrzymanie zmodyfikowanego liniowego polieteru: HOOC-PEO-COOH.

W przypadku poliestrów, w pierwszym etapie zsyntetyzowano liniowe polimery zawierające końcowe grupy -OH, wykorzystując kationową polimeryzację z otwarciem pierścienia laktydu lub kaprolaktonu, prowadzonej w warunkach zapewniających powstanie dobrze zdefiniowanych produktów^{33–35}. Zastosowano 1,6-heksandiol jako inicjator, kwas trifluorometanosulfonowy jako katalizator, chlorek metylenu jako rozpuszczalnik a syntezę przeprowadzono w temperaturze pokojowej. Tak otrzymane polimery, zakończone grupami hydroksylowymi zmodyfikowano bezwodnikiem bursztynowym w obecności DABCO jako katalizatora⁶⁷. Zanik sygnałów pochodzących od końcowych grup hydroksylowych potwierdził przeprowadzenie procesu estryfikacji z wysoką wydajnością. Masy molowe oraz stopień funkcjonalizacji polimerów zawarto w Tab. 1.

Tab. 1. Charakterystyka polimerowych bloków sieciujących (HOOC-poli(tlenek etylenu)-COOH, HOOC-polilaktyd-COOH, HOOC-polikaprolakton-COOH).

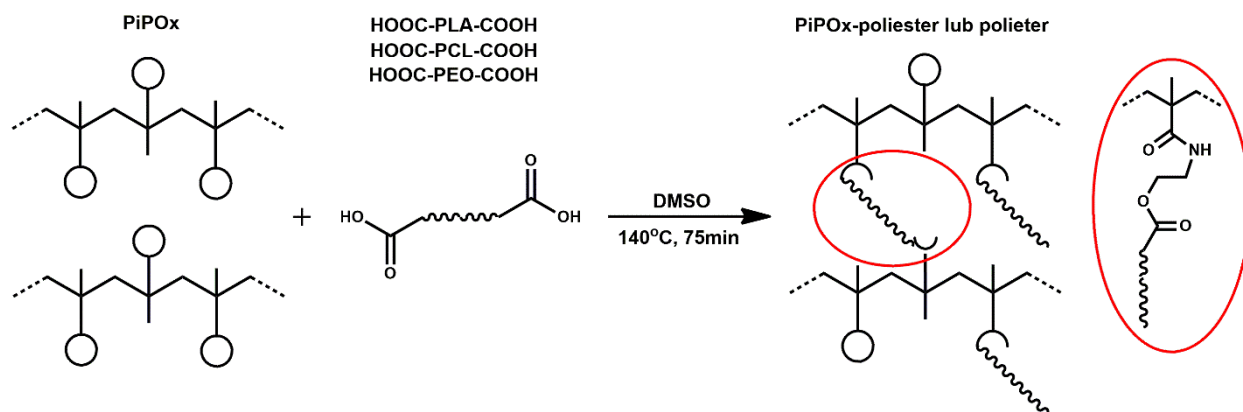
Polimer	M_n g/mol (NMR)	$\bar{D}$	% funkcjonalizacji	T_g (°C)	T_m (°C)
HOOC-PEO ₄₀₀ -COOH ^a	500	1.2	99	-65	-
HOOC-PLA ₃₀₀₀ -COOH	3 100	1.3	94	39	130
HOOC-PLA ₆₀₀₀ -COOH	5 500	1.3	95	49	152
HOOC-PCL ₃₀₀₀ -COOH	3 200	1.3	93	-55	47
HOOC-PCL ₆₀₀₀ -COOH	5 500	1.4	98	-58	51

^a Dla czytelności przyjęto kod: grupa funkcyjna-polimer_{masa molowa}-grupa funkcyjna. Skróty PEO, PLA oraz PCL oznaczają kolejno poli(tlenek etylenu), polilaktyd oraz polikaprolakton. Na przykład HOOC-PEO₃₀₀₀-COOH oznacza poli(tlenek etylenu) o masie molowej $M_n = 500\text{ g/mol}$, zakończony grupami karboksylowymi na obu końcach łańcucha.

Oznaczony wysoki stopień funkcjonalizacji makrocząsteczek (>93%) wskazuje na efektywny przebieg procesu estryfikacji umożliwiający zastąpienie prawie każdej końcowej grupy hydroksylowej w makrocząsteczce wymaganą do reakcji addycji z pierścieniem oksazoliną grupą karboksylową. Otrzymane w ten sposób reaktywne bloki różniące się pod względem właściwości fizykochemicznych i mas molowych były stosowane w kolejnym etapie badań do syntezy kowalencyjnych sieci segmentowych. Przeprowadzone badania i uzyskane wyniki zostały opisane w publikacji P1 i P2.

3.3. Synteza i charakterystyka kowalencyjnych sieci polimerowych

Kowalencyjne sieci polimerowe o segmentowej strukturze otrzymano poprzez reakcję addycji pomiędzy pierścieniami bocznymi PiPOx-u, a grupami karboksylowymi zlokalizowanymi na obu końcach łańcuchów polieteru i poliestrów (Rys. 10.). Proces ten prowadził do łączenia się bloków polimerowych z wytworzeniem kowalencyjnych węzłów sieci zawierających wiązania estrowo-amidowe¹⁹.



Rys. 10. Otrzymywanie kowalencyjnych sieci polimerowych z PiPOx i wybranymi blokami sieciującymi.

Badany układ reakcyjny pozwolił na otrzymanie sieci polimerowych o zadanym składzie i strukturze, który można było kontrolować poprzez odpowiedni dobór segmentów (bloków hydrofilowych lub hydrofobowych) oraz gęstość wytworzonych węzłów w sieci. W pracy założono, że połączenie polimerów różniących się powinowactwem do wody umożliwi uzyskanie nowej generacji amfifilowych, segmentowanych sieci polimerowych, w których znacznie dłuższe hydrofilowe łańcuchy polimerowe PiPOx-u zostaną usieciowane przez krótsze łańcuchy poliestrowe. Interesujące było również zbadanie możliwości wprowadzenia porowatości do otrzymywanych materiałów w celu poprawy ich właściwości.

3.3.1. Otrzymywanie sieci z poli(2-izopropenylo-2-oksazoliną) i poli(tlenku etylenu)

W kolejnym etapie pracy zsyntetyzowano nieporowate, kowalencyjne sieci polimerowe, zbudowane z dwóch hydrofilowych bloków budulcowych, poli(2-izopropenylo-2-oksazoliną) i poli(tlenku etylenu), który pełnił rolę makrocząsteczkowego czynnika sieciującego PiPOx. Wcześniej, w literaturze opisywano sieciowanie PiPOx-u zachodzące w wyniku reakcji addycji między pierścieniami oksazolinowymi i reagentami zawierającymi grupy karboksylowe, głównie dla alifatycznych kwasów organicznych mających od 4 do 10 atomów węgla, co w rezultacie pozwalało wszczepić krótkie łańcuchy o charakterze hydrofobowym do hydrofilowego

polimeru¹⁹. Przedstawione w pracy doktorskiej zastosowanie reaktywnego polimeru do syntezy sieci nie było dotychczas opisane i konieczne było dobranie odpowiednich warunków umożliwiających wydajną syntezę. Przeprowadzono więc optymalizację warunków procesu sieciowania z uwzględnieniem typu rozpuszczalnika, udziału wagowego polimerów, stosunku grup karboksylowych do pierścieni oksazolin, temperatury reakcji i czasu reakcji. Ustalono, że do otrzymania materiału o stabilnej strukturze, która nie ulegała rozpadowi podczas pęcznienia w wodzie, stosując PEO o masie cząsteczkowej $M_n = 500$ g/mol, syntezę należy prowadzić przy stosunku grup karboksylowych do pierścieni oksazolin wynoszącym 15 % mol, w temperaturze 140 °C, w czasie 45 minut.

W celu otrzymania hydrożeli o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych do struktury sieci wprowadzono dodatkowo kowalencyjnie związane substancje aktywne o charakterze antybakteryjnym: kwas cynamonowy (KC) i kwas benzoesowy (KB), co było możliwe ze względu na obecną w cząsteczce grupę karboksylową. W celu otrzymania sieci ze związkiem biobójczym, który nie był kowalencyjnie sprzężony z siecią i pozostawał jako wolny składnik w usieciowanej strukturze PiPOx-PEO, sieciowanie prowadzono w obecności eugenolu (EU). Zastosowane związki małowcząsteczkowe są szeroko stosowane w przemyśle kosmetycznym i spożywczym jako konserwanty ze względu na biobójcze działanie względem bakterii i grzybów^{68–70}.

Uzyskane wyniki dotyczące zawartości frakcji użelowanej i stopnia spęcznienia w wodzie (Tab. 2.) potwierdziły, że zastosowana metodologia umożliwia otrzymanie kowalencyjnych sieci PiPOx-PEO, jak również sieci zmodyfikowanych, z dodatkiem substancji biologicznie aktywnych (PiPOx-PEO-KC, PiPOx-PEO-KB, PiPOx-PEO/EU).

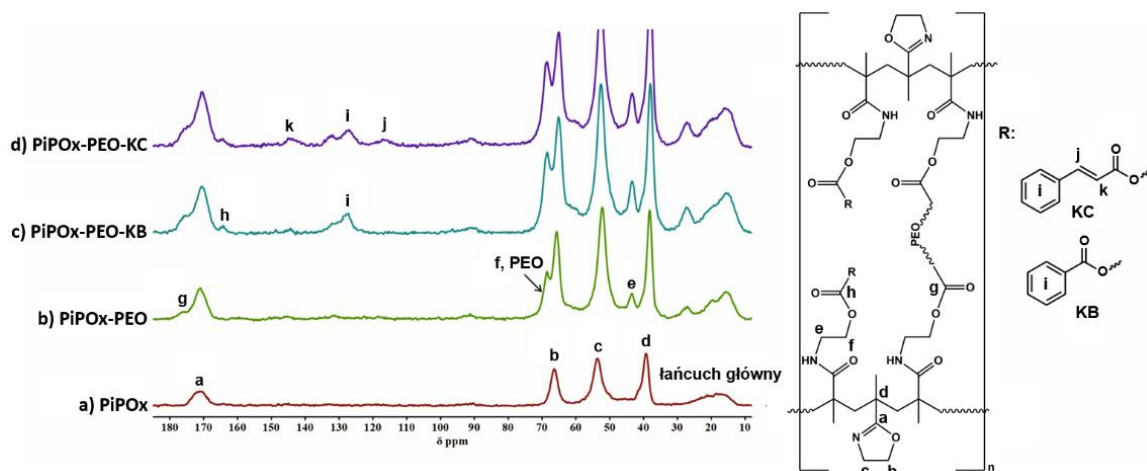
Tab. 2. Synteza kowalencyjnych sieci z poli(2-izopropenylo-2-oksazolin) i poli(tlenku etylenu) (PiPOx-PEO) oraz zmodyfikowanych sieci zawierających związane substancje aktywne (PiPOx-PEO-KC, PiPOx-PEO-KB) lub wolny eugenol (PiPOx-PEO/EU)

Sieć	zawartość żelu (wt. %)	stopień pęcznienia (%)
PiPOx-PEO	97	>200
PiPOx-PEO-KC	96	150
PiPOx-PEO-KB	94	140
PiPOx-PEO/EU	90 ^a	>200

^a W przypadku PiPOx-PEO/EU, niższa zawartość frakcji nierozpuszczalnej wynikała z wyekstrahowania eugenolu ze struktury materiału podczas procesu oczyszczania.

Oznaczona zawartość frakcji żelowej dla większości otrzymanych sieci przekraczała 94 %, co świadczyło o wysokiej wydajności procesu sieciowania między reaktywnymi polimerami w zastosowanych warunkach.

W celu oznaczenia składu otrzymane sieci, oczyszczone przez ekstrakcję, scharakteryzowano za pomocą ^{13}C CP-MAS NMR (Rys. 11.) oraz na podstawie analizy widm FT-IR.



Rys. 11. Widma ^{13}C CP-MAS NMR dla: a) PiPOx, b) PiPOx-PEO, d) PiPOx-PEO-KB, e) PiPOx-PEO-KC.

W widmie ^{13}C CP-MAS NMR zaobserwowano nowe sygnały w zakresie 66 ppm i 44 ppm pochodzące od grup $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, powstałych po przyłączeniu łańcuchów PEO do pierścienia oksazoliny. Grupa karbonylowa z nowo utworzonego wiązania estrowego pojawia się w zakresie 175 ppm. Ponadto, zaobserwowano sygnały przy przesunięciu 130 ppm pochodzą od pierścienia aromatycznego wprowadzonych substancji biologicznie aktywnych, KC i KB. W przypadku sieci (wyekstrahowanych) przygotowanych z EU nie stwierdzono charakterystycznych sygnałów dla tej substancji, co świadczy iż eugenol nie został kowalencyjnie związany z siecią, lecz pozostał jako wolny związek. W pozostałych materiałach nastąpiło włączenie substancji aktywnej do struktury sieci. Analiza widm FT-IR wykazała obecność sygnałów w zakresie 1520 cm^{-1} , przypisanych pasmu amidowemu ($-\text{C}-\text{NH}$), co potwierdza utworzenie wiązań estrowo-amidowych w strukturze sieci polimerowych. Drgania rozciągające grup karbonylowych, zarówno w nowo powstałych wiązaniach estrowych, jak i tych pochodzących z PEO, zaobserwowano przy 1721 cm^{-1} . Analizy ^{13}C CP-MAS NMR i FT-IR potwierdziły skuteczne otrzymanie sieci polimerowych o składzie zgodnym ze składem mieszaniny reakcyjnej.

Dla otrzymanych sieci oznaczono stopień spęczenia w wodzie, który jest kluczowym parametrem dla planowanych, potencjalnych zastosowań biomedycznych, takich jak kontrolowane uwalnianie substancji biologicznie aktywnych w hydrożelowych materiałach opatrunkowych. Badane sieci wykazały stopień spęczenia przekraczający 140 %, co pozwala na zaklasyfikowanie ich jako materiały hydrożelowe. Co istotne, otrzymane hydrożele zachowywały stabilność strukturalną, nie ulegając rozpuszczeniu w wodzie. Badania mechaniczne i reologiczne spęcznionych hydrożeli potwierdziły odporność materiału na niewielkie odkształcenia mechaniczne i wykazały odpowiednią wytrzymałość mechaniczną pozwalającą na ich praktyczne wykorzystanie. Przeprowadzone badania i uzyskane wyniki zostały opisane w publikacji P1.

3.3.2. Otrzymywanie sieci z poli(2-izopropenylo-2-oksazolin) i poliestrowych bloków sieciujących

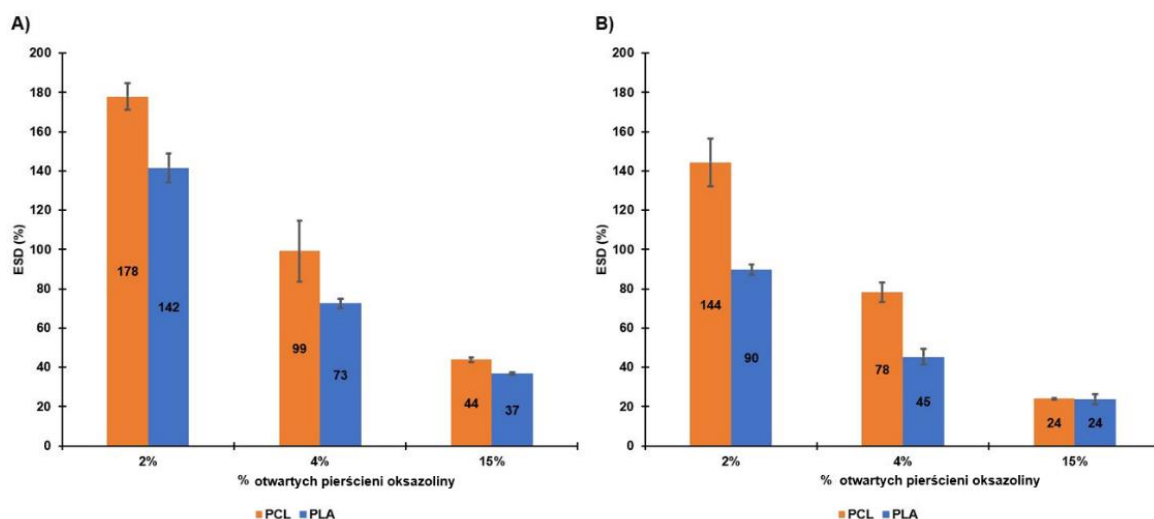
W kolejnym etapie pracy do sieciowania PiPOx wykorzystano liniowe łańcuchy poliestrów (PLA lub PCL) odpowiednio sfunkcjonalizowane na końcach łańcucha grupami -COOH. Podstawą doboru reagentów była hipoteza, że połączenie hydrofilowych bloków PiPOx z hydrofobowymi i biodegradowalnymi poliestrowymi blokami budulcowymi pozwoli na otrzymanie materiału o właściwościach amfifilowych^{56,60}, który będzie wykazywał zdolność do pęczenia zarówno w rozpuszczalnikach organicznych, jak i w wodzie. Aby uzyskać sieci o różnorodnej topologii i składzie w roli rozgałęziaczy zastosowano bloki poliestrowe o różnej masie cząsteczkowej: $M_n = 3\ 000\text{ g/mol}$ i $6\ 000\text{ g/mol}$. Dodatkowo zmieniano stosunek grup karboksylowych do pierścieni oksazolinowych $[-\text{COOH}]/[\text{iPOx}] = 2, 4, 15\%$ w celu zmiany stopnia usieciowania. Proces sieciowania przeprowadzono zgodnie z metodologią zastosowaną dla układów zawierających poli(tlenek etylenu) poprzez rozpuszczenie reagentów w dimetylosulfotlenku (DMSO) i umieszczenie mieszaniny reakcyjnej w 140°C na czas zależny od rodzaju jak i długości łańcucha poliestru (Tab. 3.).

Tab. 3. Synteza kowalencyjnych sieci z poli(2-izopropenylo-2-oksazoliny) i wybranych poliestrów

sieć	% otwartych pierścieni oksazoliny	czas sieciowania (min)	zawartość estrów (mol %)	zawartość żelu (wt. %)
PLA ₃₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-2 ^a	2	65	17	95
PLA ₃₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-4	4	75	29	94
PLA ₃₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-15	15	130	61	92
PLA ₆₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-2	2	105	29	93
PLA ₆₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-4	4	120	46	91
PLA ₆₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-15	15	130	76	85
PCL ₃₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-2	2	65	21	95
PCL ₃₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-4	4	75	34	93
PCL ₃₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-15	15	150	66	91
PCL ₆₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-2	2	105	34	93
PCL ₆₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-4	4	120	51	90
PCL ₆₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-15	15	150	80	85

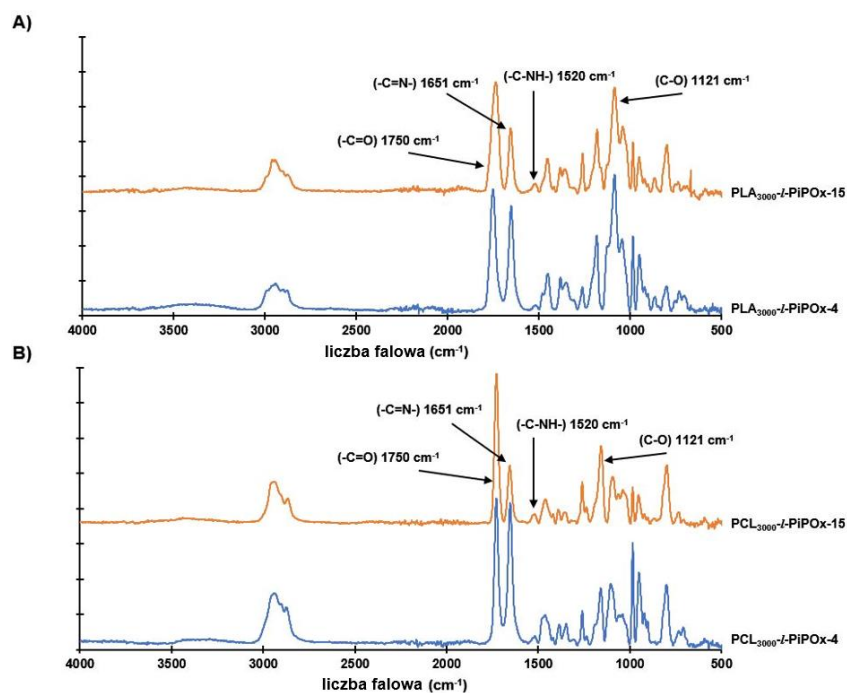
^a Dla czytelności przyjęto powszechnie stosowaną nomenklaturę PoliA-*l*-PoliB, gdzie „*l*” oznacza „połączony przez”^{71,72}. Dodatkowo zawarto informację o procentowej ilości otwartych pierścieni oksazoliny oraz masy molowej segmentu sieciującego. Na przykład kod PLA₃₀₀₀-*l*-PiPOx-2 oznacza sieć otrzymaną z wykorzystaniem HOOC-PLA₃₀₀₀-COOH o masie molowej $M_n = 3\,000$ g/mol jako segmentu sieciującego PiPOx, przy teoretycznej ilości 2% otwartych pierścieni oksazoliny w sieci.

Następnie oznaczono zawartość frakcji nierozpuszczalnej w celu określenia wydajności sieciowania w badanym układzie. Jak pokazano w Tab. 3, udział żelu był wyższy niż 90% i wyraźnie zależał od wyjściowego składu mieszaniny reakcyjnej. Najwyższą zawartość frakcji żelowej (~95%) stwierdzono w przypadku poliestrów o $M_n = 3\,000$ g/mol stosowanych do sieciowania PiPOx-u przy założonym stopniu otwarcia pierścienia oksazoliny ~2% i 4%. Przy wzroście masy molowej rozgałęziaczy do 6 000 g/mol i zwiększaniu stopnia otwarcia pierścienia oksazoliny do 15%, zawartość frakcji nierozpuszczalnej zmniejszyła się do 85%. Obserwowany spadek zawartości żelu w produktach syntezy może wynikać ze zwiększenia masy molowej poliestrów, co skutkuje zmniejszeniem liczby reaktywnych grup końcowych oraz ograniczeniem ich dostępności w mieszaninie reakcyjnej. Dodatkowo, wzrost lepkości układu może znacząco utrudniać efektywne tworzenie się sieci polimerowej.



Rys. 12. Zależność stopnia spęcznienia sieci w wodzie (ESD) od stopnia otwartych pierścieni oksazoliny oraz długości łańcucha sieciujących poliestrów: A) $M_n = 3000$ g/mol, B) $M_n = 6000$ g/mol.

Obecność poszczególnych bloków budulcowych w strukturze wyekstrahowanych i wysuszonych sieci potwierdzono za pomocą spektroskopii FT-IR (Rys. 13.). W otrzymanych sieciach polimerowych zaobserwowano sygnał odpowiadający drganiom rozciągającym grupy karbonylowej estru przy 1750 cm^{-1} (C=O), natomiast sygnały charakterystyczne dla obecności pierścienia oksazoliny pojawiły się przy 1651 cm^{-1} (drgania rozciągające -C=N-) oraz 1121 cm^{-1} (drgania rozciągające C-O). Dodatkowo, utworzenie wiązań amidowych (C(=O)NH-) pochodzącego od otwartego pierścienia oksazoliny potwierdzono na podstawie występowania słabego pasma przy długości fali 1520 cm^{-1} . Analiza FT-IR wykazały skuteczne otrzymanie sieci polimerowych o składzie zgodnym ze składem wyjściowej mieszaniny reakcyjnej. Zaobserwowano również, że dla badanych próbek intensywność sygnałów pochodzących od poszczególnych jednostek budulcowych silnie zależy od składu wyjściowej mieszaniny. Potwierdzeniem amfifilowego charakteru otrzymanych struktur były wyniki oznaczeń równowagowego stopnia pęcznienia w rozpuszczalnikach nieorganicznych (woda) (Rys. 12.) oraz organicznych, takich jak etanol, dimetyloformamid (DMF) i tetrahydrofuran (THF).



Rys. 13. Widma FT-IR sieci otrzymanych z PiPOx z użyciem (A) HOOC-PLA-COOH oraz (B) HOOC-PCL-COOH jako czynników sieciujących, zakładany stopień sieciowania PiPOx wynosi odpowiednio 4% i 15%.

Właściwości termiczne otrzymanych sieci PLA-*l*-PiPOx i PCL-*l*-PiPOx wyznaczono za pomocą skaningowej kalorymetrii różnicowej oraz analizy termogravimetrycznej. Analiza TGA wykazała, że układ PCL-*l*-PiPOx charakteryzuje się wyższą stabilnością termiczną w porównaniu z PLA-*l*-PiPOx. Zaobserwowane różnice w charakterze rozkładu termicznego wynikają z rodzaju zastosowanego poliestru, który determinuje temperaturę degradacji usieciowanej struktury. W przypadku PLA-*l*-PiPOx degradacja sieci rozpoczyna się w temperaturze 250 °C, podczas gdy termiczny rozkład PCL-*l*-PiPOx obserwujemy się powyżej 300 °C. Analiza DSC została przeprowadzona w celu określenia charakterystyki przemian fazowych badanych sieci. Brak pików topnienia charakterystycznych dla PLA i PCL oraz występowanie jedynie temperatury zeszklenia potwierdziły amorficzną strukturę otrzymanych sieci. Wartości T_g różniły się w zależności od rodzaju i składu sieci, osiągając niższe wartości przy większym udziale poliestrów. Obniżenie wartości T_g do temperatur charakterystycznych dla poliestrów wskazuje na możliwy efekt plastyfikujący otwartych pierścieni oksazolin (15%) obecnych w strukturze materiału.

Przeprowadzone badania mechaniczne wykazały, że spęcnione sieci PLA-*l*-PiPOx charakteryzują się wyższą sztywnością oraz wytrzymałością w porównaniu z analogicznymi sieciami do otrzymania których użyto polikaprolaktonu jako czynnika sieciującego. Różnice te mogą wynikać z odmiennych temperatur zeszklenia oraz większej sztywności segmentów poliestrowych w strukturze PLA-u. Odnotowany moduł sprężystości dla próbki PLA₃₀₀₀-*l*-PiPOx-4

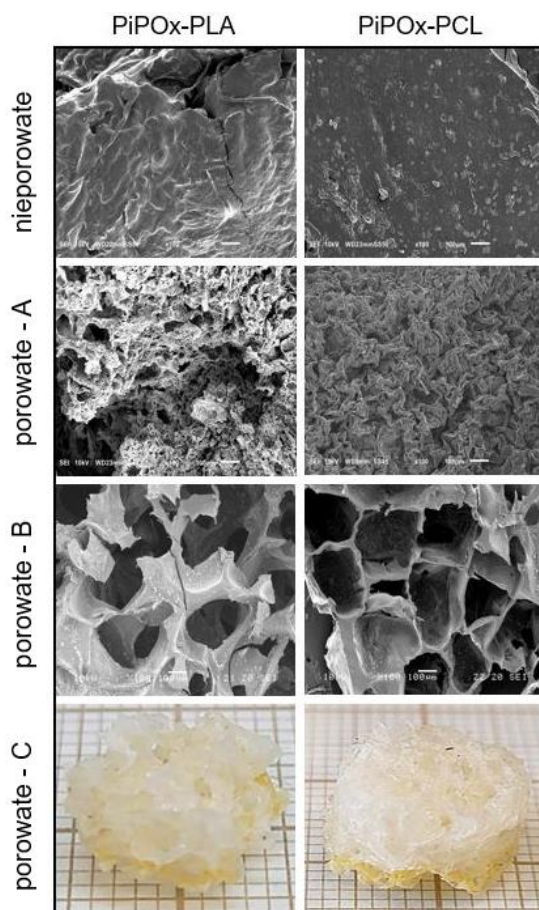
(210 ± 15 kPa) jest zbliżony do wartości typowych dla chrząstki stawowej (0,45 - 0,8 MPa), co sugeruje potencjalne zastosowanie tego typu materiałów jako rusztowań w inżynierii tkanki chrzęstnej⁷³.

W kolejnym etapie potwierdzono biokompatybilność otrzymanych sieci stosując test MTT. Przeprowadzone badania cytotoksyczności hydrożeli wobec komórek fibroblastów mysich linii L929, wykazały biokompatybilność zgodną z normą ISO 10993-5:2009. Otrzymane sieci polimerowe nie wpływały negatywnie na żywotność komórek L929, co stanowiło podstawę do prowadzenia dalszych, bardziej zaawansowanych badań *in vitro*. Przeprowadzone badania i uzyskane wyniki zostały opisane w publikacji P2.

3.3.3. Otrzymywanie porowatych sieci z poli(2-izopropenylo-2-oksazolin) i poliestrowych bloków sieciujących

Po opracowaniu warunków umożliwiających syntezę sieci z reaktywnych prekursorów polimerowych podjęto badania ukierunkowane na modyfikację struktury sieci poprzez wprowadzenie porowatości. Przyjęto założenie, że obecność porów, które wprowadzają puste przestrzenie, wpłynie korzystnie na ostateczne właściwości fizykochemiczne materiałów i poszerzy ich możliwości aplikacyjne. W roli porogenu zastosowano chlorek sodu (NaCl) ze względu na stabilność termiczną tej soli w warunkach przeprowadzania reakcji oraz łatwość usunięcia poprzez jego wymywanie w wodzie. Syntezę prowadzono stosując PiPOx, poliestry o masie cząsteczkowej $M_n = 3\ 000$ g/mol (HOOC-PLA₃₀₀₀-COOH lub HOOC-PCL₃₀₀₀-COOH) oraz trzy rodzaje soli o zróżnicowanej wielkości kryształów (A: 50 - 150 μm , B: 270 - 560 μm oraz C: 3.2 - 6.2 mm). Ocenę metody wytwarzania porowatych sieci rozpoczęto od zbadania efektywności wymywania NaCl z otrzymanych materiałów. W tym celu zastosowano metodę TGA oraz metodę miareczkowania strąceniowego, polegającej na oznaczeniu jonów chlorkowych w roztworze za pomocą azotanu (V) srebra. Brak pozostałości na termogramie TGA w temperaturze 800°C potwierdziło skuteczne usunięcie porogenu z materiału. Ponadto, zastosowana metoda miareczkowania Mohra potwierdziła wyniki otrzymane z analizy TGA wskazując na całkowite usunięcie soli z sieci. Należy również zwrócić uwagę że, obecność porogenu w mieszaninie reakcyjnej nie wpłynęła negatywnie na wydajność sieciowania, a otrzymany materiał charakteryzował się zawartością frakcji nierozpuszczalnej na poziomie 95%.

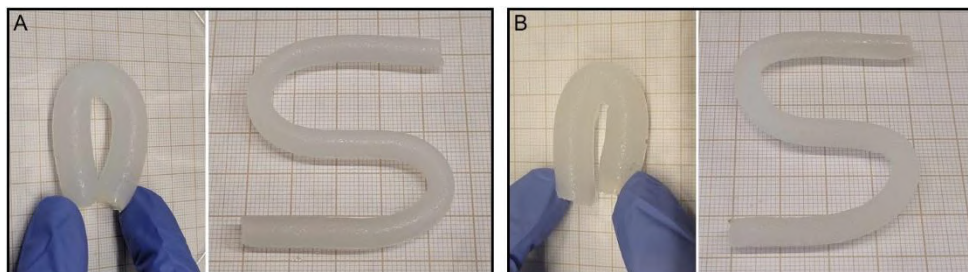
Wyekstrahowane i wysuszone porowate sieci scharakteryzowano za pomocą spektroskopii ^{13}C CP-MAS NMR. Obecność charakterystycznych sygnałów pochodzących od bloków budulcowych sieci zarówno w widmie ^{13}C CP-MAS NMR oraz FT-IR potwierdziło skuteczne otrzymanie porowatych sieci polimerowych o składzie zgodnym ze składem wyjściowej mieszaniny reakcyjnej. Porowate sieci polimerowe wykazywały niższą stabilność termiczną w porównaniu do sieci nieporowatych. Obserwowana różnica może być spowodowana większą powierzchnią całkowitą oraz obecnością licznych pustych przestrzeni w strukturze materiału, które ułatwiają wydzielanie się lotnych produktów rozkładu. Proces ten skutkuje obniżeniem temperatury degradacji⁷⁴. Zastosowanie trzech rodzajów soli o różnej wielkości kryształów (sól A, B i C) pozwoliło na kontrolowanie wielkości porów w otrzymanych materiałach. Morfologie otrzymanych materiałów potwierdzono analizując mikrografie zarejestrowane przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) (Rys. 14.).



Rys. 14. Obrazy SEM sieci PiPOx-poliester: nieporowate oraz porowate, otrzymane w obecności porogenu: A i B.

Zdjęcia cyfrowe sieci PiPOx-poliester przygotowanych w obecności porogenu C.

Zastosowanie różnych rodzajów poliestrów umożliwia uzyskanie zróżnicowanych struktur sieci polimerowych, co jest szczególnie wyraźne przy materiale otrzymanym z użyciem soli B jako porogenu. W zależności od rodzaju poliestru użytego w sieci, obserwowano zmiany w architekturze porów. Sieci PiPOx-PLA, przygotowane z użyciem soli B, wykazywały bardziej otwartą i wzajemnie połączoną strukturę porów, podczas gdy sieci PiPOx-PCL odznaczały się bardziej zamkniętą, heksagonalną porowatością. Zaobserwowano również wpływ wielkości porów na zdolność do absorpcji wody. Materiały przygotowane z zastosowaniem soli A charakteryzowały się stopniem pęcznienia przekraczającym 2 000%, co kwalifikuje je jako tzw. superabsorbenty⁷⁵. Zamiana soli A na sól B i C, powodowała spadek stopnia spęcznienia osiągając najniższe wartości dla materiałów o największych rozmiarach porów. Badania mechaniczne, obejmujące testy odporności materiału na ściskaniu i rozciąganie potwierdziły, że opracowane warunki i metodologia syntezy umożliwiają otrzymanie stabilnych strukturalnie, porowatych sieci o dobrych właściwościach użytkowych. Materiały te można formować w dowolny kształt i wielkość, co stanowi istotną zaletę przy potencjonalnym zastosowaniu jako rusztowania do hodowli komórkowych lub jako implanty wspomagające regenerację tkanki kostnej^{73,76}. Przeprowadzone badania i uzyskane wyniki zostały opisane w publikacji P3.



Rys. 15. Elastyczność i trwałość spęcznionych w wodzie porowatych sieci PiPOx-PLA A) i PiPOx-PCL B).

3.4. Zastosowania otrzymanych sieci polimerowych

W ostatnim etapie badań oceniono potencjał wybranych nieporowatych i porowatych sieci PiPOx-PEO, PiPOx-PLA oraz PiPOx-PCL w różnych zastosowaniach, biorąc pod uwagę specyfikę materiału.

3.4.1. Hydrożele antybakteryjne

Otrzymane nieporowate sieci PiPOx-PEO z dodatkiem substancji biologicznie aktywnych (kwas benzoesowy, kwas cynamonowy, eugenol) lub bez dodatku, poddano badaniom mikrobiologicznym w celu określenia właściwości przeciwdrobnoustrojowych, stosując metodę dyfuzji w agarze i metodę dyfuzji w hodowli płynnej. Do badania wybrano gatunki

drobnoustrojów, które stanowią najczęstszy czynnik zakażeń skóry i tkanek miękkich: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* oraz *E. cloacae*^{77–80}. Zarówno zmodyfikowane, jak i niemodyfikowane substancjami aktywnymi sieci polimerowe wykazywały porównywalną aktywność przeciwdrobnoustrojową, ograniczoną do strefy bezpośredniego kontaktu z podłożem. Wyjątek stanowił hydrożel zawierający eugenol, który wykazywał szersze działanie bakteriostatyczne, hamując wzrost drobnoustrojów również poza strefą kontaktu, co wynikało z dyfuzji eugenolu. Uzyskane wyniki wskazują, że badane hydrożele mają potencjał do zastosowania jako materiały w leczeniu ran lub jako opatrunki zapobiegające infekcjom. Przeprowadzone badania i uzyskane wyniki zostały opisane w publikacji P1.

3.4.2. Podłoża do hodowli komórek

Porowate sieci PiPOx-poliestry, charakteryzujące się modułem sprężystości zbliżonym do modułu sprężystości obserwowanego dla chrząstki stawowej, zostały zastosowane jako rusztowania do wzrostu komórek kostnych. W tym celu do wnętrza porowatych hydrożeli wprowadzono hydroksyapatyt (HA) - biominerał, którego rolą było wspomaganie adhezji i proliferacji ludzkich komórek kostnych (osteoblastów) linii hFOB 1.19. Materiały PiPOx-PLA-HA oraz PiPOx-PCL-HA wykazały pełną biokompatybilność względem ludzkich osteoblastów. Dodatkowo, badania proliferacji komórek kostnych w czasie 7, 14 i 21 dni wykazały, że otrzymane materiały stymulują wzrost komórek kostnych na obu rodzajach sieci. Zaobserwowano jednak istotne różnice w dynamice tego procesu. W przypadku sieci PiPOx-PLA-HA odnotowano wyższe tempo proliferacji komórek. Z kolei na powierzchni sieci PiPOx-PCL-HA komórki przyjmowały charakterystyczny, wydłużony i wrzecionowaty kształt, co może wskazywać na lepsze przyleganie do tego materiału i potencjalnie korzystniejszy wpływ na ich morfologię. Przeprowadzone badania i uzyskane wyniki zostały opisane w publikacji P3.

4. Wyniki nieopublikowane

4.1. Materiały i metody

4.1.1. Materiały

4.1.1.1. Odczynniki chemiczne

- 1,6-heksandiol (97%, Merck, Niemcy)
- 25% roztwór amoniaku (Chempur, Polska)
- AIBN (99%, Merck, Niemcy)

- bezwodnik bursztynowy (99%, Merck, Niemcy)
- bufor Tris-base o pH 8.3 (99%, Merck, Niemcy)
- chloroform (99%, POCH, Polska)
- CuSO₄ (99%, Hopkin&Williams, Anglia)
- DABCO (99%, Merck, Niemcy)
- DCM (99%, POCH, Polska)
- DMSO (99%, POCH, Polska)
- eter dietylowy (99%, POCH, Polska)
- FeCl₃ (99%, Chempur, Polska)
- fiolet krystaliczny (90%, Merck, Niemcy)
- gentamycyna (BioRad, Polska)
- ibuprofen (98%, Polpharma, Polska)
- iPOx (98%, Merck, Niemcy)
- kwas trifluorometanosulfonowy (99%, Merck, Niemcy)
- kwas walproinowy (98%, Fluorochem, Anglia)
- kwaśna fuksyna (70%, Merck, Niemcy)
- kwercetyna (99%, Merck, Niemcy)
- L-laktyd (99%, Purac, Holandia)
- NaCl (Cenos, Polska)
- nystatyna 100 IU (Liofilchem, Włochy)
- podłoże do roślin pokojowych (Geolia, Francja)
- probenecyd (97%, Angene, India)
- sól fizjologiczna (8,5 g/L NaCl, Merck, Niemcy)
- thiuram, (Organika-Sarzyna, Polska)
- tiocyjanian potasu (99%, Merck, Niemcy)

4.1.1.2. Podłoża mikrobiologiczne

- agar tryptozowo-sojowy (TSA, trawiony enzymatycznie kazeinian 15.0 g/L, trawiony enzymatycznie ekstrakt sojowy 5,0 g/L, chlorek sodu 5,0 g/L, agar 15,0 g/L, pH 7,3 Merck, Niemcy)
- podłoże Sabouraud dekstrozowo-agarowe (SDA, pepton 10 g/L, dekstroza 20 g/L, agar 20 g/L, pH 5,6, Merck, Niemcy)

- agar Mueller Hinto (MHA, ekstrakt wołowy 2,0 g/L, trawiony enzymatycznie kazeinian 17,5 g/L, skrobia 1,5 g/L, agar 17,0 g/L, pH 7,3, Merc, Niemcy)
- bulion tryptozowo-sojowy (TSB, pepton z kazeiny 17,0 g/L, pepton z soji 3,0 g/L, D(+)-glukoza monohydrat 2,5 g/L, chlorek sodu 5,0 g/L, wodorofosforan potasu 2,5 g/L, pH 7,3, Merck, Niemcy)

4.1.1.3. Mikroorganizmy

- *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404, Manassas, Wirginia, USA)
- *Bacillus subtilis* (ATCC 6633, Manassas, Wirginia, USA)
- *Enterococcus faecium* (ATCC 35667, Manassas, Wirginia, USA)
- *Escherichia coli* (ATCC 25922, Manassas, Wirginia, USA)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442, Manassas, Wirginia, USA)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, Manassas, Wirginia, USA)

4.1.1.4. Rośliny

- *Lepidium sativum* L. (Rzeżucha ogrodowa) (PlantiCo, Polska)
- *Oryza sativa* L. (Ryż siewny) (TORSEED, Polska)
- *Pisum sativum* L. (Groch zwyczajny) (TORSEED, Polska)
- *Triticum aestivum* L. (Pszenica zwyczajna) (TORSEED, Polska)

4.1.2. Opis metod stosowanych w pracy doktorskiej – wyniki nieopublikowane

4.1.2.1. Otrzymanie PiPOx na drodze polimeryzacji rodnikowej

Polimeryzację iPOx przeprowadzono na drodze polimeryzacji rodnikowej. W tym celu, do kolby okrągłodennej odważono 50 mg (0,3 mmol) AIBN, a następnie dodano 10 mL (95,5 mmol) iPOx i odgazowano. Kolbę umieszczono w łaźni olejowej w temperaturze 60 °C na 24 godziny aż do całkowitego zestalenia. Po zakończeniu reakcji polimer rozpuszczono w chloroformie, wytrącono do zimnego eteru dietylowego i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem do osiągnięcia stałej masy. Wydajność procesu wyniosła 74%.

4.1.2.2. Otrzymanie HOOC-PLA₃₀₀₀-COOH, HOOC-PCL₃₀₀₀-COOH na drodze kationowej polimeryzacji z otwarciem pierścienia L-laktydu

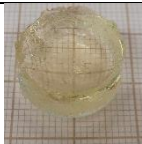
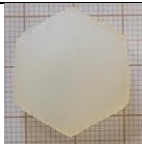
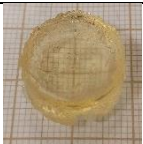
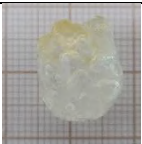
W celu otrzymania HOOC-PLA₃₀₀₀-COOH, w pierwszym etapie przeprowadzono kationową polimeryzację z otwarciem pierścienia L-laktydu. Do kolby Schlenka odważono 5 g (34,7 mmol) L-LA, 0,1967 g (1,7 mmol) 1,6-heksandiolu oraz dodano 10 mL destylowanego DCM. Po rozpuszczeniu L-LA, przez silikonowe septum dodano 0,5 g (3,3 mmol) kwasu

trifluorometanosulfonowego. Polimeryzację prowadzono do momentu, aż konwersja L-LA osiągnęła 97 % (konwersję kontrolowano za pomocą ^1H NMR). Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano 0,74 g (6,6 mmol) DABCO i 0,66 g (6 mmol) bezwodnika bursztynowego, celu konwersji grup hydroksylowych do karboksylowych. Konwersję oceniono poprzez zanik sygnału 4,35 ppm, pochodzącego od grup końcowych bezpośrednio połączonych z grupą -OH. Polimer wytrącano do eteru dietylowego i wysuszono na linii próżniowej. Wydajność procesu wyniosła 78%. $\text{HOOC-PCL}_{3000}\text{-COOH}$ otrzymano w analogiczny sposób z wydajnością 80%.

4.1.2.3. Przygotowanie hydrożeli

Hydrożele zawierające segmenty poli(2-izopropenylo-2-oksazolin) oraz alifatycznych poliestrów ($\text{HOOC-PLA}_{3000}\text{-COOH}$, $\text{HOOC-PCL}_{3000}\text{-COOH}$) przygotowano, zakładając 4% otwartych pierścieni oksazolin. Do szklanej fiolki odważono 83 mg (0,75 mmol) PiPOx oraz 44 mg (0,015 mmol) $\text{HOOC-PLA}_{3000}\text{-COOH}$, następnie całość rozpuszczono w 1,0 mL DMSO. Po całkowitym rozpuszczeniu składników (1 h), mieszaninę umieszczono w piecu w temperaturze 140 °C na 75 minut. Dodatkowo, w celu przygotowania porowatych materiałów, syntezę przeprowadzono w obecności rozpuszczalnego w wodzie porogenu (NaCl). Jak przedstawiono w Tab. 4., usieciowane materiały porowate i nieporowate zostały przygotowane w różnych formach, dostosowanych do planowanej funkcji.

Tab. 4. Otrzymane hydrożele zastosowane w badaniach.

	PiPOx-PLA ^a	PiPOx-PLA	PiPOx-PLA	PiPOx-PLA	PiPOx-PCL	PiPOx-PCL	PiPOx-PCL
Kod	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7
Hydrożel							
Rozmiar porów	-	~ 490 μm	~ 490 μm	~ 5 mm	-	~ 350 μm	~ 5 mm
Stopień pęcznienia	~ 73 %	~ 1 878%	~ 1 575 %	~ 1 347 %	~ 99%	~ 1 902 %	~ 1 362 %

^a Dla czytelności przyjęto kod: PiPOx-poliester, na przykładzie kod PiPOx-PLA oznacza sieć otrzymaną z wykorzystaniem $\text{HOOC-PLA}_{3000}\text{-COOH}$ o masie molowej $M_n = 3\,000\text{ g/mol}$ jako segmentu sieciującego PiPOx, przy teoretycznej ilości 4% otwartych pierścieni oksazolin w sieci.

4.1.2.4. Adsorbenty metali i barwników

Ocena przydatności badanych hydrożeli do usuwania zanieczyszczeń występujących w wodach została przeprowadzona dla wybranych jonów metali i barwników. Zbadano zdolność adsorpcyjną hydrożeli względem jonów (Cu^{2+} i Fe^{3+}) oraz barwników organicznych (fioletu krystalicznego i kwaśnej fuksyny). Wysuszone hydrożele PiPOx-PLA (H1) i PiPOx-PCL (H5) o masie 127 mg umieszczono w 20 mL badanych roztworów wodnych metali lub barwników o stężeniach: 7,5 mM Fe^{3+} , 7,56 mM Cu^{2+} , 5,2 μM fiolet krystaliczny oraz 17,1 μM kwaśna fuksyna. Po 24 h sorpcji hydrożele zostały usunięte, a pozostałą objętość roztworu zmierzono w cylindrze miarowym. Następnie stężenia jonów i barwników określono za pomocą spektrofotometrii w zakresie nadfioletu i światła widzialnego UV/Vis. W przypadku porowatych hydrożeli PiPOx-PLA (H2) i PiPOx-PCL (H6), postępowano analogicznie jak z hydrożelami H1 i H5, z tą różnicą iż, nie zostały one wysuszone a jedynie odcisnięte z nadmiaru wody, przed umieszczeniem w badanych roztworach. Po 24 h sorpcji hydrożel wyjęto z roztworu, wyciśnięto, a płyn zawrócono do badanego roztworu z jonami lub barwnikami. Następnie zmierzono objętość roztworu, a stężenie jonów lub barwników oznaczono za pomocą UV/Vis, porównując absorbancję światła roztworów z krzywymi kalibracyjnymi (Rys. 16.) w odpowiednim zakresie. Stężenia jonów (mg/mL) i barwników ($\mu\text{g/mL}$) obliczone zgodnie z równaniem (1). Uwzględniono ewentualne rozcieńczenia próbek. Badanie wykonano w trzech powtórzeniach. Do analizy jonów miedzi metodą spektrofotometrii UV/Vis zastosowano 25% roztwór amoniaku ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) jako odczynnik kompleksujący. Dla każdego testu, do 2 mL roztworu jonów miedzi dodano 2 mL roztworu amoniaku. Pomiar absorbancji dla jonów miedzi i barwników prowadzono przy odpowiedniej długości fali: 626 nm (Cu^{2+}), 590 nm (fiolet krystaliczny) i 542 nm (kwaśna fuksyna).

Ze względu na brak możliwości otrzymania stabilnego kompleksu żelaza skuteczność usuwania zanieczyszczeń określono na podstawie pomiarów za pomocą optycznej spektrometrii emisyjnej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (z języka angielskiego: measurements performed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry – ICP-OES).

Adsorpcyjną pojemność policzono z równania (1):

$$q = (C_0V_1 - C_tV_2)/m$$

gdzie;

q (mg/g) – ilość zaadsorbowanego jonu/barwnika na gram adsorbentu w czasie *t*

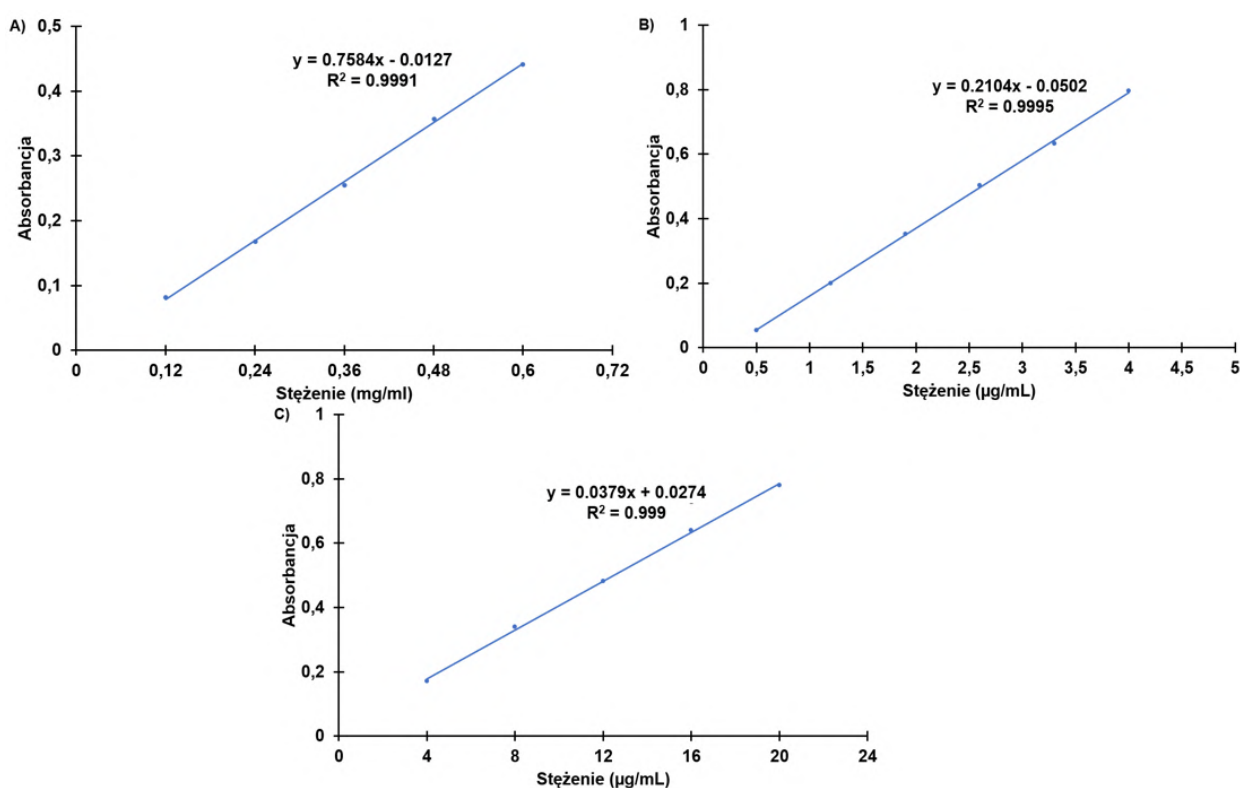
C₀ (mg/mL) – początkowe stężenie roztworu

C_t (mg/mL) – stężenie w czasie *t* po zanurzeniu hydrożelu

V₁ (mL) – początkowa objętość roztworu

V₂ (mL) – objętość roztworu po usunięciu hydrożelu

m (g) – masa hydrożelu



Rys. 16. Krzywe kalibracyjne: A) Cu^{2+} , B) fiolet krystaliczny, C) kwaśna fuksyna.

4.1.2.5. Przygotowanie hydrożeli o właściwościach przeciwrzybiczych i przeciwbakteryjnych

W celu oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej hydrożeli PiPOx-PLA (H3) zawierających kwercetynę zastosowano metodę dyfuzji w podłożu agarowym (metoda Kirby-Bauera) zgodną z wytycznymi zawartymi w normie: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests (CLSI, 2024). W celu enkapsulacji kwercetyny (Q) w hydrożelach przygotowano roztwory o stężeniach: 10 mg, 15 mg, 20 mg Q/(1mL DMSO : H₂O) (1,5 do 1). Następnie z hydrożelu odcisnięto wodę i dodano po 2 mL wybranego roztworu kwercetyny za pomocą pipety. W badaniach wykorzystano następujące mikroorganizmy,

pochodzące z Amerykańskiej Kolekcji Kultur ICP American Type Culture Collection – ATCC), bakterie Gram-ujemne *Escherichia coli* ATCC 25922 oraz *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, bakterie Gram-dodatnie *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecium* ATCC 35667 oraz *Bacillus subtilis* ATCC 6633, a także strzępkowy grzyb *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Szczepy bakteryjne przechowywano na podłożu TSA. Przed eksperymentem bakterie aktywowano przez dwukrotne pasażowanie (37°C, 24 h) w bulionie TSB oraz na podłożu TSA. *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 inkubowano na podłożu SDA. Zawiesinę komórek poszczególnych szczepów przygotowano w sterylnej soli fizjologicznej, standaryzując do wartości 0,5 w skali McFarlanda (10^8 jtk/mL). Następnie podłoże MHA zaszczepiono bakteriami metodą wymazu. Na powierzchni agarowej po zaszczepieniu umieszczono próbki sieci PiPOx-PLA zawierające 60 % roztwór DMSO z kwercetyną. Płytki inkubowano w temperaturze 37 °C przez 18 - 24 h (bakterie) lub 28 °C przez 48 - 72 h (strzępkowy grzyb). Po inkubacji zmierzono średnicę stref zahamowania wzrostu (mm) wokół oraz pod próbkami sieci PiPOx-PLA. Kontrolą dodatnią były dyski z gentamycyną oraz nystatyną. Badania przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

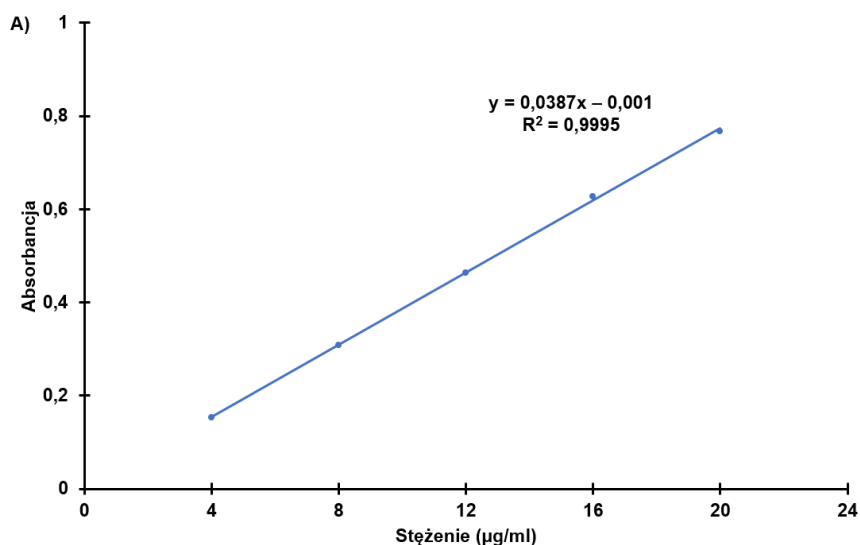
4.1.2.6. Przygotowanie nośników leków

W pierwszym etapie PiPOx poddano sprzęganiu z wybranymi lekami w wyniku reakcji pierścieni oksazoliny z grupami karboksylowymi wybranych związków: ibuprofenu (IBU), probenecydu (PB) lub kwasu walproinowego (WA). W tym celu, w kolbie kulistej umieszczono 400 mg (3,604 mmol) PiPOx, a następnie dodano odpowiednią ilość leku: 111 mg (0,540 mmol) IBU, 154 (0,540 mmol) mg PR, lub 78 mg (0,540 mmol) KW. Całość rozpuszczono w DMAc (6 mL) i umieszczono w piecu w temperaturze 120 °C na 5 h (7 h dla WA), następnie mieszaninę reakcyjną schłodzono, a otrzymany zmodyfikowany polimer oczyszczono poprzez wytrącenie w eterze dietylowym i wysuszono pod próżnią. W celu usunięcia pozostałości DMAc, zmodyfikowany lekiem PiPOx rozpuszczono w chloroformie i ponownie wytrącono do eteru dietylowego i wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany zmodyfikowany polimer scharakteryzowano za pomocą ^1H NMR (Rys. 20.) w celu określenia wydajności reakcji sprzęgania. W drugim etapie modyfikowany lekiem PiPOx został usieciowany za pomocą HOOC-PLA₃₀₀₀-COOH zgodnie z wcześniejszą procedurą, uwzględniając częściowe otwarcie pierścienia oksazoliny przez lek. Przykładowo, dla PiPOx-u zmodyfikowanego probenecydem, odważono 115 mg zmodyfikowanego polimeru oraz 38 mg HOOC-PLA₃₀₀₀-COOH, następnie całość rozpuszczono w 1,0 mL DMSO w szklanej fiołce. Po całkowitym rozpuszczeniu składników mieszaninę umieszczono w piecu w temperaturze 140 °C na 75 minut. Dla sieci modyfikowanych

ibuprofenem lub kwasem walproinowym reakcję sieciowania przeprowadzono w podobny sposób. Otrzymane sieci PLA-PiPOx-lek scharakteryzowano za pomocą ^{13}C CP-MAS NMR (Rys. 22).

4.1.2.7. Badania uwalniania leku

Badanie uwalniania leku przeprowadzono dla nieporowatych i porowatych hydrożeli PiPOx-PLA (H1 i H2) zawierających probenecyd, wykorzystując roztwór buforowy Tris o pH 8,3 i stężeniu 50 mM. W przypadku hydrożeli nieporowatych zastosowano wysuszoną próbkę o masie 127 mg, którą umieszczano w 5 mL roztworu buforowego w szklanej fiolce. Dla hydrożeli porowatych próbkę uprzednio odcisnięto z nadmiaru wody, a następnie zanurzano w takiej samej objętości buforu Tris. Wszystkie próbki inkubowano w termicznej wytrząsarce w temperaturze 37 °C, z prędkością 50 obr./min. Po określonym czasie pobierano 2 mL badanego roztworu i analizowano za pomocą spektroskopii UV/Vis, a hydrożel przeniesiono do świeżego roztworu buforu. Zawartość uwolnionego probenecydu określano na podstawie krzywej kalibracyjnej (Rys. 17.). Każde oznaczenie wykonano w trzech powtórzeniach. Wyniki przedstawiono jako skumulowane uwalnianie leku w funkcji czasu.



Rys. 17. Krzywa kalibracyjna dla probenecydu.

4.1.2.8. Przygotowanie podłoży do hodowli roślin

Przed rozpoczęciem eksperymentów nasiona pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*), ryżu siewnego (*Oryza sativa*) oraz grochu zwyczajnego (*Pisum sativum*) przechowywano w zamkniętych, suchych i ciemnych pojemnikach. Szklane próbki napełniono wodą, a następnie umieszczono w nich wkład ze zwężeniem, a na nim hydrożel. Hydrożele PiPOx-PLA i PiPOx-PCL były częściowo zanurzone w wodzie destylowanej, którą codziennie uzupełniano.

Wszystkie nasiona zostały wysterylizowane środkiem grzybobójczym Thiuram i wykiełkowały na hydrożelach z PCL i PLA w obecności wody destylowanej. Kiełkowanie prowadzono przez 14 dni w pomieszczeniu hodowlanym w stałej temperaturze 25 °C i przy ustalonym fotoperiodzie (16 h światła / 8 h ciemności), przy natężeniu światła wynoszącym 7.7 – 8.4 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Codziennie monitorowano wzrost roślin.

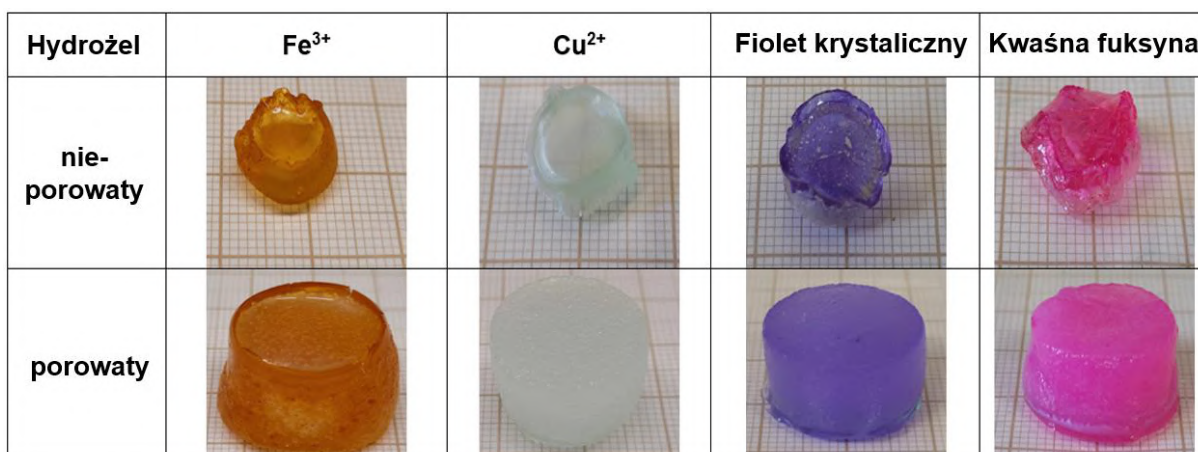
W odrębnym badaniu porównaliśmy wzrost rzeżuchy zwyczajnej (*Lepidium sativum*) na podłożu z ziemi uniwersalnej oraz na podłożu ze spęcznionego hydrożelu PiPOx-PLA (H2). Do dwóch płytkich szklanych szalek wprowadzono odpowiednio: do jednej 7,5 g ziemi, a do drugiej hydrożel H2. Następnie każdą z próbek podlano 8 mL wody destylowanej i na powierzchni każdego podłoża rozmieszczono po 150 mg ziaren rzeżuchy. Eksperyment prowadzono przez 14 dni, codziennie uzupełniając wodę destylowaną.

4.2. Opis badań

4.2.1. Zastosowanie otrzymanych sieci polimerowych

4.2.1.1. Sorbenty zanieczyszczeń

Ocenę skuteczności nieporowatych i porowatych materiałów PiPOx-PLA (H1 i H2) i PiPOx-PCL (H5 i H6) w roli adsorbentów do usuwania zanieczyszczeń z wody przeprowadzono dla roztworów wybranych jonów metali (Fe^{3+} i Cu^{2+}) i barwników (fioletu krystalicznego i kwaśnej fuksyny). Jony Fe^{3+} i Cu^{2+} powszechnie występują w wodach na terenie Polski jako zanieczyszczenie, natomiast barwniki wyselekcjonowano z uwagi na ich częstą obecność w ściekach generowanych przez przemysł włókienniczy, co odzwierciedla typowe zanieczyszczenia w ekosystemach^{81,82}. Sorpcja jest powszechnie stosowaną metodą rozdzielu fizykochemicznego w procesach uzdatniania wody, ze względu na swoją prostotę i łatwość wdrożenia. Do badań przygotowano próbki nieporowatych i porowatych hydrożeli w kształcie cylindrów. Po zakończeniu procesu sorpcji zaobserwowano zmiany zabarwienia próbek, co stanowiło prosty, wizualny wskaźnik pochłaniania zanieczyszczeń (Rys. 18.).



Rys. 18. Cyfrowe zdjęcia ilustrujące zmianę zabarwienia hydrożeli PiPOx-PLA po 24 h sorpcji w wodnych roztworach jonów metali: Cu²⁺ i Fe³⁺ oraz barwników organicznych: fioletu krystalicznego i kwaśnej fuksyny.

Skuteczność usuwania zanieczyszczeń z roztworów wodnych określono na podstawie pomiarów UV/VIS. W przypadku jonów metali ich wydajność adsorpcji oceniano za pomocą ICP-OES. Wyniki przedstawiono w Tab. 5.

Tab. 5. Maksymalne pochłanianie zanieczyszczeń wodnych przez hydrożele PiPOx-PLA i PiPOx-PCL.

Hydrożel	Zanieczyszczenie wody	Adsorpcja ^a [%]	Adsorpcja ^a [mg/g]
H1	Fe ³⁺	-	1.9*
H2		-	8.1*
H5		-	1.3*
H6		-	10.1*
H1	Cu ²⁺	3.4	-
H2		9.8	2.1*
H5		6.1	-
H6		9.7	2.5*
H1	Fiolet krystaliczny	7.6	0.026
H2		14.9	0.051
H5		8.1	0.026
H6		13.0	0.045
H1	Kwaśna fuksyna	9.0	0.13
H2		17.6	0.31
H5		9.5	0.17
H6		18.2	0.32

^a Oznaczono za pomocą UV/VIS, * - oznaczono za pomocą ICP-OES.

Badane hydrożele wykazały umiarkowaną zdolność usuwania wybranych substancji chemicznych z wody, niezależnie od ich budowy. Sorpcja jonów metali nie przekraczała 10%, a w przypadku barwników nie przekraczała 18%. Niemniej jednak porowate hydrożele charakteryzowały się wyższą zdolnością sorpcyjną w porównaniu do ich nieporowatych odpowiedników. Relatywnie niska efektywność sorpcji zanieczyszczeń przez sieci polimerowe zawierające PiPOx i poliestry sugeruje słabe oddziaływania pomiędzy materiałem a jonami metali

i barwnikami. Związki z grupy 2-oksazolin (szczególnie ligandy bis-2-oksazolinowe) mogą tworzyć kompleksy z jonami metali przejściowych, jednakże dostępna wiedza na temat trwałości tych kompleksów jest niewystarczająca⁸³. Wcześniejsze badania innych zespołów wykazały, że sieci oparte na PiPOx mogą efektywnie wiązać zanieczyszczenia metaliczne, jeśli polimer zostanie zmodyfikowany grupami o wysokim powinowactwie do jonów metali, takimi jak terpirydyna czy pillar[5]aren^{65,84}. W przypadku PLA, w celu poprawy zdolności sorpcyjnych, stosowano odpowiednie modyfikacje, np. z użyciem tlenku grafenu⁸⁵. W związku z tym, aby zwiększyć skuteczność sorpcji jonów metali przez sieci PiPOx-poliestry, konieczne może być wprowadzenie dodatkowych grup funkcyjnych, które umożliwią silniejsze oddziaływania z zanieczyszczeniami. Taki kierunek prac jest przewidziany w dalszych badaniach naszego zespołu.

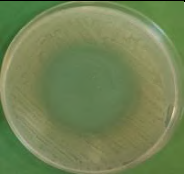
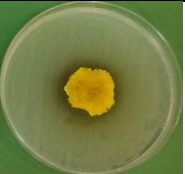
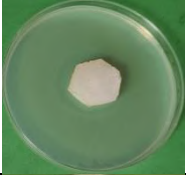
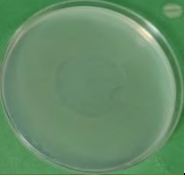
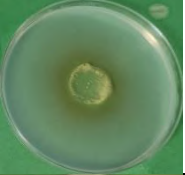
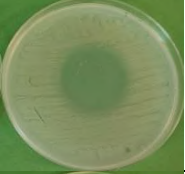
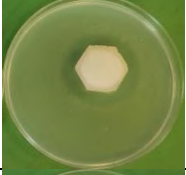
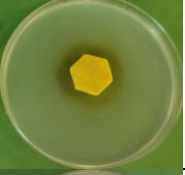
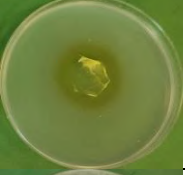
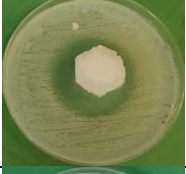
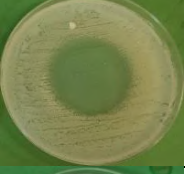
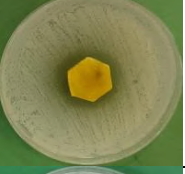
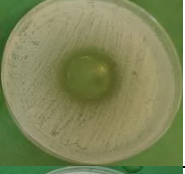
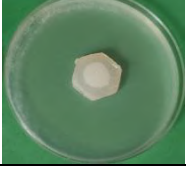
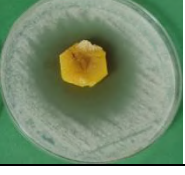
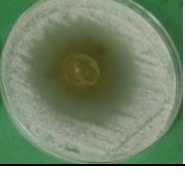
4.2.1.2. Hydrożele o właściwościach przeciwrzybiczych i przeciwbakteryjnych

Zbadano właściwości przeciwdrobnoustrojowe i przeciwrzybicze hydrożeli, zbudowanych z PiPOx oraz PLA (H3), zawierających kwercytnę, czyli biologicznie aktywny związek pochodzenia roślinnego. Aktywność przeciwdrobnoustrojową hydrożeli zawierających Q testowano wobec bakterii Gram-ujemnych (*E. coli*, *P. aeruginosa*) oraz Gram-dodatnich (*S. aureus*, *E. faecium*, *B. subtilis*). Wybrane bakterie należą do najczęstszych drobnoustrojów patogennych lub saprofitycznych (jak *B. subtilis*), występujących w produktach spożywczych oraz w środowisku zakładów przetwórstwa żywności⁸⁶. Strzępkowy grzyb z rodzaju *Aspergillus brasiliensis* jest uznawany za jeden z głównych czynników psucia się żywności i potencjalnego źródła mikotoksyn⁸⁶. *A. brasiliensis* jest powszechnie wykorzystywanym referencyjnym mikroorganizmem w rutynowych kontrolach jakości żywności, badaniach podłoży mikrobiologicznych i testach farmaceutycznych. Jak wykazano w literaturze, (ko)polimerowe podkłady mogą stanowić element opakowań przeciwdrobnoustrojowych dla żywności niskoprzetworzonej, poprawiając jej stabilność mikrobiologiczną i wydłużając okres przydatności do spożycia⁸⁷.

Hydrożele PiPOx-PLA bez dodatku Q nie wykazywały działania hamującego wzrost względem *E. faecium*, natomiast w przypadku pozostałych mikroorganizmów odnotowano ograniczenie wzrostu w strefie kontaktu w zakresie od 42,0% (*B. subtilis*) do 64,0% (*S. aureus*) (Tab. 6.). Wcześniejsze badania mikrocząstek z homopolimeru PLA wykazały brak aktywności antybakteryjnej wobec *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* oraz *S. aureus*⁸⁸. Z kolei PiPOx w formie hydrożelu wykazywał działanie przeciwdrobnoustrojowe jedynie w bezpośrednim kontakcie z patogenami takimi jak *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* oraz

Enterobacter cloacae. Wykazano również aktywność filmów PLA zawierających nanocząstki tlenku cynku wobec patogenów takich jak *S. aureus*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus cereus*, *E. coli* oraz *Candida albicans*⁸⁹. Folie z polilaktydu i polibutyleno tereftalanu adipinianu (PBAT) z dodatkiem ekstraktu z pestek grejpfruta działały przeciwdrobnoustrojowo wobec *E. coli* i *Listeria monocytogenes*⁹⁰. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa hydrożeli PiPOx-PLA zawierających kwercetynę była zależna zarówno od stężenia substancji aktywnej, jak i rodzaju mikroorganizmu. Średnice stref hamowania wzrostu wahały się od 17,7 do 44,0 mm. Zwiększenie zawartości kwercetyny z 20 do 40 mg nie wpłynęło na wzrost skuteczności wobec *E. coli*, *P. aeruginosa* i *B. subtilis*. Najsilniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec *S. aureus*, *E. faecium* oraz *A. brasiliensis* zaobserwowano w przypadku hydrożeli zawierających 40 mg kwercetyny – średnice stref wynosiły odpowiednio 29,7 32,6 oraz 44,0 mm. Ponieważ kwercetynę wprowadzono do sieci hydrożelowej w postaci roztworu 60% DMSO, przeprowadzono również testy z wykorzystaniem hydrożelu PiPOx-PLA zawierającego wyłącznie DMSO. W porównaniu do wariantu z kwercetyną, hydrożel z DMSO wykazywał silniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec wszystkich testowanych mikroorganizmów. Różnica w skuteczności wynosiła ok. 6–12% dla *S. aureus* i *E. faecium* oraz 33–39% dla pozostałych szczepów. DMSO jest powszechnie wykorzystywane jako rozpuszczalnik substancji przeciwdrobnoustrojowych, przy czym jego aktywność obserwuje się zazwyczaj już przy stężeniach <3%⁹¹. Różne mikroorganizmy wykazują jednak odmienną tolerancję na ten związek. *P. aeruginosa* toleruje nawet 25%, *S. aureus* 40%, a *E. coli* aż 70% DMSO. W stężeniach do 7,5% związek ten może wręcz działać ochronnie na komórki bakteryjne, blokując działanie antybiotyków⁹². Różnice w aktywności przeciwdrobnoustrojowej hydrożeli zaobserwowane w tym badaniu najprawdopodobniej wynikają z interakcji pomiędzy DMSO, kwercetyną oraz komponentami sieci hydrożelowej. DMSO jest uznawany za nietoksyczny rozpuszczalnik organiczny, powszechnie stosowany w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym. Według WHO (World Health Organization) nie budzi on zastrzeżeń przy stosowaniu jako nośnik substancji aromatyzujących w przemyśle spożywczym⁹³. Związek ten wykryto również w śladowych ilościach (do 1,8 ppm) w wielu warzywach i owocach, takich jak lucerna, szparagi, fasola, kapusta, ogórki, owies, cebula, burak liściowy, pomidory, jabłka czy maliny⁹⁴, co wskazuje na jego dobrą tolerancję przez organizm ludzki i istnienie mechanizmów metabolicznych odpowiedzialnych za jego rozkład.

Tab. 6. Strefy zahamowania wzrostu badanych mikroorganizmów wokół hydrożeli PiPOx-PLA a) oraz po usunięciu dysku hydrożelowego PiPOx-PLA b), określone metodą dyfuzji w podłożu agarowym. PiPOx-PLA+DMSO – hydrożel z dodatkiem DMSO, PiPOx-PLA+40Q – hydrożel zawierający 40 mg kwercetyny.

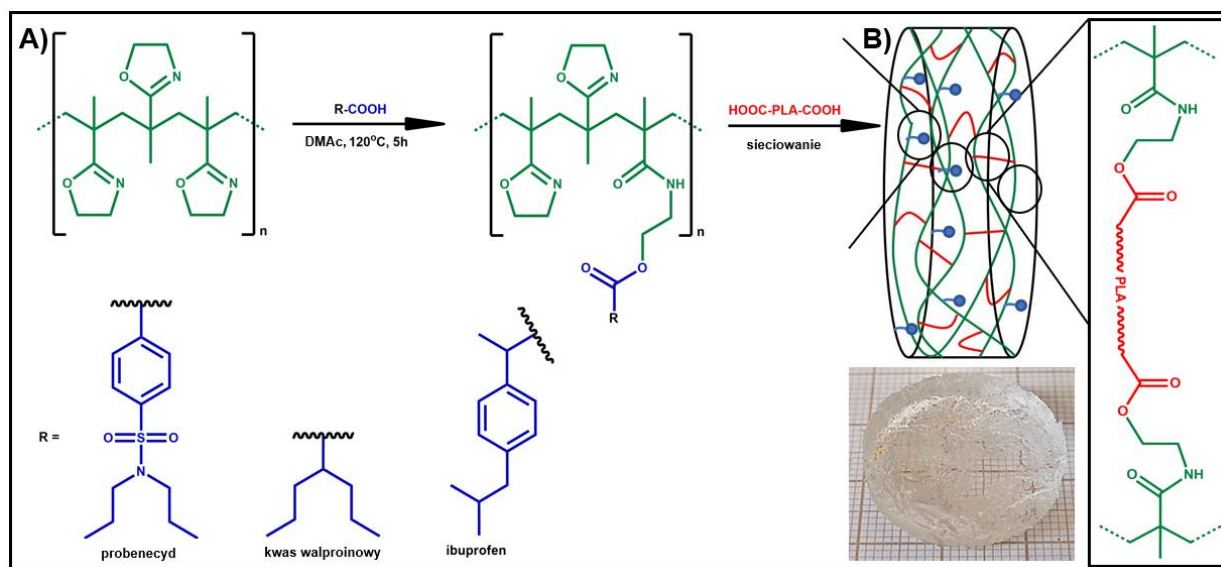
Mikroorganizm	PiPOx-PLA+DMSO		PiPOx-PLA+40Q	
	a	b	a	b
<i>Escherichia coli</i>				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
<i>Staphylococcus aureus</i>				
<i>Enterococcus faecium</i>				
<i>Bacillus subtilis</i>				
<i>Aspergillus brasiliensis</i>				

Uzyskane wyniki sugerują, że hydrożele PiPOx-PLA z dodatkiem kwercetyny lub DMSO mogą być wykorzystywane jako element opakowań o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, przyczyniając się do wydłużenia trwałości produktów spożywczych dzięki działaniu przeciwbakteryjnemu i przeciwgrzybiczemu. W dalszych etapach badań należy skupić się na ocenie aktywności takich podkładów w obecności matryc żywnościowych.

4.2.1.3. Nośniki leków

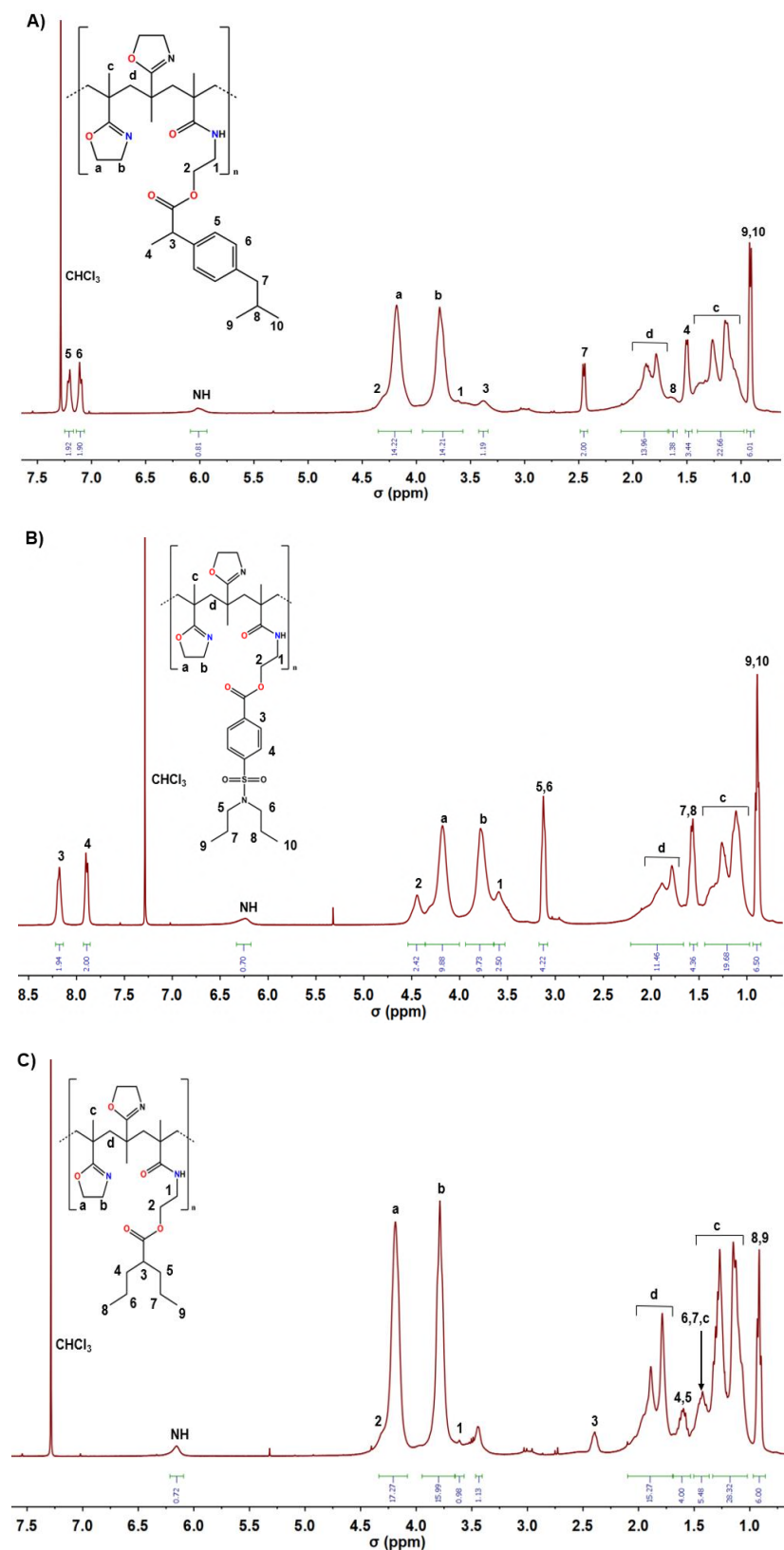
Ze względu na swoją unikalną strukturę i właściwości hydrożele mają duży potencjał do zastosowania jako nośniki do kontrolowanego uwalniania różnych substancji farmakologicznych,

w tym leków oraz innych biologicznie aktywnych i związków⁹⁵. W celu otrzymania hydrożeli z kowalencyjnie związanymi lekami, w pierwszym etapie zmodyfikowano PiPOx wybranymi lekami zawierającymi grupy karboksylowe, takimi jak probenecyd (PB), kwas walproinowy (WA) i ibuprofen (IBU), a następnie przeprowadzano proces sieciowania z użyciem HOOC-PLA₃₀₀₀-COOH (Rys. 19).



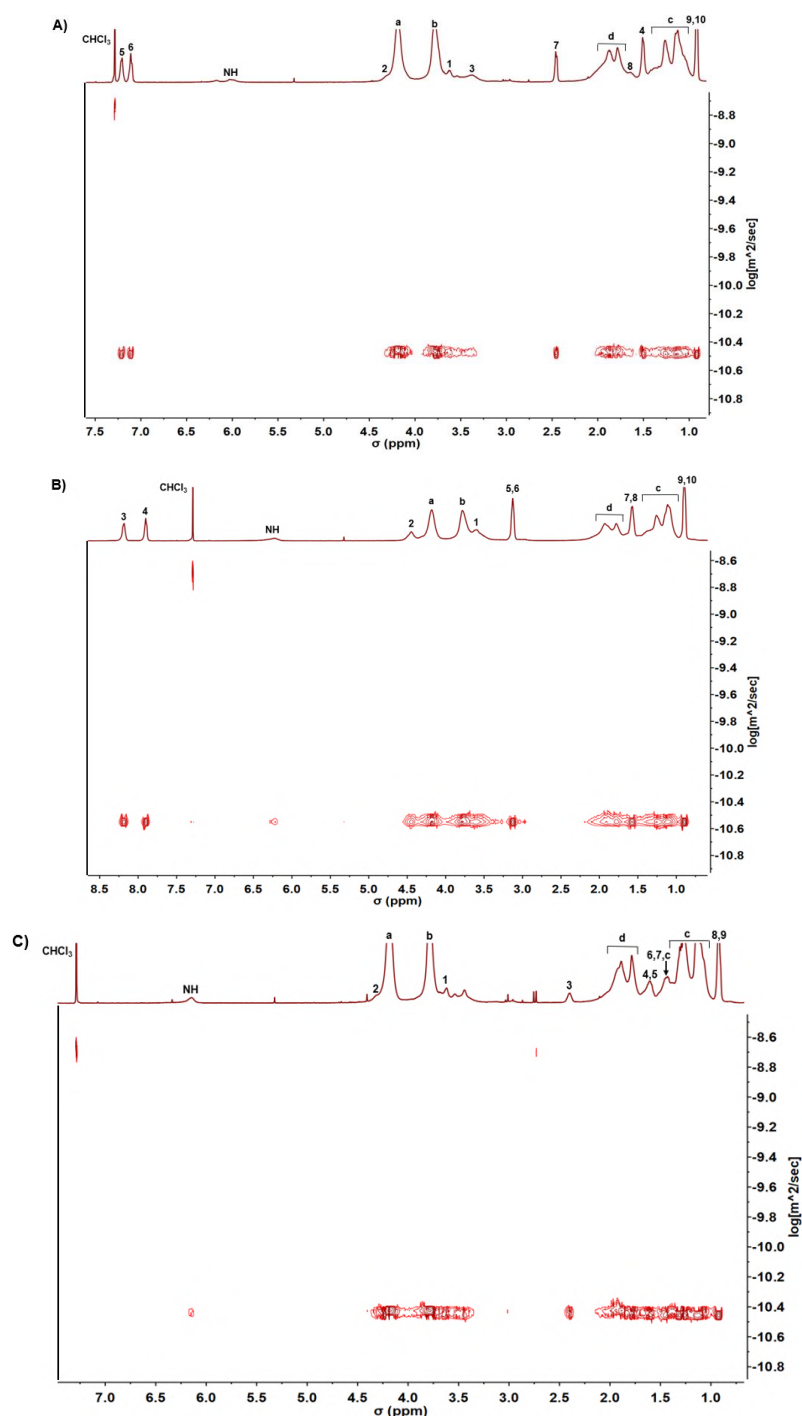
Rys. 19. A) sprzęganie PiPOx z wybranymi lekami zawierającymi grupy karboksylowe: probenecydem, kwasem walproinowym i ibuprofenem , B) struktura hydrożeli PiPOx-PLA zawierających kowalencyjnie przyłączone leki.

Możliwość kowalencyjnego przyłączenia ibuprofenu (niesteroidowego leku przeciwzapalnego) do liniowego łańcucha PiPOx oraz jego uwalniania z nośników została już wcześniej wykazana przez zespół profesora Kronka²⁰. W przedstawionej pracy doktorskiej rozszerzyliśmy zakres sprzęganych leków o dwa kolejne farmaceutyki o odmiennym działaniu: probenecyd, który zwiększa wydalanie kwasu moczowego z moczem, oraz kwas walproinowy, stosowany w leczeniu padaczki i zapobieganiu migrenom. Wprowadzenie leków do liniowych polimerów lub sieci polimerowych może oferować istotne zalety w porównaniu do stosowania samych leków, m.in. wydłużony czas półtrwania leku w osoczu, kontrolowane uwalnianie przy określonym pH czy zmniejszona cytotoksyczność⁹⁶. Modyfikację PiPOx przeprowadzono przy molowym stosunku leku do pierścieni oksazoliny równym 0,15. Następnie próbki oczyszczono, wysuszone i skuteczność przyłączenia leku obliczono na podstawie widm ¹H NMR (Rys. 20.), stosując wzory: $I_7/(I_2 + I_a)$ dla IBU, $I_4/(I_2 + I_a)$ dla PR i $I_{8,9}/(I_2 + I_a)$ dla KW, gdzie I to wartość integracji, a numer lub litera w dolnym indeksie oznacza dany sygnał pochodzący od leku (numer) lub PiPOx (litera).



Rys. 20. Widma ^1H NMR PiPOx-u zmodyfikowanego A) ibuprofenem, B) probenecydem i C) kwasem walproinowym. Dane z NMR wskazują, że stopień modyfikacji pierścieni iPOx wyniósł: 16% dla PB, 14% dla IBU i 12% dla WA. Zaobserwowane zmniejszenie stopnia modyfikacji PiPOx badanymi lekami przypisano stopniowemu spadkowi właściwości kwasowych: od probenecydu ($\text{pK}_a = 3,4$) do

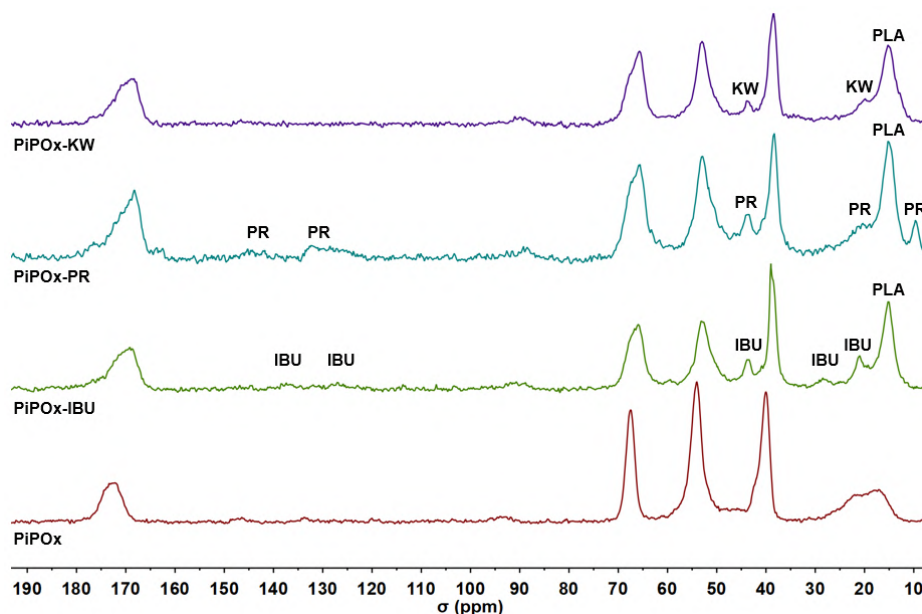
kwasu walproinowego ($pK_a = 5,14$). Na widmach DOSY (Rys. 21.) zaobserwowano sygnały pochodzące od PiPOx-u oraz poszczególnych leków, posiadające ten sam współczynnik dyfuzji, co potwierdza przyłączenie danego leku do łańcucha polimeru.



Rys. 21. Widma 2D DOSY NMR PiPOx-u zmodyfikowanego A) ibuprofenem, B) probenecydem i C) kwasem walproinowym.

W kolejnym etapie badań hydrofilowe, liniowe łańcuchy PiPOx zmodyfikowane lekami zostały kowalencyjnie usieciowane z wykorzystaniem $\text{HOOC-PLA}_{3000}\text{-COOH}$, $M_n = 3\,000\text{ g/mol}$, $[-\text{COOH}]/[\text{pierścienie iPOx}] = 0,04$. W zastosowanych warunkach syntezy otrzymano trwałe sieci,

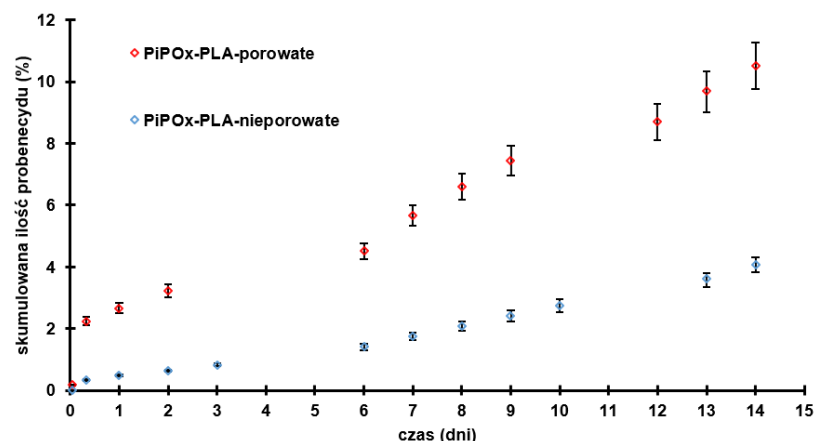
a zawartość frakcji nierozpuszczalnej wyniosła 95 %, co wskazuje na wydajne usieciowanie materiału. Następnie oczyszczone i wysuszone próbki poddano analizie ^{13}C CP-MAS w celu oszacowania składu.



Rys. 22. Widma ^{13}C CP-MAS dla sieci PiPOx-PLA zawierających kowalencyjnie związane leki.

W widmie ^{13}C CP-MAS zaobserwowano charakterystyczne sygnały pochodzące od leków: przy 127 ppm i 137 ppm dla IBU oraz 89 ppm i 132 ppm dla PR, odpowiadające obecności pierścieni aromatycznych. W przypadku KW występuje pik przy wartości 20 ppm który pochodzi od grup $(-\text{CH}_3)$ występujących w jego strukturze. Dla wszystkich badanych sieci zaobserwowano pik przy przesunięciu 44 ppm, pochodzący od grupy $(-\text{CH}_2-)$ w otwartym pierścieniu oksazolin. Dodatkowo zaobserwowano również piki odpowiadające poszczególnym blokom budulcowym sieci (PiPOx i PLA), co potwierdza skuteczne włączenie leków do struktury sieci.

W celu zbadania uwalniania leku z przygotowanych hydrożeli (zmodyfikowanych H1 i H2), przeprowadzono badanie *in vitro* w buforze (50 mM, pH 8,3, pH jelita grubego) w temperaturze 37 °C. Szybkość uwalniania leku z nieporowatych i porowatych hydrożeli zbadano za pomocą spektroskopii UV/Vis i przedstawiono na Rys. 23.



Rys. 23. Uwalnianie probenecydu z nieporowatych i porowatych hydrożeli.

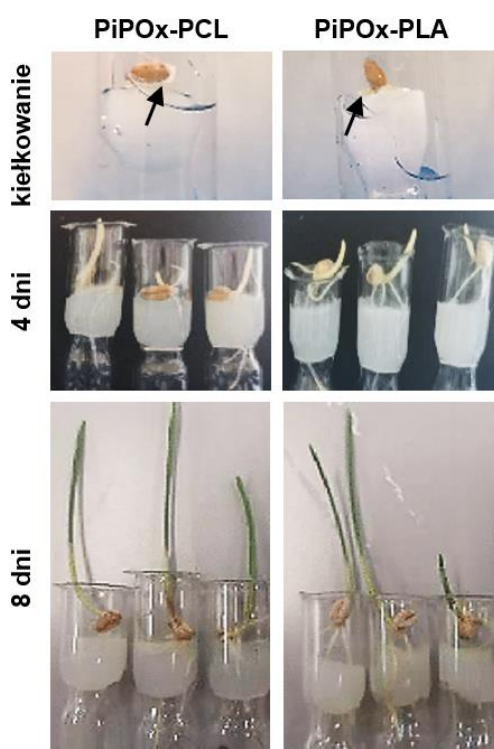
Zarówno nieporowate i porowate hydrożele charakteryzowały się kontrolowanym profilem uwalniania leku. Porowate hydrożele wykazywały szybsze uwalnianie leku, po 14 dniach uwolnieniu uległo około 10% załadowanego probenecydu. Zwiększona szybkość uwalniania jest prawdopodobnie związana z wprowadzoną porowatością do struktury sieci, co zapewnia większą powierzchnię dla dyfuzji leku oraz lepszą dostępność do środowiska zewnętrznego. W porównaniu do nieporowatych hydrożeli, które wykazywał znacznie wolniejsze uwalnianie, w czasie 14 dni uwolnieniu uległo jedynie 3% leku. Brak wyraźnie zdefiniowanej struktury porowatej w tym hydrożelu prawdopodobnie ogranicza dyfuzję leku, prowadząc do jego wolniejszego, bardziej wydłużonego w czasie uwalniania. Otrzymane wyniki podkreślają możliwość modyfikacji struktury hydrożeli w celu dostosowania wydajności uwalniania leku. Porowatość, obok innych czynników, okazuje się kluczowym parametrem przy projektowaniu hydrożelowych systemów dostarczania leków dostosowanych do konkretnych potrzeb terapeutycznych, umożliwiając uzyskanie zarówno szybszego efektu działania, jak i dłuższego, kontrolowanego uwalniania.

4.2.1.4. Podłoża do hodowli roślin

Materiały wytwarzane jako substraty do uprawy roślin muszą spełniać szereg istotnych wymagań, aby umożliwić ich prawidłowy rozwój. Wymagania te mogą się różnić w zależności od gatunku rośliny oraz wybranego systemu uprawy (np. hydroponika, uprawa w doniczkach), jednak zazwyczaj podłoże powinno zapewniać odpowiednią porowatość, umożliwiającą dostęp tlenu i wody do systemu korzeniowego. Dodatkowo, materiał taki powinien efektywnie zatrzymywać wodę, aby odbywało się odpowiednie nawodnienie korzeni między podlewaniami, zachowywać swoją strukturę w czasie oraz cechować się niską masą przy jednoczesnej wystarczającej elastyczności, która pozwoli roślinie na stabilne zakotwiczenie i rozwój korzeni.

Uwzględniając powyższe wymagania opracowano porowate hydrożele PiPOx-PLA (H4) i PiPOx-PCL (H7), które ukształtowano w formę płaskich cylindrów i oceniono pod kątem przydatności jako trójwymiarowych podłoży do uprawy roślin. Otrzymane hydrożele charakteryzowały się względnie dużymi porami (o średnicy ok. 5 mm). Założono, iż tego typu gąbczaste struktury będą spełniać funkcję syntetycznej gleby, nietoksycznej i zdolnej do dostarczania wody i tlenu oraz stabilnej w dłuższym czasie.

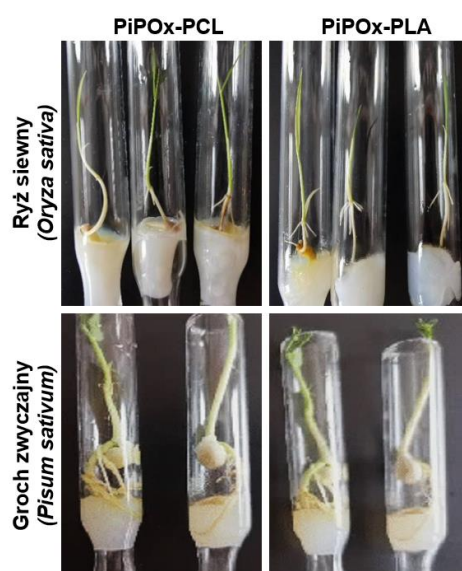
W pierwszym etapie badań oceniono kiełkowanie i rozwój nasion pszenicy zwyczajnej na podłożach PiPOx-PLA i PiPOx-PCL. W ciągu 8 dni zaobserwowano wyraźne różnice między badanymi podłożami, jak to przedstawiono na Rys. 24., korzenie wykiełkowanych nasion zaczęły penetrować podłoże PiPOx-PCL, czego nie zaobserwowano w przypadku podłoża PiPOx-PLA.



Rys. 24. Kiełkowanie i rozwój nasion pszenicy zwyczajnej na podłożach PiPOx-PLA i PiPOx-PCL w czasie 8 dni.

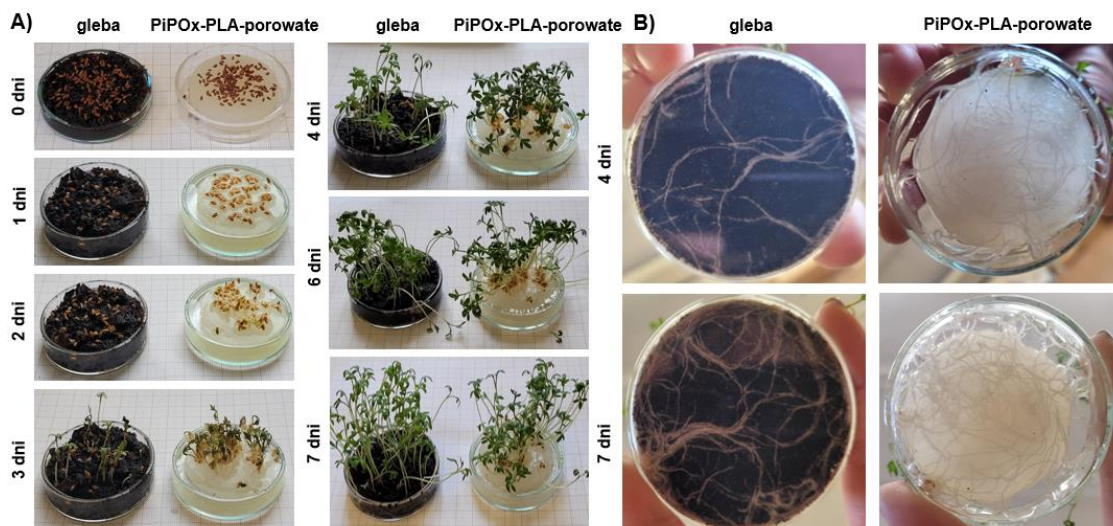
Po czterech dniach uprawy pszenicy na gąbce PiPOx-PCL można stwierdzić, że korzenie spenetrowały strukturę gąbki i w większości zanurzyły się w wodzie. Natomiast w przypadku roślin rosnących na podłożu PiPOx-PLA korzenie wyrosły nad powierzchnię gąbki lub przedostały się między gąbkę a ściankę próbki. W kolejnych dniach zaobserwowano, że korzenie przebijały się przez gąbki i były widoczne od spodu w próbkach PiPOx-PCL, podczas gdy w próbkach PiPOx-PLA korzenie pozostawały nad powierzchnią lub po bokach gąbki. Oprócz rozwoju systemu

korzeniowego porównano również długość pędów. Dane wykazały niewielkie różnice w długości pędów między badanymi wariantami – siewki uprawiane na PiPOx-PCL były średnio o około 15% dłuższe niż te na PiPOx-PLA. Większe różnice zaobserwowano w rozwoju korzeni. W porównaniu z roślinami rosnącymi na podłożu PiPOx-PLA, korzenie roślin uprawianych na PiPOx-PCL były krótsze, ale tworzyły bardziej zwarte wiązki. Uzyskane wyniki sugerują, że sztywniejsze podłoże (PiPOx-PLA) stanowi silniejszą fizyczną przeszkodę dla korzeni. Dodatkowo, zwarta struktura gąbki może wpływać na pobieranie wody i opóźniać rozwój roślin. Z tego względu zdecydowano się na przeprowadzenie dodatkowych badań, w których zastosowano podłoże PiPOx-PLA w postaci granulek. Podczas 8-dniowej uprawy pszenicy na podłożu PiPOx-PCL i zgranulowanym PiPOx-PLA nie zaobserwowano istotnych zmian w długości korzeni ani pędów rośliny. Można więc wnioskować, że porowatość gąbek może być dostosowywana tak, aby odwzorować różne rodzaje gleby, zróżnicowane pod względem wielkości porów i ich rozmieszczenia, co odpowiada rzeczywistej zmienności porowatości gleby w różnych miejscach i na różnych głębokościach. Testy wzrostu zostały powtórzone z udziałem dwóch innych gatunków roślin: ryżu siewnego oraz grochu zwyczajnego. Wyniki wykazały, że porowatość i struktura sztucznej gleby powinny być dobierane eksperymentalnie w zależności od konkretnego gatunku rośliny. Korzenie ryżu były w stanie przebić się przez oba typy gąbek i dotrzeć do powierzchni wody, natomiast w przypadku grochu nie zaobserwowano penetracji żadnego z porowatych podłoży, co skutkowało zahamowanym rozwojem systemu korzeniowego (Rys. 25.).



Rys. 25. Kiełkowanie i rozwój nasion ryżu siewnego oraz grochu zwyczajnego na podłożach PiPOx-PLA i PiPOx-PCL w czasie 8 dni.

W kolejnym etapie badań porównano wzrost rzeżuchy ogrodowej uprawianej na uniwersalnym podłożu glebowym oraz na hydrożelu PiPOx-PLA (H2). W trakcie 14-dniowego eksperymentu nie zaobserwowano istotnych różnic w rozwoju rośliny pomiędzy tymi dwoma typami podłoży. Tempo wzrostu roślin było porównywalne w obu przypadkach (Rys. 26.).



Rys. 26. A) wzrost rzeżuchy ogrodowej na uniwersalnym podłożu glebowym i sztucznym podłożu hydrożelowym, B) porównanie systemu korzeniowego.

Zainteresowanie wykorzystaniem hydrożeli w rolnictwie jest uzasadnione, ponieważ materiały tego typu mogą być stosowane w warunkach niedoboru wody lub w miejscach gdzie konieczne jest ograniczenie zużycia wody oraz optymalizacja gospodarowania zasobami wodnymi w uprawie roślin.

5. Podsumowanie

W niniejszej pracy opracowano wydajną metodę syntezy sieci segmentowych zbudowanych z poli(2-izopropenylo-2-oksazoliny) (PiPOx) i różnych bloków sieciujących, którą można przeprowadzić w prostych warunkach reakcji: z reagentów niewrażliwych na wodę i tlen oraz bez konieczności stosowania specjalistycznej aparatury. Zaletą metody jest również wytwarzanie układów usieciowanych bez stosowania katalizatora i powstawania produktów ubocznych.

Po raz pierwszy wykazano, że odpowiednio zmodyfikowane związki wielkocząsteczkowe (reaktywne oligomery lub polimery) o zróżnicowanych cechach fizykochemicznych mogą być stosowane jako rozgałęziacze PiPOx. Ta innowacja umożliwia wprowadzanie segmentów o zdefiniowanej długości łańcucha między węzłami sieci, co dodatkowo wpływa na finalną strukturę i finalne właściwości sieci.

Zbadano również możliwość modyfikacji struktury sieci poprzez wprowadzenie porowatości. Wykazano, że stosując NaCl (o różnych wielkościach kryształów) jako rozpuszczalny w wodzie porogen można otrzymywać sieci o dużej zdolnościach do sorpcji wody (hydrożele).

Oceniono potencjał aplikacyjny sieci z PiPOx i poliestrów alifatycznych wykazując, iż otrzymane materiały mogą znaleźć zastosowanie m.in. jako rusztowania do hodowli komórkowych, systemy dostarczania substancji biologicznie czynnych (w tym leków), sorbenty do usuwania zanieczyszczeń z wody oraz podłoża do uprawy roślin. Rezultaty testów jasno wskazują, że otrzymane sieci stanowią obiecującą platformę materiałową, której multifunkcyjność pozwala na przeniesienie wyników badań podstawowych na konkretne i użyteczne rozwiązania o szerokim spektrum zastosowań.

Program badań zrealizowany w ramach pracy doktorskiej przyczynił się do istotnego poszerzenia klasy amfifilowych materiałów zdolnych do pęcznienia w rozpuszczalnikach organicznych i w wodzie. W szczególności, wykonane badania umożliwiły otrzymanie hydrożeli z biogodnych komponentów, które mogą być stosowane w biomedycynie.

6. Literatura

- (1) Rodriguez, F.; Cohen, C.; Ober, C. K.; Archer, L. *Principles of Polymer Systems*, 6th Edition.; CRC Press: Boca Raton, 2014. <https://doi.org/10.1201/b17873>.
- (2) Hoffman, A. S. Hydrogels for Biomedical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64* (SUPPL.), 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.010>.
- (3) Roberts, M. J.; Bentley, M. D.; Harris, J. M. Chemistry for Peptide and Protein PEGylation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64* (SUPPL.), 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.025>.
- (4) Bianchi, A.; Bottau, P.; Calamelli, E.; Caimmi, S.; Crisafulli, G.; Franceschini, F.; Liotti, L.; Mori, F.; Paglialunga, C.; Saretta, F.; Tosca, M.; Cardinale, F.; Licari, A.; Del Giudice, M. M.; Caffarelli, C. Hypersensitivity to Polyethylene Glycol in Adults and Children: An Emerging Challenge. *Acta Biomed.* **2021**, *92* (3). <https://doi.org/10.23750/ABM.V92IS7.12384>.
- (5) Hong, L.; Wang, Z.; Wei, X.; Shi, J.; Li, C. Antibodies against Polyethylene Glycol in Human Blood: A Literature Review. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2020**, *102* (November 2019), 106678. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2020.106678>.
- (6) Nishikubo, T.; Kameyama, A.; Tokai, H. Synthesis of Polymers in Aqueous Solutions. Selective Addition Reaction of Poly(2-Isopropenyl-2-Oxazoline) with Thiols and Carboxylic Acids in Aqueous Solutions. *Polym. J.* **1996**, *28* (2), 134–138. <https://doi.org/10.1295/polymj.28.134>.
- (7) Kroneková, Z.; Mikulec, M.; Petrenčíková, N.; Paulovičová, E.; Paulovičová, L.; Jančinová, V.; Nosál', R.; Reddy, P. S.; Shimoga, G. D.; Chorvát, D.; Kronek, J. Ex Vivo and In Vitro Studies on the Cytotoxicity and Immunomodulative Properties of Poly(2-Isopropenyl-2-Oxazoline) as a New Type of Biomedical Polymer. *Macromol. Biosci.* **2016**, 1200–1211. <https://doi.org/10.1002/mabi.201600016>.
- (8) Kagiya, T.; Matsuda, T.; Zushi, K. Radical Copolymerization of 2-Isopropenyl-2-Oxazoline with Styrene in the Presence of Lewis Acids. *J. Macromol. Sci. Part A* **1972**, *6* (7), 1349–1372. <https://doi.org/10.1080/10601327208056900>.

- (9) Frump, J. A. Oxazolines. Their Preparation, Reactions, and Applications. *Chem. Rev.* **1971**, 71 (5), 483–505. <https://doi.org/10.1021/cr60273a003>.
- (10) Weber, C.; Neuwirth, T.; Kempe, K.; Ozkahraman, B.; Tamahkar, E.; Mert, H.; Becer, C. R.; Schubert, U. S. 2-Isopropenyl-2-Oxazoline: A Versatile Monomer for Functionalization of Polymers Obtained via RAFT. *Macromolecules* **2012**, 45 (1), 20–27. <https://doi.org/10.1021/ma2021387>.
- (11) Raus, V.; Hološ, A.; Kronek, J.; Mosnáček, J. Well-Defined Linear and Grafted Poly(2-Isopropenyl-2-Oxazoline)s Prepared via Copper-Mediated Reversible-Deactivation Radical Polymerization Methods. *Macromolecules* **2020**, 53 (6), 2077–2087. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.9b02662>.
- (12) MacGregor, M.; Sinha, U.; Visalakshan, R. M.; Cavallaro, A.; Vasilev, K. Preserving the Reactivity of Coatings Plasma Deposited from Oxazoline Precursors – An in Depth Study. *Plasma Process. Polym.* **2019**, 16 (2), 1–12. <https://doi.org/10.1002/ppap.201800130>.
- (13) Zanini, S.; Lehocky, M.; Lopez-Garcia, J.; Riccardi, C. Plasma Polymerization of 2-Isopropenyl-2-Oxazoline: Improvement of the Coating Stability by Co-Polymerization with 1-Octene. *Thin Solid Films* **2019**, 677 (March), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2019.03.014>.
- (14) Zhang, N.; Salzinger, S.; Soller, B. S.; Rieger, B. Rare Earth Metal-Mediated Group-Transfer Polymerization: From Defined Polymer Microstructures to High-Precision Nano-Scaled Objects. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135 (24), 8810–8813. <https://doi.org/10.1021/ja4036175>.
- (15) Kronek, J.; Minarčíková, A.; Kroneková, Z.; Majerčíková, M.; Strasser, P.; Teasdale, I. Poly(2-Isopropenyl-2-Oxazoline) as a Versatile Functional Polymer for Biomedical Applications. *Polymers (Basel)*. **2024**, 16 (12), 1708. <https://doi.org/10.3390/polym16121708>.
- (16) Tomalia, D. A.; Thill, B. P.; Fazio, M. J. Ionic Oligomerization and Polymerization of 2-Alkenyl-2-Oxazolines. *Polym. J.* **1980**, 12 (9), 661–675. <https://doi.org/10.1295/polymj.12.661>.

- (17) Jerca, F. A.; Jerca, V. V.; Hoogenboom, R. In Vitro Assessment of the Hydrolytic Stability of Poly(2-Isopropenyl-2-Oxazoline). *Biomacromolecules* **2021**, *22* (12), 5020–5032. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00994>.
- (18) Paulovičová, E.; Kroneková, Z.; Paulovičová, L.; Majerčíková, M.; Kronek, J. Cell-Mediated Immunoreactivity of Poly(2-Isopropenyl-2-Oxazoline) as Promising Formulation for Immunomodulation. *Materials (Basel)*. **2021**, *14* (6), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ma14061371>.
- (19) Jerca, F. A.; Anghelache, A. M.; Ghibu, E.; Cecoltan, S.; Stancu, I. C.; Trusca, R.; Vasile, E.; Teodorescu, M.; Vuluga, D. M.; Hoogenboom, R.; Jerca, V. V. Poly(2-Isopropenyl-2-Oxazoline) Hydrogels for Biomedical Applications. *Chem. Mater.* **2018**, *30* (21), 7938–7949. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.8b03545>.
- (20) Kroneková, Z.; Majerčíková, M.; Paulovičová, E.; Minarčíková, A.; Danko, M.; Markus, J.; Letasiová, S.; Kronek, J. Cytotoxicity and Bioimmunological Activity of Poly(2-Isopropenyl-2-Oxazoline) Conjugates with Ibuprofen Using 3D Reconstructed Tissue Models. *Biomacromolecules* **2024**, *25* (6), 3288–3301. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.3c01434>.
- (21) Culbertson, B. M. Cyclic Imino Ethers in Step-Growth Polymerizations. *Prog. Polym. Sci.* **2002**, *27* (3), 579–626. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00053-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00053-3).
- (22) Albertsson, A. C.; Varma, I. K. Aliphatic Polyesters: Synthesis, Properties and Applications. *Adv. Polym. Sci.* **2002**, *157*, 1–40. https://doi.org/10.1007/3-540-45734-8_1.
- (23) Slomkowski, S.; Penczek, S.; Duda, A. Polylactides-an Overview. *Polym. Adv. Technol.* **2014**, *25* (5), 436–447. <https://doi.org/10.1002/pat.3281>.
- (24) Pawar, R. P.; Tekale, S. U.; Shisodia, S. U.; Totre, J. T.; Domb, A. J. Biomedical Applications of Poly(Lactic Acid). *Rec. Pat. Regen. Med.* **2014**, *4* (1), 40–51. <https://doi.org/10.2174/2210296504666140402235024>.
- (25) Bińczak, J.; Szelwicka, A.; Siewniak, A.; Dziuba, K.; Chrobok, A. Oxidation of Cyclohexanone with Peracids—A Straight Path to the Synthesis of ϵ -Caprolactone Oligomers. *Materials (Basel)*. **2022**, *15* (19), 6608. <https://doi.org/10.3390/ma15196608>.

- (26) Du, R.; Yuan, H.; Zhao, C.; Wang, Y.; Yao, J.; Li, H. ϵ -Caprolactone Manufacture via Efficient Coupling Baeyer-Villiger Oxidation with Aerobic Oxidation of Alcohols. *Mol. Catal.* **2020**, *490* (February), 110947. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2020.110947>.
- (27) Kowalski, A.; Duda, A.; Penczek, S. Kinetics and Mechanism of Cyclic Esters Polymerization Initiated with Tin(II) Octoate. 3. Polymerization of L,L-Dilactide. *Macromolecules* **2000**, *33* (20), 7359–7370. <https://doi.org/10.1021/ma000125o>.
- (28) Kowalski, A.; Duda, A.; Penczek, S. Mechanism of Cyclic Ester Polymerization Initiated with Tin(II) Octoate. 2. 1 Macromolecules Fitted with Tin(II) Alkoxide Species Observed Directly in MALDI-TOF Spectra. *Macromolecules* **2000**, *33* (3), 689–695. <https://doi.org/10.1021/ma9906940>.
- (29) Kamber, N. E.; Jeong, W.; Waymouth, R. M.; Pratt, R. C.; Lohmeijer, B. G. G.; Hedrick, J. L. Organocatalytic Ring-Opening Polymerization. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (12), 5813–5840. <https://doi.org/10.1021/cr068415b>.
- (30) Stjerndahl, A.; Finne-Wistrand, A.; Albertsson, A. C.; Bäckesjö, C. M.; Lindgren, U. Minimization of Residual Tin in the Controlled Sn(II)Octoate-Catalyzed Polymerization of ϵ -Caprolactone. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2008**, *87* (4), 1086–1091. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31733>.
- (31) Cunha, B. L. C.; Bahú, J. O.; Xavier, L. F.; Crivellin, S.; de Souza, S. D. A.; Lodi, L.; Jardini, A. L.; Filho, R. M.; Schiavon, M. I. R. B.; Concha, V. O. C.; Severino, P.; Souto, E. B. Lactide: Production Routes, Properties, and Applications. *Bioengineering* **2022**, *9* (4), 164. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9040164>.
- (32) Bourissou, D.; Moebs-Sanchez, S.; Martín-Vaca, B. Recent Advances in the Controlled Preparation of Poly(α -Hydroxy Acids): Metal-Free Catalysts and New Monomers. *Comptes Rendus Chim.* **2007**, *10* (9), 775–794. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2007.05.004>.
- (33) Baško, M.; Kubisa, P. Polyester Oligodiols by Cationic AM Copolymerization of ϵ -lactide and ϵ -caprolactone Initiated by Diols. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2007**, *45* (14), 3090–3097. <https://doi.org/10.1002/pola.22065>.

- (34) Baško, M.; Kubisa, P. Cationic Copolymerization of E-caprolactone and <sc>L,L</sc> - lactide by an Activated Monomer Mechanism. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2006**, *44* (24), 7071–7081. <https://doi.org/10.1002/pola.21712>.
- (35) Basko, M.; Bednarek, M. Synthesis of Functionalized Polylactide by Cationic Activated Monomer Polymerization. *React. Funct. Polym.* **2012**, *72* (4), 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2012.02.003>.
- (36) Sarasua, J. R.; Rodriguez, N. L.; Arraiza, A. L.; Meaurio, E. Stereoselective Crystallization and Specific Interactions in Polylactides. *Macromolecules* **2005**, *38* (20), 8362–8371. <https://doi.org/10.1021/ma051266z>.
- (37) Barhoum, A.; Jaison, J.; Michael, D. *Fundamentals of Bionanomaterials*; Elsevier, **2022**. <https://doi.org/10.1016/C2020-0-00039-3>.
- (38) Rowley, D. I. Bone Repair Biomaterials. *J. Bone Joint Surg. Br.* **2010**, *92-B* (6), 903–904. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.92B6.0920903a>.
- (39) Penczek, S.; Pretula, J.; Lewiński, P. Polimery z Odnawialnych Surowców, Polimery Biodegradowalne. *Polimery/Polymers* **2013**, *58* (11–12), 835–846. <https://doi.org/10.14314/polimery.2013.835>.
- (40) Arif, Z. U.; Khalid, M. Y.; Noroozi, R.; Sadeghianmaryan, A.; Jalalvand, M.; Hossain, M. Recent Advances in 3D-Printed Polylactide and Polycaprolactone-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, *218* (January), 930–968. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.140>.
- (41) Bednarek, M.; Borska, K.; Kubisa, P. New Polylactide-Based Materials by Chemical Crosslinking of PLA. *Polym. Rev.* **2021**, *61* (3), 493–519. <https://doi.org/10.1080/15583724.2020.1855194>.
- (42) Basko, M.; Bednarek, M.; Vlaminc, L.; Kubisa, P.; Du Prez, F. E. Biodegradable Polymer Networks via Triazolidione-Crosslinking of Oleyl-Functionalized Poly(ϵ -Caprolactone). *Eur. Polym. J.* **2017**, *89*, 230–240. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.02.031>.

- (43) Mehra, P.; Tarannum, S.; Jain, K. Polymer Blends and Additives. In *Polymers for Oral Drug Delivery Technologies*; Elsevier, **2025**; pp 787–809. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-13774-7.00020-7>.
- (44) Qian, B.; Shen, F.; Zhu, H.; Zhang, J.; Wu, M.; Liu, J.; Wu, Q.; Yang, J. Synthesis, Performance Evaluation, and Plasticization Dynamics of Biobased Vanillic Acid Plasticizer for Poly(Vinyl Chloride). *Chem. Eng. J.* **2024**, 497 (August), 154991. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.154991>.
- (45) Scott, M. P.; Rahman, M.; Brazel, C. S. Application of Ionic Liquids as Low-Volatility Plasticizers for PMMA. *Eur. Polym. J.* **2003**, 39 (10), 1947–1953. [https://doi.org/10.1016/S0014-3057\(03\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0014-3057(03)00129-0).
- (46) Sinha Ray, S.; Banerjee, R. *Sustainable Polylactide-Based Blends*; Elsevier, **2022**. <https://doi.org/10.1016/C2020-0-00729-2>.
- (47) Brzeziński, M.; Biela, T. Supramolecular Polylactides by the Cooperative Interaction of the End Groups and Stereocomplexation. *Macromolecules* **2015**, 48 (9), 2994–3004. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b00208>.
- (48) Oledzka, E.; Sokolowski, K.; Sobczak, M.; Kolodziejewski, W. A-Amino Acids as Initiators of E-caprolactone and ϵ -caprolactone and ϵ -lactide Polymerization. *Polym. Int.* **2011**, 60 (5), 787–793. <https://doi.org/10.1002/pi.3016>.
- (49) Fu, H.-L.; Zou, T.; Cheng, S.-X.; Zhang, X.-Z.; Zhuo, R.-X. Cholic Acid Functionalized Star Poly(DL-Lactide) for Promoting Cell Adhesion and Proliferation. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2007**, 1 (5), 368–376. <https://doi.org/10.1002/term.45>.
- (50) Michalski, A.; Socka, M.; Brzeziński, M.; Biela, T. Reversible Supramolecular Polylactides Gels Obtained via Stereocomplexation. *Macromol. Chem. Phys.* **2018**, 219 (9), 1700607. <https://doi.org/10.1002/macp.201700607>.
- (51) Lee, S.-H.; Hyun Kim, S.; Han, Y.-K.; Kim, Y. H. Synthesis and Degradation of End-Group-Functionalized Polylactide. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2001**, 39 (7), 973–985. [https://doi.org/10.1002/1099-0518\(20010401\)39:7<973::AID-POLA1073>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1099-0518(20010401)39:7<973::AID-POLA1073>3.0.CO;2-8).

- (52) Zhu, Y.; Gao, C.; Liu, X.; Shen, J. Surface Modification of Polycaprolactone Membrane via Aminolysis and Biomacromolecule Immobilization for Promoting Cytocompatibility of Human Endothelial Cells. *Biomacromolecules* **2002**, *3* (6), 1312–1319. <https://doi.org/10.1021/bm020074y>.
- (53) Basko, M.; Duda, A. Telechelic Poly(Lactic Acid)s and Polylactides. In *Handbook of Telechelic Polyesters, Polycarbonates, and Polyethers*; Guillaume, S. M., Ed.; Jenny Stanford Publishing: New York, **2017**; pp 185–232. <https://doi.org/10.1201/9781315364469>.
- (54) Kim, J.; Jung, H. Y.; Park, M. J. End-Group Chemistry and Junction Chemistry in Polymer Science: Past, Present, and Future. *Macromolecules* **2020**, *53* (3), 746–763. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.9b02293>.
- (55) Patrickios, C. S. Polymer Networks: Recent Developments. *Macromol. Symp.* **2010**, 291–292 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1002/masy.201050501>.
- (56) Patrickios, C. S. CHAPTER 1: Thirty Years of Amphiphilic Polymer Co-Networks. *RSC Polym. Chem. Ser.* **2020**, 2020-Janua (33), 1–14. <https://doi.org/10.1039/9781788015769-00001>.
- (57) Gu, Y.; Zhao, J.; Johnson, J. A. Polymer Networks: From Plastics and Gels to Porous Frameworks. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2020**, *59* (13), 5022–5049. <https://doi.org/10.1002/anie.201902900>.
- (58) Penczek, S.; Florjańczył, Z. *Chemia Polimerów. T. 1. Makrocząsteczki i Metody Ich Otrzymywania*; Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej / Politechnika Warszawska (PW), **2001**.
- (59) Patrickios, C. S.; Matyjaszewski, K. Amphiphilic Polymer Co-Networks: 32 Years Old and Growing Stronger – a Perspective. *Polym. Int.* **2021**, *70* (1), 10–13. <https://doi.org/10.1002/pi.6138>.
- (60) Erdodi, G.; Kennedy, J. P. Amphiphilic Conetworks: Definition, Synthesis, Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31* (1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2005.11.001>.

- (61) Li, X.; Basko, M.; Prez, F. Du; Vankelecom, I. F. J. Multifunctional Membranes for Solvent Resistant Nanofiltration and Pervaporation Applications Bases on Segmented Polymer Network. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (51), 16539–16545. <https://doi.org/10.1021/jp805117z>.
- (62) Kim, J.; Lee, K. W.; Hefferan, T. E.; Currier, B. L.; Yaszemski, M. J.; Lu, L. Synthesis and Evaluation of Novel Biodegradable Hydrogels Based on Poly(Ethylene Glycol) and Sebacic Acid as Tissue Engineering Scaffolds. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (1), 149–157. <https://doi.org/10.1021/bm700924n>.
- (63) Kinard, L. A.; Kasper, F. K.; Mikos, A. G. Synthesis of Oligo(Poly(Ethylene Glycol) Fumarate). *Nat. Protoc.* **2012**, *7* (6), 1219–1227. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.055>.
- (64) Suggs, L. J.; Mikos, A. G. Development of Poly(Propylene Fumarate-Co-Ethylene Glycol) as an Injectable Carrier for Endothelial Cells. *Cell Transplant.* **1999**, *8* (4), 345–350. <https://doi.org/10.1177/096368979900800402>.
- (65) Xu, X.; Jerca, F. A.; Van Hecke, K.; Jerca, V. V.; Hoogenboom, R. High Compression Strength Single Network Hydrogels with Pillar[5]Arene Junction Points. *Mater. Horizons* **2020**, *7* (2), 566–573. <https://doi.org/10.1039/c9mh01401b>.
- (66) Cegłowski, M.; Jerca, V. V.; Jerca, F. A.; Hoogenboom, R. Reduction-Responsive Molecularly Imprinted Poly(2-Isopropenyl-2-Oxazoline) for Controlled Release of Anticancer Agents. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (6), 506. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12060506>.
- (67) Michalski, A.; Brzeziński, M.; Kubisa, P.; Biela, T. Supramolecular Aggregates of Linear and Star-Shaped Polylactides with Different Number of Hydroxyl or Carboxyl End-Groups. *React. Funct. Polym.* **2018**, *128* (February), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2018.05.001>.
- (68) Brul, S.; Coote, P. Preservative Agents in Foods: Mode of Action and Microbial Resistance Mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* **1999**, *50* (1–2), 1–17. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00072-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00072-0).

- (69) Cai, R.; Miao, M.; Yue, T.; Zhang, Y.; Cui, L.; Wang, Z.; Yuan, Y. Antibacterial Activity and Mechanism of Cinnamic Acid and Chlorogenic Acid against *Alicyclobacillus Acidoterrestris* Vegetative Cells in Apple Juice. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2019**, *54* (5), 1697–1705. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14051>.
- (70) Walsh, S. E.; Maillard, J. Y.; Russell, A. D.; Catrenich, C. E.; Charbonneau, D. L.; Bartolo, R. G. Activity and Mechanisms of Action of Selected Biocidal Agents on Gram-Positive and -Negative Bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *94* (2), 240–247. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01825.x>.
- (71) Pásztor, S.; Iván, B.; Kali, G. Extreme Difference of Polarities in a Single Material: Poly(Acrylic Acid)-Based Amphiphilic Conetworks with Polyisobutylene Cross-Linker. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2017**, *55* (11), 1818–1821. <https://doi.org/10.1002/pola.28569>.
- (72) Weber, M.; Stadler, R. Hydrophilic-Hydrophobic Two-Component Polymer Networks: 1. Synthesis of Reactive Poly(Ethylene Oxide) Telechelics. *Polymer (Guildf)*. **1988**, *29* (6), 1064–1070. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(88\)90016-X](https://doi.org/10.1016/0032-3861(88)90016-X).
- (73) Guo, P.; Yuan, Y.; Chi, F. Biomimetic Alginate/Polyacrylamide Porous Scaffold Supports Human Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Chondrogenesis. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *42*, 622–628. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.06.013>.
- (74) Maciejewska, M. Influence of the Polymerization Parameters on the Porosity and Thermal Stability of Polymeric Monoliths. *Materials (Basel)*. **2024**, *17* (12). <https://doi.org/10.3390/ma17122860>.
- (75) Damiri, F.; Salave, S.; Vitore, J.; Bachra, Y.; Jadhav, R.; Kommineni, N.; Karouach, F.; Paiva-Santos, A. C.; Varma, R. S.; Berrada, M. Properties and Valuable Applications of Superabsorbent Polymers: A Comprehensive Review. *Polym. Bull.* **2024**, *81* (8), 6671–6701. <https://doi.org/10.1007/s00289-023-05068-x>.
- (76) KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis. *Biomaterials* **2005**, *26* (27), 5474–5491. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.002>.

- (77) Church, D.; Elsayed, S.; Reid, O.; Winston, B.; Lindsay, R. Burn Wound Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19* (2), 403–434. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.403-434.2006>.
- (78) Bowler, P. G.; Duerden, B. I.; Armstrong, D. G. Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound Management. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, *14* (2), 244–269. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.244-269.2001>.
- (79) Ki, V.; Rotstein, C. Bacterial Skin and Soft Tissue Infections in Adults: A Review of Their Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Treatment and Site Of Care. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **2008**, *19* (2), 173–184. <https://doi.org/10.1155/2008/846453>.
- (80) Beatty, N.; August, J. A.; Saenz, J.; Nix, D. E.; Matthias, K. R.; Mohajer, M. Al. Knowledge, Attitude, and Practices Associated with the Diagnosis and Management of Skin and Soft-Tissue Infections among Medical Students, Residents, and Attending Physicians. *Avicenna J. Med.* **2018**, *8* (03), 104–106. https://doi.org/10.4103/ajm.ajm_200_17.
- (81) Kaniuczak, J.; Augustyn, Ł. ZAWARTOŚĆ JONÓW METALI W WODACH POWIERZCHNIOWYCH PRZEZNACZONYCH DO ZAOPATRZENIA LUDNOŚCI W WODĘ DO SPOŻYCIA. *Inżynieria Ekol.* **2011**, No. 27, 33–45.
- (82) Al-Tohamy, R.; Ali, S. S.; Li, F.; Okasha, K. M.; Mahmoud, Y. A. G.; Elsamahy, T.; Jiao, H.; Fu, Y.; Sun, J. A Critical Review on the Treatment of Dye-Containing Wastewater: Ecotoxicological and Health Concerns of Textile Dyes and Possible Remediation Approaches for Environmental Safety. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2022**, *231*, 113160. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113160>.
- (83) Cannon, R.; Roche, B.; Rokade, B. V.; Guiry, P. J. Further Developments and Applications of Oxazoline-Containing Ligands in Asymmetric Catalysis. *Chem. Rev.* **2021**, *121* (11), 6373–6521. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00844>.
- (84) Xu, X.; Jerca, F. A.; Jerca, V. V.; Hoogenboom, R. Covalent Poly(2-Isopropenyl-2-Oxazoline) Hydrogels with Ultrahigh Mechanical Strength and Toughness through Secondary Terpyridine Metal-Coordination Crosslinks. *Adv. Funct. Mater.* **2019**, *29* (48), 1904886. <https://doi.org/10.1002/adfm.201904886>.

- (85) Nouri, A.; Ang, W. L.; Mahmoudi, E.; Chua, S. F.; Mohammad, A. W.; Benamor, A.; Ba-Abbad, M. M.; Leo, C. P. Decoration of Polylactic Acid on Graphene Oxide for Efficient Adsorption of Methylene Blue and Tetracycline. *Chemosphere* **2023**, *322*, 138219. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138219>.
- (86) Álvarez, M.; Andrade, M. J.; Núñez, F.; Rodríguez, M.; Delgado, J. Proteomics as a New-Generation Tool for Studying Moulds Related to Food Safety and Quality. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24* (5), 4709. <https://doi.org/10.3390/ijms24054709>.
- (87) Fadiji, T.; Rashvand, M.; Daramola, M. O.; Iwarere, S. A. A Review on Antimicrobial Packaging for Extending the Shelf Life of Food. *Processes* **2023**, *11* (2), 590. <https://doi.org/10.3390/pr11020590>.
- (88) Kost, B.; Kunicka-Styczyńska, A.; Plucińska, A.; Rajkowska, K.; Basko, M.; Brzeziński, M. Microfluidic Preparation of Antimicrobial Microparticles Composed of L-Lactide/1,3-Dioxolane (Co)Polymers Loaded with Quercetin. *Food Chem.* **2022**, *396* (January), 133639. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133639>.
- (89) Mizielińska, M.; Kowalska, U.; Jarosz, M.; Sumińska, P.; Landercy, N.; Duquesne, E. The Effect of UV Aging on Antimicrobial and Mechanical Properties of PLA Films with Incorporated Zinc Oxide Nanoparticles. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2018**, *15* (4), 794. <https://doi.org/10.3390/ijerph15040794>.
- (90) Shankar, S.; Rhim, J.-W. Preparation of Antibacterial Poly(Lactide)/Poly(Butylene Adipate-Co-Terephthalate) Composite Films Incorporated with Grapefruit Seed Extract. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *120*, 846–852. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.004>.
- (91) Wadhwani, T.; Desai, K.; Patel, D.; Lawani, D.; Bahaley, P.; Joshi, P.; Kothari, V. Effect of Various Solvents on Bacterial Growth in Context of Determining MIC of Various Antimicrobials. *Internet J. Microbiol.* **2009**, *7* (1).
- (92) Mi, H.; Wang, D.; Xue, Y.; Zhang, Z.; Niu, J.; Hong, Y.; Drlica, K.; Zhao, X. Dimethyl Sulfoxide Protects Escherichia Coli from Rapid Antimicrobial-Mediated Killing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60* (8), 5054–5058. <https://doi.org/10.1128/AAC.03003-15>.

- (93) Gaylord Chemical, C. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Health and Safety Information. *Bull. #106* **2007**, 1–16.
- (94) Pearson, T. W.; Dawson, H. J.; Lackey, H. B. Naturally Occurring Levels of Dimethyl Sulfoxide in Selected Fruits, Vegetables, Grains, and Beverages. *J. Agric. Food Chem.* **1981**, 29 (5), 1089–1091. <https://doi.org/10.1021/jf00107a049>.
- (95) Li, J.; Mooney, D. J. Designing Hydrogels for Controlled Drug Delivery. *Nat. Rev. Mater.* **2016**, 1 (12), 16071. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>.
- (96) Marasini, N.; Haque, S.; Kaminskas, L. M. Polymer-Drug Conjugates as Inhalable Drug Delivery Systems: A Review. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2017**, 31, 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2017.06.003>.

7. Spis wszystkich publikacji i osiągnięć

Publikacje

1. Kopka B., Kost B., Rajkowska K., Pawlak A., Kunicka-Styczyńska A., Biela T., Basko M., A simple strategy for efficient preparation of networks based on poly(2-isopropenyl-2-oxazoline), poly(ethylene oxide), and selected biologically active compounds: Novel hydrogels with antibacterial properties, **Soft Matter**, **2021**, **17**, **10683-10695**.
2. Kost B., Basko M., Bednarek M., Socka M., Kopka B., Łapienis G., Biela T., Kubisa P., Brzeziński M., The influence of the functional end groups on the properties of polylactide-based materials, **Progress in Polymer Science**, **2022**, **130**, **101556**.
3. Kopka B., Kost B., Basko M., Poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) as a reactive polymer for materials development, **Polymer Chemistry**, **2022**, **13**, **4736-4746**.
4. Kopka B., Kost B., Wrześniewska J., Rajkowska K., Kadłubowski S., Kunicka-Styczyńska A., Baryga A., Gonciarz W., Basko M., Brzeziński M., Supramolecular poly(vinyl alcohol)-based hydrogels containing quercetin for bacterial and fungal elimination, **European Polymer Journal**, **2023**, **187**, **111881**.
5. Kopka B., Kost B., Pawlak A., Tomaszewska A., Krupa A., Basko M., Covalent segmented polymer networks composed of poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) and selected aliphatic polyesters: designing biocompatible amphiphilic materials containing degradable blocks, **Soft Matter**, **2023**, **19**, **6987-6999**.
6. Kopka B., Kost B., Pawlak A., Bąk-Sypień I., Brzeziński M., Tomaszewska A., Krupa A., Jóźwiak P., Basko M., Biocompatible, porous hydrogels composed of aliphatic polyesters and poly(2-isopropenyl-2-oxazoline). Their application as scaffolds for bone tissue regeneration, **Soft Matter**, **2024**, **20**, **6655–6667**.

Komunikaty ustne

1. B. Kost, B. Kopka, K. Rajkowska, A. Pawlak, A. Kunicka-Styczyńska, T. Biela, M. Basko, *Sieci zbudowane z poli(2-izopropenyl-2-oksazolin), poli(tlenku etylenu) oraz wybranych związków biologicznie czynnych. Nowatorskie hydrożele o właściwościach antybakteryjnych*, **43 Zjazd Naukowego Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Łódź, 13.09-17.09.2021**
2. M. Basko, B. Kost, B. Kopka, *Postmodification of poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) by carboxyl-functionalized polymers*, **EPF European Polymer Congress, Praga, 26.06-01.07.2022**
3. M. Basko, B. Kopka, B. Kost, A. Pawlak, M. Brzeziński, A. Tomaszewska, A. Krupa, *Covalent segmented polymer networks composed of poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) and selected aliphatic polyesters: designing amphiphilic materials containing degradable blocks*, **2nd Conference “Membrane Materials – Modification and Separation”, Toruń, 26-28.09.2023**

4. B. Kost, B. Kopka, T. Biela, M. Basko, M. Danko, J. Mosnáček, *Synthesis and characterization of gels based on poly(2-isopropenyl-2-oxazoline)-co-(α -methylene- γ -butyrolactone) for water treatment application*, **2nd Conference "Membrane Materials – Modification and Separation"**, Toruń, 26-28.09.2023
5. B. Kopka, B. Kost, A. Pawlak, A. Krupa, A. Tomaszewska, M. Brzeziński, M. Basko, *Porowate, biokompatybilne hydrożele z poliestrów i poli(2-izopropenylo-2-oksazoliny)*, **XI Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, Łódź, 16-17.05.2024**
6. B. Kopka, B. Kost, A. Pawlak, I. Bąk-Sypień, M. Brzeziński, A. Tomaszewska, A. Krupa, P. Jóźwiak, M. Basko, *Porowate, biokompatybilne hydrożele z poli(2-izopropenylo-2-oksazoliny) i poliestrów*, **66 Zjazd Naukowego Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Poznań, 15-20.09.2024**
7. B. Kopka, B. Kost, A. Pawlak, I. Bąk-Sypień, M. Brzeziński, A. Tomaszewska, A. Krupa, A. Kobylińska, M. Baško, *Wielofunkcyjne hydrożele z poli(2-izopropenylo-2oksazoliny) i poliestrów alifatycznych: ocena możliwości aplikacyjnych*, **XII Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, Łódź, 22-23.05.2025**
8. M. Basko, B. Kopka, B. Kost, A. Pawlak, A. Krupa, A. Tomaszewska, M. Brzeziński, *Hydrogels from covalent segmented networks based on poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) and biocompatible polymers*, **EPF European Polymer Congress, Groningen, 22-27.06.2025**
9. M. Brzeziński, W. Gonciarz, B. Kost, B. Kopka, M. Basko, M. Chmiela, *Supramolecular polymer materials with antibacterial and antifungal properties*, **EPF European Polymer Congress, Groningen, 22-27.06.2025**

Postery

1. B. Kopka, B. Kost, M. Basko, *Networks based on poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) and selected polyesters - synthesis and characterization*, **IX Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, Łódź, 19-20.05.2022**
2. B. Kost, B. Kopka, A. Krupa, W. Gonciarz, M. Brzeziński, M. Basko, *Synthesis and characterization of amphiphilic, degradable networks based on polyesters and poly(2-isopropenyl-2-oxazoline)*, **EPF European Polymer Congress, Praga, 26.06-01.07.2022**
3. B. Kopka, B. Kost, A. Krupa, W. Gonciarz, M. Brzezinski, M. Basko, *Networks based on poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) and selected polyesters - synthesis and characterization*, **64 Zjazd Naukowego Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Lublin, 11-16.09.2022**
4. B. Kopka, B. Kost, A. Pawlak, A. Krupa, A. Tomaszewska, M. Brzeziński, M. Basko, *Covalent polymer networks with tunable properties composed of poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) and selected aliphatic polyesters*, **14th Advanced Polymers via Macromolecular Engineering, Paryż, 23-27.04.2023**

5. B. Kopka, B. Kost , A. Pawlak , A. Krupa , A. Tomaszewska , M. Brzezinski, M. Basko, *Segmented networks consisted of poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) and selected polyesters as an amphiphilic material with tunable properties*, **X Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, Łódź, 18-19.05.2023**
6. B. Kopka, B. Kost , A. Pawlak , A. Krupa, A. Tomaszewska , M. Brzezinski, M. Basko, *Segmented networks consisted of poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) and selected polyesters as an amphiphilic material with tunable properties*, **XIV Sesja Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików, Łódź, 13.06.2023**
7. B. Kopka, B. Kost, M. Brzeziński, M. Basko, *Carboxyl-functionalized polyesters as reactive blocks for graft copolymers and networks synthesis*, **XXIII Scientific Conference: Controlled Polymerization, Łódź, 03.06.2024**

8. Oświadczenia współautorów i załączone publikacje

Publikacja 1:

Kopka B., Kost B., Rajkowska K., Pawlak A., Kunicka-Styczyńska A., Biela T., Basko M., A simple strategy for efficient preparation of networks based on poly(2-isopropenyl-2-oxazoline), poly(ethylene oxide), and selected biologically active compounds: Novel hydrogels with antibacterial properties, **Soft Matter**, **2021**, **17**, 10683-10695.

Publikacja 2:

Kopka B., Kost B., Pawlak A., Tomaszewska A., Krupa A., Basko M., Covalent segmented polymer networks composed of poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) and selected aliphatic polyesters: designing biocompatible amphiphilic materials containing degradable blocks, **Soft Matter**, **2023**, **19**, 6987-6999.

Publikacja 3:

Kopka B., Kost B., Pawlak A., Bąk-Sypień I., Brzeziński M., Tomaszewska A., Krupa A., Jóźwiak P., Basko M., Biocompatible, porous hydrogels composed of aliphatic polyesters and poly(2-isopropenyl-2 oxazoline). Their application as scaffolds for bone tissue regeneration, **Soft Matter**, **2024**, **20**, 6655–6667.

Publikacja 4:

Kopka B., Kost B., Basko M., Poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) as a reactive polymer for materials development, **Polymer Chemistry**, **2022**, **13**, 4736-4746.

mgr inż. Bartosz Kopka
Centrum Badań Molekularnych
i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że w ramach przygotowania następujących artykułów naukowych:

1. Kopka B., Kost B., Rajkowska K., Pawlak A., Kunicka-Styczyńska A., Biela T., Basko M., A simple strategy for efficient preparation of networks based on poly(2-isopropenyl-2-oxazoline), poly(ethylene oxide), and selected biologically active compounds: Novel hydrogels with antibacterial properties, **Soft Matter**, **2021**, **17**, 10683-10695.
2. Kopka B., Kost B., Basko M., Poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) as a reactive polymer for materials development, **Polymer Chemistry**, **2022**, **13**, 4736-4746.
3. Kopka B., Kost B., Pawlak A., Tomaszewska A., Krupa A., Basko M., Covalent segmented polymer networks composed of poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) and selected aliphatic polyesters: designing biocompatible amphiphilic materials containing degradable blocks, **Soft Matter**, **2023**, **19**, 6987-6999.
4. Kopka B., Kost B., Pawlak A., Bąk-Sypień I., Brzeziński M., Tomaszewska A., Krupa A., Józwiak P., Basko M., Biocompatible, porous hydrogels composed of aliphatic polyesters and poly(2-isopropenyl-2 oxazoline). Their application as scaffolds for bone tissue regeneration, **Soft Matter**, **2024**, **20**, 6655–6667.

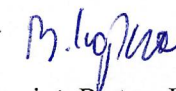
W wyżej przedstawionych publikacjach wykonałem następujące zadania:

Ad. 1. Przeprowadziłem syntezę poli(2-izopropenyl-2-oksazolina) (PiPOx), otrzymałem sieci polimerowe z PiPOx i poli(tlenku etylenu) (PEO), zawierające różne antybakteryjne związki. Uczestniczyłem w badaniach potwierdzających antybakteryjne właściwości otrzymanych materiałów. Uczestniczyłem w przygotowaniu manuskryptu.

Ad. 2. Uczestniczyłem w przygotowaniu manuskryptu. Przygotowałem rysunki i literaturę.

Ad. 3. Przeprowadziłem syntezę polilaktydów (PLA) oraz polikaprolaktonów (PCL), zawierających grupy -COOH na obu końcach łańcucha. Zoptymalizowałem proces wytwarzania sieci polimerowych. Scharakteryzowałem otrzymane polimery za pomocą spektroskopii rezonansu magnetycznego (^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{13}C CP-MAS), termograwimetrii (TGA), skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC), spektroskopii absorpcyjnej (FT-IR), chromatografii żelowej (GPC), oraz sieci za pomocą ^{13}C CP-MAS, TGA, DSC, FT-IR, zawartości frakcji nierozpuszczalnej, stopnia spęczenia. Uczestniczyłem w przygotowaniu manuskryptu.

Ad. 4. Przeprowadziłem syntezę PiPOx oraz poliestrów (PLA i PCL) zakończonych grupami -COOH. Otrzymałem porowate sieci polimerowe składające się z PiPOx-poliester i chlorku sodu (NaCl) w roli porogenu, z dodatkiem hydroksyapatytu (HA). Scharakteryzowałem otrzymane porowate sieci za pomocą ^{13}C CP-MAS, TGA, FT-IR, skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM), stopnia pęcznienia. Uczestniczyłem w przygotowaniu manuskryptu.


mgr inż. Bartosz Kopka

Łódź dn. 08.09.2025

dr hab. Małgorzata Baśko
Centrum Badań Molekularnych
i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że w ramach przygotowania następujących artykułów naukowych:

1. Kopka B., Kost B., Rajkowska K., Pawlak A., Kunicka-Styczyńska A., Biela T., Basko M., A simple strategy for efficient preparation of networks based on poly(2-isopropenyl-2-oxazoline), poly(ethylene oxide), and selected biologically active compounds: Novel hydrogels with antibacterial properties, **Soft Matter**, **2021**, **17**, 10683-10695.
2. Kopka B., Kost B., Basko M., Poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) as a reactive polymer for materials development, **Polymer Chemistry**, **2022**, **13**, 4736-4746.
3. Kopka B., Kost B., Pawlak A., Tomaszewska A., Krupa A., Basko M., Covalent segmented polymer networks composed of poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) and selected aliphatic polyesters: designing biocompatible amphiphilic materials containing degradable blocks, **Soft Matter**, **2023**, **19**, 6987-6999.
4. Kopka B., Kost B., Pawlak A., Bąk-Sypień I., Brzeziński M., Tomaszewska A., Krupa A., Józwiak P., Basko M., Biocompatible, porous hydrogels composed of aliphatic polyesters and poly(2-isopropenyl-2-oxazoline). Their application as scaffolds for bone tissue regeneration, **Soft Matter**, **2024**, **20**, 6655-6667.

W wyżej przedstawionych publikacjach wykonałam następujące zadania:

Ad. 1-4. Prowadziłam merytoryczny nadzór nad wszystkimi badaniami, byłam pomysłodawczynią konceptów prac. Uczestniczyłam w interpretacji wyników analiz. Uczestniczyłam w przygotowaniu i korekcie manuskryptów. Byłam kierownikiem Grantu NCN, nr: 2020/37/B/ST5/03302, pt: Amfifilowe sieci z poli(izopropenyl-2-oksazolin) i alifatycznych poliestrów jako wielofunkcyjne materiały o zadanych właściwościach.


dr hab. Małgorzata Baśko

Oświadczenie wydane na prośbę mgr inż. Bartosza Kopki w związku z przygotowaniem pracy doktorskiej.

Łódź dn. 04.09.2025

dr Bartłomiej Kost
Centrum Badań Molekularnych
i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że w ramach przygotowania następujących artykułów naukowych:

1. Kopka B., Kost B., Rajkowska K., Pawlak A., Kunicka-Styczyńska A., Biela T., Basko M., A simple strategy for efficient preparation of networks based on poly(2-isopropenyl-2-oxazoline), poly(ethylene oxide), and selected biologically active compounds: Novel hydrogels with antibacterial properties, **Soft Matter**, 2021, 17, 10683-10695.
2. Kopka B., Kost B., Basko M., Poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) as a reactive polymer for materials development, **Polymer Chemistry**, 2022, 13, 4736-4746.
3. Kopka B., Kost B., Pawlak A., Tomaszewska A., Krupa A., Basko M., Covalent segmented polymer networks composed of poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) and selected aliphatic polyesters: designing biocompatible amphiphilic materials containing degradable blocks, **Soft Matter**, 2023, 19, 6987-6999.
4. Kopka B., Kost B., Pawlak A., Bąk-Sypień I., Brzeziński M., Tomaszewska A., Krupa A., Józwiak P., Basko M., Biocompatible, porous hydrogels composed of aliphatic polyesters and poly(2-isopropenyl-2 oxazoline). Their application as scaffolds for bone tissue regeneration, **Soft Matter**, 2024, 20, 6655-6667.

W wyżej przedstawionych publikacjach wykonałem następujące zadania:

Ad. 1. Przeprowadziłem syntezę poli(tlenku etylenu) (PEO) zakończonego grupami -COOH na obu końcach łańcuha. Przeprowadziłem wstępne badania otrzymywania sieci z PiPOx i PEO. Uczestniczyłem w przygotowaniu i korekcie manuskryptu. Uczestniczyłem w interpretacji wyników analiz.

Ad. 2-4. Prowadziłem merotoryczny nadzór nad badaniami. Uczestniczyłem w interpretacji wyników analiz. Uczestniczyłem w przygotowaniu i korekcie manuskryptu.



dr Bartłomiej Kost

Oświadczenie wydane na prośbę mgr inż. Bartosza Kopki w związku z przygotowaniem pracy doktorskiej.

Łódź dn. 27.05.2025

dr hab. inż. Marek Brzeziński, prof. CBMiM
Centrum Badań Molekularnych
i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że w ramach przygotowania następujących artykułów naukowych:

1. Kopka B, Kost B, Pawlak A, Bąk-Sypień I, Brzeziński M, Tomaszewska A, Krupa A, Józwiak P, Basko M, Biocompatible, porous hydrogels composed of aliphatic polyesters and poly(2-isopropenyl-2 oxazoline). Their application as scaffolds for bone tissue regeneration, **Soft Matter**, 2024, 20, 6655–6667.

W wyżej przedstawionych publikacjach wykonałem następujące zadania:

Ad. 1. Uczestniczyłem w scharakteryzowaniu sieci polimerowych za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego SEM. Uczestniczyłem w przygotowaniu manuskryptu.

dr hab. inż. Marek Brzeziński, prof. CBMiM



Oświadczenie wydane na prośbę mgr inż. Bartosza Kopki w związku z przygotowaniem pracy doktorskiej.

Łódź dn. 27.05.2025

dr hab. inż. Andrzej Pawlak, prof. CBMiM
Centrum Badań Molekularnych
i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że w ramach przygotowania następujących artykułów naukowych:

1. Kopka B, Kost B, Basko M, Poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) as a reactive polymer for materials development, **Polymer Chemistry**, 2022, 13, 4736-4746.
2. Kopka B, Kost B, Pawlak A, Tomaszewska A, Krupa A, Basko M, Covalent segmented polymer networks composed of poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) and selected aliphatic polyesters: designing biocompatible amphiphilic materials containing degradable blocks, **Soft Matter**, 2023, 19, 6987-6999.
3. Kopka B, Kost B, Pawlak A, Bąk-Sypień I, Brzeziński M, Tomaszewska A, Krupa A, Józwiak P, Basko M, Biocompatible, porous hydrogels composed of aliphatic polyesters and poly(2-isopropenyl-2 oxazoline). Their application as scaffolds for bone tissue regeneration, **Soft Matter**, 2024, 20, 6655-6667.

W wyżej przedstawionych publikacjach wykonałem następujące zadania:

Ad. 1-3. Zbadałem właściwości mechaniczne sieci polimerowych. Uczestniczyłem w interpretacji wyników badań mechanicznych. Uczestniczyłem w przygotowaniu manuskryptów.



dr hab. inż. Andrzej Pawlak, prof. CBMiM

Oświadczenie wydane na prośbę mgr inż. Bartosza Kopki w związku z przygotowaniem pracy doktorskiej.

Łódź dn. 27.05.2025

dr inż. Irena Bąk-Sypień
Centrum Badań Molekularnych
i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że w ramach przygotowania następujących artykułów naukowych:

1. Kopka B, Kost B, Pawlak A, Bąk-Sypień I, Brzeziński M, Tomaszewska A, Krupa A, Józwiak P, Basko M, Biocompatible, porous hydrogels composed of aliphatic polyesters and poly(2-isopropenyl-2 oxazoline). Their application as scaffolds for bone tissue regeneration, **Soft Matter**, 2024, 20, 6655–6667.

W wyżej przedstawionych publikacjach wykonałam następujące zadania:

Ad. 1. Scharakteryzowałam porowate sieci polimerowe za pomocą badania adsorpcji gazu na powierzchni materiału metodą Brunauera-Emmetta-Tellera (BET). Uczestniczyłam w interpretacji wyników analiz.

dr inż. Irena Bąk-Sypień



Oświadczenie wydane na prośbę mgr inż. Bartosza Kopki w związku z przygotowaniem pracy doktorskiej.

Łódź dn. 27.05.2025

dr hab. Tadeusz Biela, prof. CBMiM
Centrum Badań Molekularnych
i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że w ramach przygotowania następujących artykułów naukowych:

1. Kopka B, Kost B, Rajkowska K, Pawlak A, Kunicka-Styczyńska A, Biela T, Basko M, A simple strategy for efficient preparation of networks based on poly(2-isopropenyl-2-oxazoline), poly(ethylene oxide), and selected biologically active compounds: Novel hydrogels with antibacterial properties, **Soft Matter**, 2021, 17, 10683-10695.

W wyżej przedstawionych publikacjach wykonałem następujące zadania:

Ad. 1. Uczestniczyłem w przygotowaniu i korekcie manuskryptu.



dr hab. Tadeusz Biela, prof. CBMiM

Oświadczenie wydane na prośbę mgr inż. Bartosza Kopki w związku z przygotowaniem pracy doktorskiej.

Łódź dn. 30.07.2025

dr hab. Katarzyna Rajkowska, prof. PŁ
Instytut Technologii Fermentacji
i Mikrobiologii
Wydział Biotechnologii
i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że w ramach przygotowania następujących artykułów naukowych:

1. Kopka B., Kost B., Rajkowska K., Pawlak A., Kunicka-Styczyńska A., Biela T., Basko M., A simple strategy for efficient preparation of networks based on poly(2-isopropenyl-2-oxazoline), poly(ethylene oxide), and selected biologically active compounds: Novel hydrogels with antibacterial properties, **Soft Matter**, 2021, 17, 10683-10695.

W wyżej przedstawionych publikacjach wykonałam następujące zadania:

Ad. 1. Prowadziłam nadzór nad badaniami dotyczącymi antybakteryjnego działania nieporowatych sieci polimerowych zawierających związki o działaniu biobójczym. Uczestniczyłam w interpretacji wyników analiz. Uczestniczyłam w przygotowaniu manuskryptu.



dr hab. Katarzyna Rajkowska, prof. PŁ

Oświadczenie wydane na prośbę mgr inż. Bartosza Kopki w związku z przygotowaniem pracy doktorskiej.

Łódź dn. 01.09.2025

dr hab. inż. Alina Kunicka-Styczyńska, prof. PŁ
Katedra Cukrownictwa
i Zarządzania Bezpieczeństwem Żywności
Wydział Biotechnologii
i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że w ramach przygotowania następujących artykułów naukowych:

1. Kopka B., Kost B., Rajkowska K., Pawlak A., Kunicka-Styczyńska A., Biela T., Basko M., A simple strategy for efficient preparation of networks based on poly(2-isopropenyl-2-oxazoline), poly(ethylene oxide), and selected biologically active compounds: Novel hydrogels with antibacterial properties, **Soft Matter**, 2021, 17, 10683-10695.

W wyżej przedstawionych publikacjach wykonałam następujące zadania:

Ad. 1. Uczestniczyłam w interpretacji wyników analiz. Uczestniczyłam w przygotowaniu manuskryptu.



dr hab. inż. Alina Kunicka-Styczyńska, prof. PŁ

Oświadczenie wydane na prośbę mgr inż. Bartosza Kopki w związku z przygotowaniem pracy doktorskiej.

Łódź dn. 27.05.2025

dr hab. Agnieszka Krupa, prof. UŁ
Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej
Wydział Biologii Ochrony środowiska
Uniwersytet Łódzki

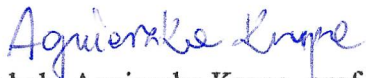
Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że w ramach przygotowania następujących artykułów naukowych:

1. Kopka B, Kost B, Pawlak A, Tomaszewska A, Krupa A, Basko M, Covalent segmented polymer networks composed of poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) and selected aliphatic polyesters: designing biocompatible amphiphilic materials containing degradable blocks, **Soft Matter**, 2023, 19, 6987-6999.
2. Kopka B, Kost B, Pawlak A, Bąk-Sypień I, Brzeziński M, Tomaszewska A, Krupa A, Józwiak P, Basko M, Biocompatible, porous hydrogels composed of aliphatic polyesters and poly(2-isopropenyl-2 oxazoline). Their application as scaffolds for bone tissue regeneration, **Soft Matter**, 2024, 20, 6655-6667.

W wyżej przedstawionych publikacjach wykonałam następujące zadania:

Ad. 1-2. Prowadziłam nadzór nad badaniami dotyczącymi cytotoksyczności porowatych i nieporowatych sieci polimerowych. Prowadziłam nadzór nad badaniami dotyczącymi proliferacji komórek kostnych na porowatych sieciach. Uczestniczyłam w interpretacji wyników analiz. Uczestniczyłam w przygotowaniu manuskryptu.


dr hab. Agnieszka Krupa, prof. UŁ

Oświadczenie wydane na prośbę mgr inż. Bartosza Kopki w związku z przygotowaniem pracy doktorskiej.

Łódź dn. 27.05.2025

mgr Agata Tomaszewska
Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej
Wydział Biologii i Ochrony środowiska
Uniwersytet Łódzki

Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że w ramach przygotowania następujących artykułów naukowych:

1. Kopka B, Kost B, Pawlak A, Tomaszewska A, Krupa A, Basko M, Covalent segmented polymer networks composed of poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) and selected aliphatic polyesters: designing biocompatible amphiphilic materials containing degradable blocks, **Soft Matter**, 2023, 19, 6987-6999.
2. Kopka B, Kost B, Pawlak A, Bąk-Sypień I, Brzeziński M, Tomaszewska A, Krupa A, Józwiak P, Basko M, Biocompatible, porous hydrogels composed of aliphatic polyesters and poly(2-isopropenyl-2 oxazoline). Their application as scaffolds for bone tissue regeneration, **Soft Matter**, 2024, 20, 6655-6667.

W wyżej przedstawionych publikacjach wykonałam następujące zadania:

Ad. 1-2. Uczestniczyłam w scharakteryzowaniu nieporowatych i porowatych sieci polimerowych za pomocą badania na cytotoksyczność. Uczestniczyłam w badaniu proliferacji komórek kostnych na porowatych sieciach. Przygotowałam rysunki do manuskryptów. Uczestniczyłam w interpretacji wyników analiz.


mgr Agata Tomaszewska

Oświadczenie wydane na prośbę mgr inż. Bartosza Kopki w związku z przygotowaniem pracy doktorskiej.

Łódź dn. 27.05.2025

dr Piotr Józwiak
Katedra Zoologii Bezkręgowców
i Hydrobiologii
Wydział Biologii Ochrony środowiska
Uniwersytet Łódzki

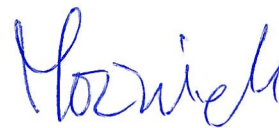
Oświadczenie współautora publikacji

Oświadczam, że w ramach przygotowania następujących artykułów naukowych:

1. Kopka B, Kost B, Pawlak A, Bąk-Sypień I, Brzeziński M, Tomaszewska A, Krupa A, Józwiak P, Basko M, Biocompatible, porous hydrogels composed of aliphatic polyesters and poly(2-isopropenyl-2 oxazoline). Their application as scaffolds for bone tissue regeneration, **Soft Matter**, 2024, 20, 6655–6667.

W wyżej przedstawionych publikacjach wykonałem następujące zadania:

Ad. 1. Uczestniczyłem w scharakteryzowaniu porowatych sieci polimerowych zawierających hydroksyapatyt za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) i metody spektroskopii dyspersji energii (EDS).



dr Piotr Józwiak

Oświadczenie wydane na prośbę mgr inż. Bartosza Kopki w związku z przygotowaniem pracy doktorskiej.

Publikacja 1:

Kopka B., Kost B., Rajkowska K., Pawlak A., Kunicka-Styczyńska A., Biela T., Basko M., A simple strategy for efficient preparation of networks based on poly(2-isopropenyl-2-oxazoline), poly(ethylene oxide), and selected biologically active compounds: Novel hydrogels with antibacterial properties, **Soft Matter**, **2021**, **17**, **10683-10695**.



Cite this: *Soft Matter*, 2021,
17, 10683

A simple strategy for efficient preparation of networks based on poly(2-isopropenyl-2-oxazoline), poly(ethylene oxide), and selected biologically active compounds: Novel hydrogels with antibacterial properties†

Bartosz Kopka, ^a Bartłomiej Kost, ^{*a} Katarzyna Rajkowska, ^b
 Andrzej Pawlak, ^a Alina Kunicka-Styczyńska, ^b Tadeusz Biela ^a and
 Malgorzata Basko ^{*a}

Novel polymer networks composed of biocompatible, hydrophilic poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) (PiPOx), poly(ethylene oxide) (PEO), and selected biologically active compounds (cinnamic acid, benzoic acid or eugenol) were developed for potential antimicrobial applications. The applied crosslinking method, based on the addition reaction between oxazoline pendant groups and chosen reagents containing carboxyl functions, is relatively facile, free from by-products, and thus well suited for biomaterial preparation. The one-step synthesis enabled efficient network formation with high gel contents (>90%). The chemical structure of the newly synthesized networks was characterized using Fourier Transform Infrared-attenuated Total Reflection spectroscopy (FTIR-ATR) and ¹³C Magic-Angle Spinning (MAS) NMR. To evaluate the suitability for biomedical applications, swelling in water and the mechanical properties of the networks were investigated. The antimicrobial efficacy of the prepared hydrogels was tested in neutral medium both by the agar diffusion method and in the liquid culture against Gram-positive and Gram-negative strains: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae*. All the tested hydrogels showed an antimicrobial effect in the direct contact zone. Moreover, the eugenol loaded hydrogel expressed a broader bacteriostatic effect inhibiting microorganism growth beyond the contact zone. These form-stable hydrogels with antibacterial properties may be of interest for designing materials dedicated to biomedical applications.

Received 20th July 2021,
Accepted 25th October 2021

DOI: 10.1039/d1sm01066b

rsc.li/soft-matter-journal

Introduction

Polymer-based materials have received considerable attention due to the potential of addressing the challenges associated with our daily life. The broad and versatile use of polymeric materials results from diversified physico-chemical and thermo-mechanical properties that allow their adaptation to a wide range of uses.¹ Hydrogels represent a unique class of materials, the hydrophilic structure of which renders them

the ability to hold large amounts of water in their three-dimensional networks while maintaining their stable tailored shape and size.^{2,3} The specific properties of hydrogels, such as hydrophilicity and appropriate flexibility, make them interesting materials that are used in medicine. The wide range of applications for hydrogel materials includes drug delivery systems, temporary soft tissue substitutes and wound dressings.^{4–7}

For hydrogel preparation, diverse strategies based on chemical or physical crosslinking methods were elaborated.^{8,9} The most often applied water-soluble polymers used for the construction of hydrogels include: poly(ethylene glycol), poly(acrylic acid), poly(vinyl alcohol), poly(vinylpyrrolidone), poly(acrylamide) and some polysaccharides.¹⁰ In particular, poly(ethylene glycol) (PEG), as a commercially available, non-toxic, and non-immunogenic polymer, is broadly exploited in the biomedical field.^{11,12} However, aiming at network preparation the proper functionalization of PEG is required prior to the crosslinking

^a Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, Sienkiewicza 112, 90-363 Lodz, Poland. E-mail: baskomeg@cbmm.lodz.pl, kost@cbmm.lodz.pl

^b Institute of Fermentation Technology and Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Lodz University of Technology, Wólczńska 171/173, 90-924 Lodz, Poland

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d1sm01066b

process. For example, to obtain PEG-based networks by radical polymerization the presence of unsaturated groups in the polymer chain is essential.^{13–16} This kind of crosslinking reaction is very often carried out in the presence of chemical compounds that are sometimes toxic, so before planned application the synthesized gels must be extracted extensively to remove traces of unreacted compounds. Looking for more biologically benign processes the gelling systems were elaborated based on crosslinking reactions which can be accomplished *in situ*, with non-toxic residual compounds. In this regard aldehyde, amine, or succinimidyl glutarate functionalized PEGs have been fabricated and networks with covalent linkages between polymer chains were obtained by the reaction of functional groups with complementary reactivity.^{17,18} Nevertheless, biomedical applications also require laborious purification of the synthesized materials.

Recent progress in polymer chemistry opened up new opportunities for the synthesis of novel water-soluble polymer types with advanced properties.¹⁹ Among them, hydrophilic poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) (PiPOx) can be considered as a very interesting functional polymer that can be applied in biomedicine due to nontoxicity.²⁰ Additionally, owing to the reactive moiety at the pendant groups, PiPOx possesses the powerful ability for modification with multiple chemical compounds containing suitable functionality (*e.g.* carboxyl, thiol or phenyl groups).^{21,22} The efficiency of PiPOx functionalization was investigated using benzoic acid as a model compound.²³ By grafting azo-dye with carboxyl groups to oxazoline pendant groups polymer particles with fluorescence properties were obtained.²⁴ By the post-polymerization modification reaction of PiPOx with aliphatic carboxylic acids (acetic and propionic butyric acids) thermoresponsive copolymers with a tuned hydrophilic/hydrophobic balance were prepared.^{25,26} In the case of dicarboxylic acids HOOC-R-COOH (where R = $-(CH_2)_m-$, $m = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10$) a library of hydrogels was obtained by chemical crosslinking of PiPOx.²⁷ Chemical crosslinking of a modified PiPOx polymer containing a terpyridine unit with an azelaic acid enabled preparation of the supramolecular hydrogels with ultrahigh mechanical strength and toughness.²⁸ What is significant is that the post-transformation of PiPOx may be achieved by the addition reaction that proceeds under simple reaction conditions (no need of catalysts) without by-product formation.²⁹ Given the hydrophilic nature of the polymer, it can be expected that it may be particularly useful in the construction of biomedical materials intended, among other things, to protect the skin from dehydration and bacterial contamination.

Superficial skin damage, burns and wounds are often associated with bacterial infections, that occur with a wide range of clinical manifestations. Etiological agents of these infections vary and may originate from a patient's natural microbiota or be transferred from an external environment.^{30,31} The most common cause of skin and soft tissue infections (SSTI) is *Staphylococcus aureus*, although *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp., and *Escherichia coli* have also been identified in confirmed SSTI episodes.^{32,33} The majority of acute wounds caused by external damage to intact skin and chronic wounds

that ultimately compromises the integrity of dermal and epidermal tissue are polymicrobial, involving *S. aureus*, *P. aeruginosa*, beta-hemolytic streptococci, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Prevotella melaninogenica*, and *Bacteroides* spp.³¹ In burn wound infections the principal etiological agents are *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus* spp., and *E. coli*, however, *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Acinetobacter* spp., and *Bacteroides* spp. have also been identified.³⁰

The latest WHO Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System report shows the steadily increasing antimicrobial resistance that involves all major microbial pathogens and antibiotics.³⁴ Nowadays, the greatest global threat to public health is co-trimoxazole-resistant *E. coli* and *K. pneumoniae*, which cause urinary tract infections, as well as resistance to 3rd generation cephalosporins *E. coli* and methicillin-resistant *S. aureus* in bloodstream infections. Another concern is the high rates of resistance against carbapenems, found among others in bloodstream infections causing *Acinetobacter* strains. The factors responsible for antimicrobial resistance include overuse of antibiotics or their inappropriate prescribing and use, as well as discontinuation of medication after the disease symptoms have resolved. Under these conditions, the evolution and dissemination of resistance within bacterial populations is promoted through mobile genetic elements such as plasmids, transposons, naked DNA or bacteriophages.³⁵ The application of novel substances or those previously rarely used in therapy makes it possible to overcome these limitations and problems, as it reduces the probability that microorganisms have already developed resistance to these compounds. Therefore, the new compounds may provide an important alternative to drugs that are routinely used in medicine. Recently, inhibitory activity against methicillin-resistant *S. aureus* clinical strains, eradications of pre-established biofilms, and a decrease in the expression of biofilm- and enterotoxin-related genes have been reported for eugenol *in vitro* and *in vivo*.³⁶ Similarly, high antibacterial properties have been demonstrated for benzoic acid against multidrug-resistant *K. pneumoniae* and *E. coli* strains, and for cinnamic acid against multidrug-resistant *S. aureus* and *E. coli* clinical isolates.³⁷ In addition, these compounds also show synergistic interactions with various antibiotics, enhancing their antimicrobial effects.³⁸

So far, for wound dressing applications, various hydrogels with antibacterial performance and good water-maintaining ability have been fabricated from bio- and synthetic polymers.^{4,39–41} Different methods allowing the preparation of antibacterial hydrogels have been applied.^{42,43} However, some disadvantages, such as multi-step fabrication, short existence at the wound site, inadequate swellability to absorb excess wound exudations, insufficient strength to overcome stress caused by skin movement and deficient flexibility properties severely limit the extensive use of many hydrogels. Therefore, significant efforts are directed to develop new materials for skin protection.

Below, we present a simple, robust, one-step method that enables hydrogel formation under conditions that ensure crosslinking without toxic components in the reaction mixture. For network construction, di-carboxyl terminated poly(ethylene oxide)

(HOOC-PEO-COOH) was applied as a hydrophilic macro-crosslinker for oxazoline side rings in PiPOx chains. Cinnamic acid, benzoic acid and eugenol were chosen as compounds that demonstrate antimicrobial action.^{44–46} The nature of the formed hydrogels has been investigated regarding swelling and mechanical properties. After the hydrogel characterization the antimicrobial activity was widely evaluated.

Experimental part

Materials

2-Isopropenyl-2-oxazoline (iPOx) was purchased from Sigma Aldrich (99%) and purified by vacuum distillation directly before use. Azobisisobutyronitrile (AIBN) (Sigma Aldrich, 99%) was crystallized from dried ethanol at 40 °C, dried under reduced pressure, and stored in a dark vial at 4 °C. Benzoic acid (BA) (Sigma Aldrich, 96%) was crystallized from water/ethanol (1:1) directly before use. Poly(ethylene glycol) (PEG, $M_n = 400 \text{ g mol}^{-1}$), *Candida antarctica* lipase B (CALB), cinnamic acid (CA, 99%), eugenol (EU, 99%), and succinic anhydride were purchased from Sigma Aldrich and used without further purification. Chloroform, diethyl ether, acetone, and hexane (StanLab, Lublin, Poland) were used as received. Dimethylformamide (DMF, 99.8%) (ChemPur) was used as received. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (POCH, Gliwice, Poland) and distilled water were sterilized before use. Phosphate buffer saline (PBS) was purchased from Merck in the form of tablets. The solution of PBS (0.1 M, pH = 7.4) was prepared by dissolution of one tablet in 200 mL of distilled water.

Synthesis of poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) (PiPOx) via radical polymerization

The radical polymerization of iPOx was performed using a high vacuum technique. In a typical experiment, 100 mg (0.61 mmol) of AIBN was placed in a glass ampule, and 10 mL (89.3 mmol) of iPOx was subsequently distilled under reduced pressure. The ampule was degassed three times and sealed in a vacuum. The reaction vessel was placed in an oil bath at 60 °C for 24 h until the reaction mixture solidified. After cooling of the ampule, the polymer was crushed, dissolved in chloroform, precipitated to cold diethyl ether, and dried under vacuum. The obtained PiPOx was analyzed by ^1H NMR, ^{13}C NMR, and SEC.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 4.11 (2H, s, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}$), 3.70 (2H, s, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}$), 2.0–1.69 (2H, $-\text{CH}_2-$ overlapping, polymer chain), 1.54–1.0 (3H, overlapping, CH_3-), (Fig. S2 in ESI†).

^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 172.80 (1C, $-\text{N}=\text{C}-\text{O}$), 66.96 (1C, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}$), 54.29 (1C, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}$), 52.56 (1C, $-\text{C}(\text{CH}_3)-$), 40.13 (1C, $-\text{CH}_2-$, polymer chain) 19.91 and 17.92 (1C, CH_3-), (Fig. S2 in ESI†).

^{13}C NMR CP MAS (400 MHz), δ (ppm) = 170.7 (1C, s $-\text{C}=\text{O}$), 66.5 (1C, s, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}$), 53.5 (1C, s, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}$), 39.1 (1C, s, $-\text{C}(\text{CH}_3)-$), 28.5–10.6 (1C, main chain) (Fig. 2).

Molar mass determined by SEC with MALLS detector $M_n = 62\,000 \text{ g mol}^{-1}$ ($d_n/d_c = 0.109 \text{ mL g}^{-1}$) (Fig. S1 in the ESI†).

The value of the refractive index increment (d_n/d_c) necessary to determine the absolute molar mass of poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) was determined in our laboratory using the MALLS, RI detectors and the Astra[®] software supporting the chromatographic set.

Synthesis of di-carboxyl poly(ethylene oxide) (HOOC-PEO-COOH)

The polymeric cross-linker was prepared by converting the hydroxyl end-groups of poly(ethylene glycol) into the required carboxyl ones in the enzymatic reaction. In an Erlenmeyer flask, 10 g (0.025 mol) of PEG-400 and 5.25 g (0.0525 mol) of succinic anhydride were dissolved in 20 mL of acetone. Then, 300 mg of CALB was added, and the reaction mixture was placed in a thermal shaker at 40 °C (110 RPM) for 24h. After 24h, the enzyme was filtered off, and the polymer was precipitated in cold hexane, decanted, and dried under vacuum. The high conversion of hydroxyl groups into the carboxyl moiety was estimated by ^1H NMR.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm) = 7.49 (2H, s, $-\text{COOH}$), 4.23 (4H, m, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$), 3.72–3.56 (4H, s, $-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{O}-$), 2.60 (8H, m, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$).

Preparation of PiPOx-PEO networks

The addition reaction between pendant rings of PiPOx and carboxyl-end group of poly(ethylene oxide) HOOC-PEO-COOH was applied to prepare PiPOx-PEO hydrogels. Briefly, 53 mg of PiPOx and 18 mg of HOOC-PEO-COOH were dissolved in 0.5 mL of DMSO in a glass vial. The mixture was stirred under reduced pressure to degas the system, and after complete dissolution of the components was put into an oven at 140 °C for 45 min. Then, the formed hydrogel was transferred to the vial with sterilized water for 72 h and kept at 4 °C.

^{13}C NMR CP MAS (400 MHz), δ (ppm) = 175.8 (2C, s, PEO carbonyl), 170.7 (1C, s $-\text{C}=\text{O}$), 68.1 (1C, s, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ and 1C, s, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$), 65.5 (1C, s, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}$, oxazoline ring), 52.4 (1C, s, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}$, oxazoline ring), 43.3 (1C, s, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$), 37.9 (1C, s, $-\text{C}(\text{CH}_3)-$), 28.5–10.6 (1C, main chain), (Fig. 2).

Preparation of networks modified with antibacterial compounds (PiPOx-PEO-CA, PiPOx-PEO-BA, PiPOx-PEO/EU)

The networks modified with antibacterial compounds were prepared in the similar manner as PiPOx-PEO networks. Briefly, 52 mg of PiPOx, 18 mg of HOOC-PEO-COOH, and appropriate antibacterial agent CA (7 mg), BA (6 mg), or EU (7.5 mg) were dissolved in 0.5 mL of DMSO in a glass vial. The mixture was degassed by stirring under reduced pressure, and after the dissolution of components, was put into the oven at 140 °C for 45 min. Then, the formed PiPOx-PEO-CA, PiPOx-PEO-BA hydrogels were transferred to the vial with sterilized water for 72h and kept at 4 °C. The PiPOx-PEO/EU hydrogel after synthesis was kept in a vial without the introduction of an additional solvent.

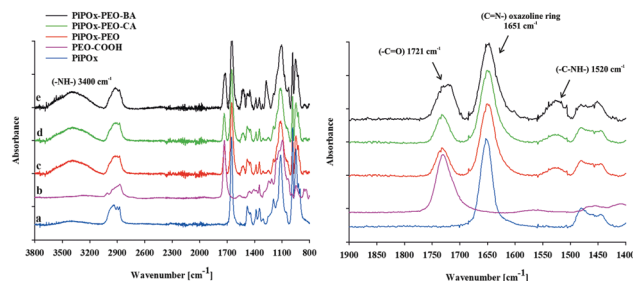


Fig. 1 ATR FT-IR spectra of: (a) PiPOx, (b) HOOC-PEO-COOH cross-linker, (c) PiPOx-PEO, (d) PiPOx-PEO-CA and (e) PiPOx-PEO-BA networks.

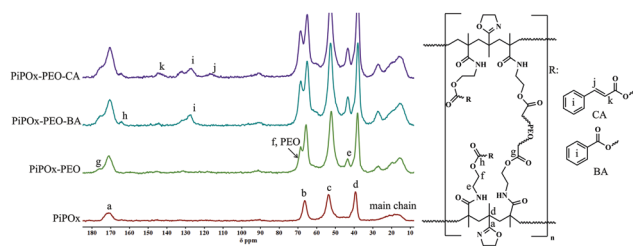


Fig. 2 CP MAS NMR spectra (500 MHz): PiPOx, PiPOx-PEO, PiPOx-PEO-CA, PiPOx-PEO-BA networks.

Prior to the analysis all synthesized networks were extracted: first with CH_2Cl_2 to remove unreacted HOOC-PEO-COOH or PiPOx, and next with EtOH to remove unreacted antibacterial compounds. Such purified networks, after drying, were investigated by FTIR (Fig. 1) and ^{13}C NMR CP MAS (Fig. 2).

NMR PiPOx-PEO-CA. ^{13}C NMR CP MAS (400 MHz), δ (ppm) = 175.8 (1C, s, PEO carbonyl), 170.7 (1C, s -C=O), 68.1 (1C, s, -O-CH₂-CH₂-O- and 1C, s, -NH-CH₂-CH₂-O-C(O)-), 164 (1C, s, cinnamic acid carbonyl), 144 (1C, double bond attached to phenyl ring), 134–123 (6C aromatic carbon) 118 (1C, double bond), 65.5 (1C, s, -O-CH₂-CH₂-N=), 43.3 (1C, s, -NH-CH₂-CH₂-O-C(O)-), 37.9 (1C, s, -C(CH₃)-), 28.5–10.6 (C, main chain).

NMR PiPOx-PEO-BA. ^{13}C NMR CP MAS (400 MHz), δ (ppm) = 175.8 (2C, s, PEO carbonyl), 170.7 (1C, s -C=O), 164 (1C, s, benzoic acid carbonyl), 68.1 (1C, s, -O-CH₂-CH₂-O- and 1C, s, -NH-CH₂-CH₂-O-C(O)-), 134–123 (6C aromatic carbon) 65.5 (2C, s, -O-CH₂-CH₂-N=), 43.3 (2C, s, -NH-CH₂-CH₂-O-C(O)-), 37.9 (1C, s, -C(CH₃)-), 28.5–10.6 (4C, main chain).

Determination of gel fraction

Networks were extracted with dichloromethane and next with ethanol in Soxhlet apparatus over 4h and then dried at room temperature under vacuum until constant weight. The gel fraction (GF) was determined as the weight ratio between the weight of an insoluble dried gel (W_d) and the initial weight of the starting mixture (W_i) using the following formula:

$$\text{GF} = \frac{W_d}{W_i} \times 100\%$$

where W_d and W_i are the weight of dried gel and the initial weight of material (Table S1 in the ESI†).

Determination of swelling degree

The degree of the network swelling was determined gravimetrically. Dried discs were weighed (W_d) and then placed in water. The weight of the swollen gel (W_s) was measured at specific time intervals after removal of excessive surface water using filter papers. The degree of swelling (S) was calculated using the following formula:

$$S = \left(\frac{W_s - W_d}{W_d} \right) \times 100\%$$

where W_s and W_d are the weights of the hydrogel in swollen and dried forms, respectively.

Characterization

The average molar masses and molecular weight distribution were determined by LS measurements using a size-exclusion chromatography (SEC) system comprising an Agilent Pump 1100 Series (preceded by an Agilent G1379A Degasser), equipped with a set of two PLGel 5 μ MIXED-C columns. A Wyatt Optilab Rex differential refractometer and a Dawn Eos8 (Wyatt Technology Corporation) laser photometer were used as detectors. Dimethyl formamide was used as an eluent at a flow rate of 0.4 mL min⁻¹ at 40 °C. The refractive index increment (d_n/d_c) value for PiPOx in DMF was determined at 40 °C. The MALS-RID data were further analyzed with Astra 5.3 software, from Wyatt Technology.

Fourier-transform infrared spectroscopy spectra were recorded on a Nicolet 6700 spectrometer equipped with a deuterated triglycine sulphate (DGTS) detector. Attenuated Total Reflectance was used for IR measurements. The spectra were obtained by adding 128 scans at a 2 cm⁻¹ resolution. The solid-state ^{13}C CP MAS experiments were performed on a BRUKER Avance III 400 spectrometer operating at 100.613 MHz for ^{13}C , equipped with a MAS probe head using 4 mm ZrO₂ rotors.

Release of eugenol from a PiPOx-PEO/EU hydrogel

The release of eugenol from a PiPOx-PEO/EU hydrogel was measured by using the UV/Vis technique. In a typical experiment, the round-shaped hydrogel (11 × 0.4 mm), prepared according to the described above procedure, was put into the glass vial containing 5 mL of PBS. The vial was placed into a thermal shaker at 37 °C under stirring (80 rpm). After the selected time interval, the released medium (5 mL) was withdrawn for UV/Vis analysis, and the fresh portion of PBS was added. The amount of released EU was calculated by using the calibration curve (Fig. S4, ESI†) measured for the eugenol at 282 nm on a dilution series. Finally, the cumulative amount of released eugenol was plotted against time (Fig. 10). The analysis was performed in triplicate.

Mechanical properties

The mechanical properties were tested during uniaxial compression using the Linkam TST 350 mini tensile machine. The tests were carried out at $T = 25$ °C. Samples with a diameter of

11 mm and thickness of 5 mm were placed between two plates, in a special holder, enabling the conversion of the standard uniaxial tensile mode to uniaxial compression, with the measurement of the compressive force as a function of distance. The deformation rate was $15 \mu\text{m s}^{-1}$. Five samples of each material were measured.

Rheology

Rheological tests were carried out using the Ares rotational rheometer (TA Instruments), in the plate–plate configuration (25 mm diameter), changing the frequency in the range $0.1\text{--}512 \text{ rad s}^{-1}$, at a temperature of 25°C , with a strain of 0.5%. After the sample was taken out of the water, its surface was gently dried, then the sample was placed between the plates of the apparatus and before the measurement was lightly compressed to a thickness of 1.2 mm. This ensured good contact between the sample and the apparatus and comparable measurement conditions.

Assessment of antibacterial activity of hydrogels by the agar diffusion method

To determine the antibacterial activity of four hydrogels PiPOx–PEO, PiPOx–PEO–CA, PiPOx–PEO–BA, and PiPOx–PEO/EU by the agar diffusion method, the European Union Standard PN-EN ISO 20645:2006 assay was adapted. In the test, bacterial strains of *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11229 and *Enterobacter cloacae* ATCC 49141 were used. All the bacterial strains originated from American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, USA). The strains were stored on Tryptic Soy Agar (TSA) medium (pancreatic digest of casein 1.5%, papain digest of soya 0.5%, sodium chloride 0.5%, agar 1.5%, pH 7.2; bioMérieux, France) and prior to experiments activated by the subsequent passaging (37°C , 24 h) in Tryptic Soy Broth (TSB) medium (pancreatic digest of casein 1.7%, papain digest of soya 0.3%, sodium chloride 0.5%, dextrose 0.25%, dipotassium phosphate 0.25%, pH 7.3; bioMérieux, France) and TSA medium.

The tested hydrogels with a diameter of 11 mm were placed between two TSA layers. The upper TSA layer was mixed with the suspension of a specific bacteria strain in sterile saline (sodium chloride 0.85%) to a density of 105–106 cells per mL. The plates were incubated at 37°C for 18–24 h. The inhibition zone was measured along with the diameter of the hydrogel disc. The assessment of bacterial growth was also carried out in the contact zone under the hydrogel discs. The tests were conducted in triplicates and the results subjected to statistical analysis. The negative controls were DMSO for PiPOx–PEO/EU hydrogel and water for the other hydrogels tested.

Assessment of antibacterial activity of hydrogels in liquid cultures

The effects of the hydrogels (PiPOx–PEO, PiPOx–PEO–CA, PiPOx–PEO–BA, PiPOx–PEO/EU) on the tested bacteria were also investigated in TSB medium. 10 mL of TSB medium were inoculated with a suspension of specific bacteria in saline up to

105–106 cells per mL and one hydrogel disc (11 mm in diameter) was placed in the culture. The cultures were incubated at 37°C for up to 48 h with agitation (200 rpm). The bacterial growth in the cultures with and without hydrogel discs was measured spectrophotometrically at λ 540 nm at 0, 4, 8, 24 and 48 h of incubation.

Statistical analysis

All experiments were conducted in triplicates. Statistical analysis (means, standard deviations) was carried out with the use of the Statistica v.10.0 software package (StatSoft Inc., USA). In order to compare the means, a One-Way ANOVA test was performed at p -value = 0.05 significance level (Statistica v.10.0, StatSoft Inc.).

Results and discussion

Preparation of PiPOx–PEO based networks

For the construction of hydrophilic networks di-carboxyl PEO was used as a polymeric cross-linker for PiPOx chains. The covalent crosslinking occurring as the result of the addition reaction between oxazoline rings and reagents containing carboxyl groups has been previously demonstrated for aliphatic organic acids with 4 to 10 carbon atoms.²⁷ As the result short chains with hydrophobic character were grafted into the hydrophilic polymer. Our work was aimed at further extending this approach by employing a hydrophilic polymer terminated with carboxyl end-groups at both sides of the chain. Additionally, the reaction of pendant oxazoline rings was performed with benzoic acid, cinnamic acid, and eugenol to introduce compounds with antimicrobial properties into the network.

Applying simultaneously: low and high-molecular reagents containing suitable reactive groups, we planned to achieve at one-step synthesis a covalently crosslinked structure comprising microbiologically active agent.

At the first stage of the research, the crosslinking reaction was carried out with HOOC-PEO-COOH ($M_n = 500 \text{ g mol}^{-1}$) and PiPOx in DMSO, at 140°C for 45 min. The applied molar ratio of carboxyl groups to oxazoline rings should allow the network formation with a theoretical degree of crosslinking equal to 15%. We observed that under these conditions, by simply mixing the components in the solvent, the stable PiPOx–PEO networks were successfully formed. The crosslinking reactions conducted in mixtures with lower PEO content were ineffective and durable hydrogels were not obtained.

In subsequent experiments, the crosslinking reaction between PiPOx and POE was conducted in the presence of CA, BA, and EU (5 mol% according to iPOx rings). A successful gelation process was observed regardless of the composition of the starting reaction mixture. To determine the gel content obtained networks were extracted with solvents (first with dichloromethane, and next with ethanol) which allows removal of unreacted components. Data presented in the Table S1 (ESI[†]) show that for the network obtained by crosslinking of PiPOx by HOOC-PEO-COOH the determined gel content (97%) was very

close to the total weight of the starting reaction mixture. This observation is crucial in our research, as it demonstrates the possibility of efficient crosslinking of biocompatible, hydrophilic polymers in a reactive system that is free from toxic catalysts and by-products.

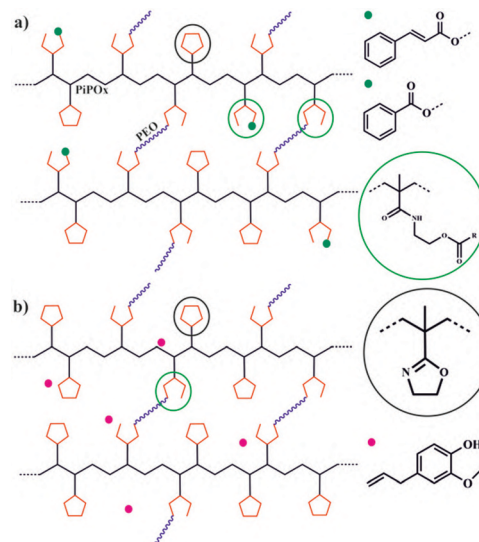
In the case of the crosslinking reactions conducted in the presence of cinnamic acid and benzoic acid, the determined gel content was equal 96% and 95%, respectively. The observed very low content of soluble fractions indicated a highly efficient coupling occurring between the carboxyl-functionalized reagents under the used conditions. As a result, networks built from covalently bonded hydrophilic chains (PiPOx-PEO) were obtained, as well as the modified networks that additionally contained a covalently attached group of cinnamic or benzoic acid (designed as PiPOx-PEO-CA and PiPOx-PEO-BA).

In case of the crosslinking conducted in the presence of eugenol the determined gel fraction constituted 90% of the total weight of the starting reaction mixture. The soluble fraction that has been extracted from the network was analyzed by ^1H NMR and it was found that it contains mainly unreacted eugenol. Thus, this compound was not covalently coupled with the network but remained as a free component at the cross-linked PiPOx-PEO structure. To confirm this observation further experiments were performed with linear PiPOx and eugenol at the conditions used for the network synthesis. The ^1H NMR spectrum of precipitated PiPOx revealed signals typical for non-modified polymer indicating that the phenol groups from eugenol do not react with oxazoline pendant groups at the applied solvent, at 140°C within 45 minutes.

On the basis of the determined gel contents, it can be concluded that, depending on the used biologically active compound, PiPOx-PEO networks can be obtained with an antimicrobial component that is covalently linked to PiPOx chains (as a non-leaching agent: Scheme 1a) or is freely loaded into the network (as a leaching agent: Scheme 1b). Nevertheless, it should be remembered that, when designing the composition of the network, due to the required elevated reaction temperature, an appropriate selection of active substances with good stability at 140°C is necessary.

To gain insight into the composition of the formed networks, ATR FT-IR analysis was conducted for the extracted and dried samples (Fig. 1).

In the spectrum of the starting, linear PiPOx (Fig. 1, blue line) characteristic absorptions of the oxazoline ring are observed at 1651 cm^{-1} ($-\text{C}=\text{N}$ stretching) and 1118 cm^{-1} ($-\text{C}-\text{O}$ stretching), while other ring skeletal vibrations can be found at 986 and 951 cm^{-1} .⁴⁷ After partial crosslinking of PiPOx with $\text{HOOC}-\text{PEO}-\text{COOH}$, an ester-amide structure is formed (see Scheme 1, green circle). In all spectra the signal corresponding to the amide band appears at 1520 cm^{-1} ($-\text{C}-\text{NH}-$) and the carbonyl stretching vibration of the newly generated ester bonds can be found at 1721 cm^{-1} ($-\text{C}=\text{O}$) (overlapping with a PEO carbonyl end-group). Thus for each composition, FT-IR data indicated the efficient grafting of the polymeric crosslinker to the PiPOx chain. However, this method cannot be used to confirm the presence of biologically active compounds in



Scheme 1 Schematic illustration of the PiPOx-PEO network structures: (a) with covalently bonded cinnamic and benzoic acid, and (b) with freely loaded eugenol (R denotes: $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2=\text{CH}_2-$, C_6H_5- , or $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ in the case of cinnamic acid, benzoic acid and PEO, respectively).

the network, due to their much lower concentration, compared to the polymeric components and overlapping with other signals. Thus, to further investigate the material composition the ^{13}C magic-angle spinning NMR technique was used. Fig. 2 shows CP MAS spectra for the dried networks, along with the PiPOx spectrum for reference.

The CP MAS NMR spectrum collected for PiPOx enabled the identification of signals coming from the main polymer chain in the range $10\text{--}30\text{ ppm}$ ($-\text{CH}_3$ groups) and at 38 ppm ($-\text{CH}_2-$ groups). Signals from carbon atoms in the oxazoline pendant ring were observed at 53 ppm ($-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}$), 68 ppm ($-\text{CH}_2-\text{O}-$) and 170 ppm ($-\text{O}-\text{C}=\text{N}-$). After grafting of PEO chains, a new signal from $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ groups is observed at 66 ppm . A signal from the $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ group between amide and ester linkages are observed at 44 ppm and 66 ppm . A carbonyl group from the newly formed amide linkage is observed in the range 175 ppm overlapping with the ester carbonyl group. Although the spectra of the network prepared in the presence of benzoic and cinnamic acids are dominated by the intense peaks from oxazoline repeating units, characteristic signals from aromatic rings (130 ppm , BA, CA) and double bonds (CA) are also detected.

Thus, it can be concluded that IR and CP MAS analysis confirmed the successful attainment of networks with the composition determined by the composition of the starting reaction mixture. The presented results show that by the applied one-step method antibacterial agents can be efficiently and simply incorporated into the synthesized PiPOx-PEO networks. Importantly, multicomponent networks can be produced using a controlled and efficient synthesis route that requires minimal purification of the final product.

Such prepared networks at room temperature maintained their shape and could be easily manipulated without damage.

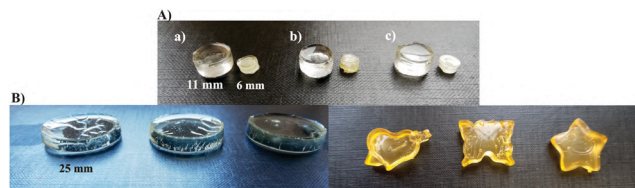


Fig. 3 (A) Physical appearance of fully swollen and dried (after extraction) hydrogels: (a) PiPOx-PEO, (b) PiPOx-PEO-CA, (c) PiPOx-PEO-BA. (B) Using a simple crosslinking procedure hydrogels can be freely molded into the desired size and shape (note: the yellow color comes from the applied mold form).

As demonstrated in the video in the ESI,[†] the material also well tolerated mechanical deformation due to motion and reposition. The physical appearance of the fully swollen and dried hydrogels is presented in Fig. 3.

The swollen hydrogels containing acids were transparent and had similar appearances as the non-modified PiPOx-PEO gel. Furthermore, we checked that the applied method can be easily upscaled enabling the preparation of hydrogel materials with larger dimensions and defined shapes. The dried hydrogels had good stability and could be re-swollen after placing in an aqueous environment. From SEM pictures (Fig. S3 in the ESI[†]) it can be observed that the dried networks have a rather compact microstructure.

Swelling properties of hydrogels

The swelling behavior is of special interest in biomedical applications when the high water content is crucial because it facilitates the diffusion of drugs or biologically active compounds. To assess the applicability of the synthesized networks as hydrogels the dried networks were characterized by swelling experiments conducted in water. Furthermore, the water-retention was investigated. Fig. 4 shows the dependence of the swelling degree in water (a) and the water retention (b) on network composition.

It can be noted, from Fig. 4a, that the obtained hydrogels swell in water to a larger extent relatively fast. As the swelling degree in water is mainly determined by the hydrophilicity, networks built from PiPOx and PEO reached the highest degree of swelling (>200%). The swelling abilities of the hydrogels containing covalently bound cinnamic and benzoic acid are slightly lower (~150% and 140%, respectively) but these

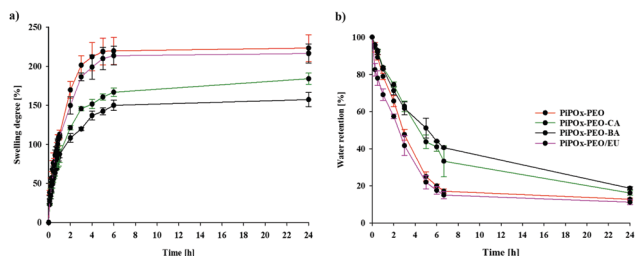


Fig. 4 Properties of hydrogels prepared from poly(isopropenyl-2-oxazoline) (PiPOx), poly(ethylene oxide) (PEO) and selected biologically active compounds: (a) the degree of swelling in deionized water at room temperature, and (b) the water retention at room temperature.

materials still are retaining a significant fraction of water within their structure without dissolving. This observation indicates that obtained hydrogels have a large water absorption capacity which is favorable in biomedical and microbiological applications. In general, the required swelling capacity of hydrogels depends on the intended function. For comparison, for poly(ethylene oxide)-based hydrogels prepared for tissue engineering scaffold application the reported values of swelling ratio in water were in the range from 1.8 to 12.6%, whereas for wound dressing they were much higher (310–770%).^{14,48} The water-retention capacity in the hydrogels is also significant for biomaterials. Typical profiles of water evaporation from prepared hydrogels are presented in Fig. 4b. In the initial stage, after 6h of drying at room temperature, hydrogels with cinnamic and benzoic acids show a significant reduction in water loss in comparison to the PiPOx-PEO sample. After 24 h, all samples still contain water in the structure which indicates that the prepared hydrogels can retain moisture for a long period of time in the atmosphere.

Mechanical test

The mechanical properties of hydrogels are an important factor determining the practical application of these materials.⁴⁹ In particular, the elasticity of hydrogels in the wet state is a critical property that determines the material capability of deformation.^{50,51}

Therefore, in our work, we have examined the mechanical properties of hydrogels swollen in distilled water during uniaxial compression. The tested materials were flexible and easily bent under the action of force. During the compression experiment, no significant differences in their mechanical properties were observed. Fig. 5 illustrates the relationship of the force-compression ratio determined for the examined hydrogels.

The force-compression relationship has a shape typical for elastomers. After a short range of the linear dependence, at the compression ratio of 1.02, the character of deformation changed and from this degree of compression the force gradually increased with the deformation. The compression ratio (CR) is

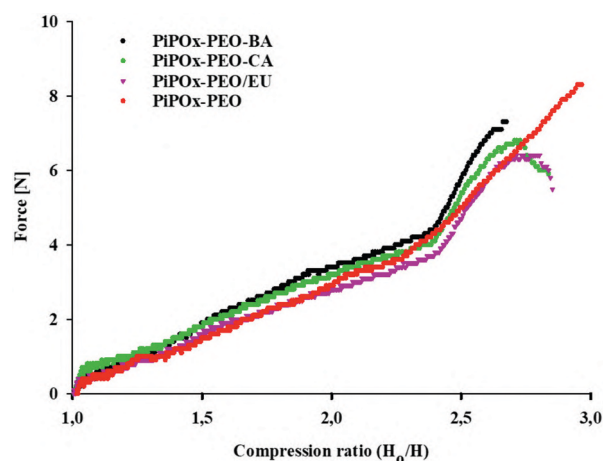


Fig. 5 The dependence of the force on the degree of compression for the tested hydrogels. Representative curves are shown. The differences between individual samples of one type were negligible.

Table 1 Elastic modulus of examined materials

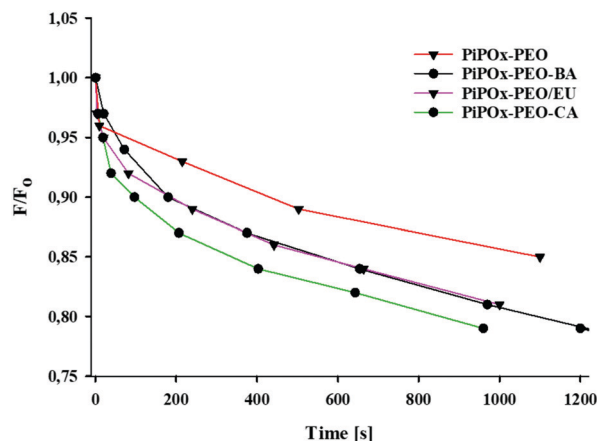
Sample	Elastic modulus [kPa]
iPOx-PEO	208 ± 4
PiPOx-PEO-CA	204 ± 4
PiPOx-PEO-BA	212 ± 4
PiPOx-PEO/EU	204 ± 4

defined here as the ratio of the original thickness of the sample (H_0) to the actual thickness (H). The values of the modulus of elasticity, characterizing the mechanical properties at small deformations, are presented in Table 1.

The values of the elasticity modulus of the tested hydrogels are close to the values reported for hydrogels with good mechanical properties.^{52,53} As can be seen, there are no significant differences in the modulus between the tested materials. Fig. 5 shows that the faster increase in the measured force is observed from the compression ratio 2.4, which resembles the strain-hardening effect and is associated with limiting the possibility of further deformation of the network. Finally, typically at the compression ratio of 2.7, the sample suddenly breaks. Only the PiPOx-PEO samples, not subjected to additional modification, achieved a higher compression ratio equal to approximately 3.0. The forces required to compress the samples were very small, and their fragmentation occurred at a force of 6–8 N. The study of the compression behavior of the materials showed that they retained the structure coherence (continuity) even with a significant degree of compression. This means that the tested materials perform well in conditions of slight deformation, and therefore, for example, they can be used as external protective means (wound dressing) of the human body. During the measurements, it was also observed that the water did not come out of the samples before the moment of their destruction, which is also a positive factor at biomedical applications.

To have a deeper insight into the properties of the obtained materials, we also investigated a stress relaxation of the prepared hydrogels. The relaxation effect is often used to analyze differences between macromolecular networks, as factors affecting the relaxation time include chemical crosslinking of the polymer, physical entanglement of chains and stiffness of macromolecules.^{54,55} In the performed experiment, after the sample was compressed to a ratio of 2.3, the compression was stopped and the force relaxation was measured as a function of time. Fig. 6 shows how the force F changed with time in relation to the force F_0 measured immediately after the compression of the sample was stopped.

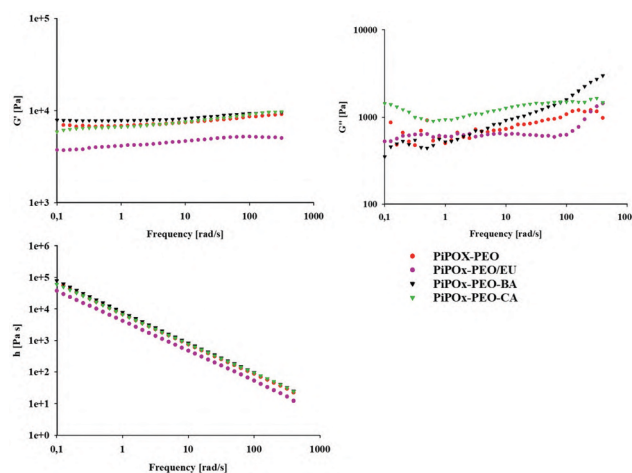
In the first phase, a rapid decrease in force was observed within the first 20 seconds, and then in the second phase the changes were much slower. After 300–400 s the relaxation stabilized and for all tested materials the force decreased approximately linearly with time. There were differences in the level of relaxation between samples in the second phase. The slowest relaxation can be noticed in the non-modified PiPOx-PEO sample whereas the modified samples relaxed faster. The differences between them were not large, however

**Fig. 6** Relaxation of force with time after stopping the compression of samples at CR = 2.3.

the fastest decrease in the stress level occurred in the PiPOx-PEO-CA sample. By studying hydrogel stress relaxation, it has been confirmed that tested gels are mainly elastic materials, due to covalent cross-links.

The rheological investigation provided more information on the stability of the formed hydrogels. The rheological properties of the materials were examined in the frequency sweep test and the results are shown in Fig. 7.

As can be seen from Fig. 8a and b, the loss modules were much lower than the storage ones, so the curves did not cross anywhere, for each of the tested hydrogels. This indicates the stability of the networks during the measurements, without the effects of the breakdown of chemical bonds. The values of the storage modules slowly increased with frequency and for samples (PiPOx-PEO), (PiPOx-PEO-CA), (PiPOx-PEO-BA) approached the value $G' = 10^4$ Pa at a frequency of 512 rad s⁻¹. For comparison, the soft poly(ethylene glycol) based hydrogels designed for cell culture are characterized by much lower storage and loss modulus (0.3–3.5 Pa).⁵⁶ Almost constant values of G' over

**Fig. 7** Rheological properties of materials examined in the frequency sweep test: (a) storage modulus G' , (b) loss modulus G'' , and (c) complex viscosity η .

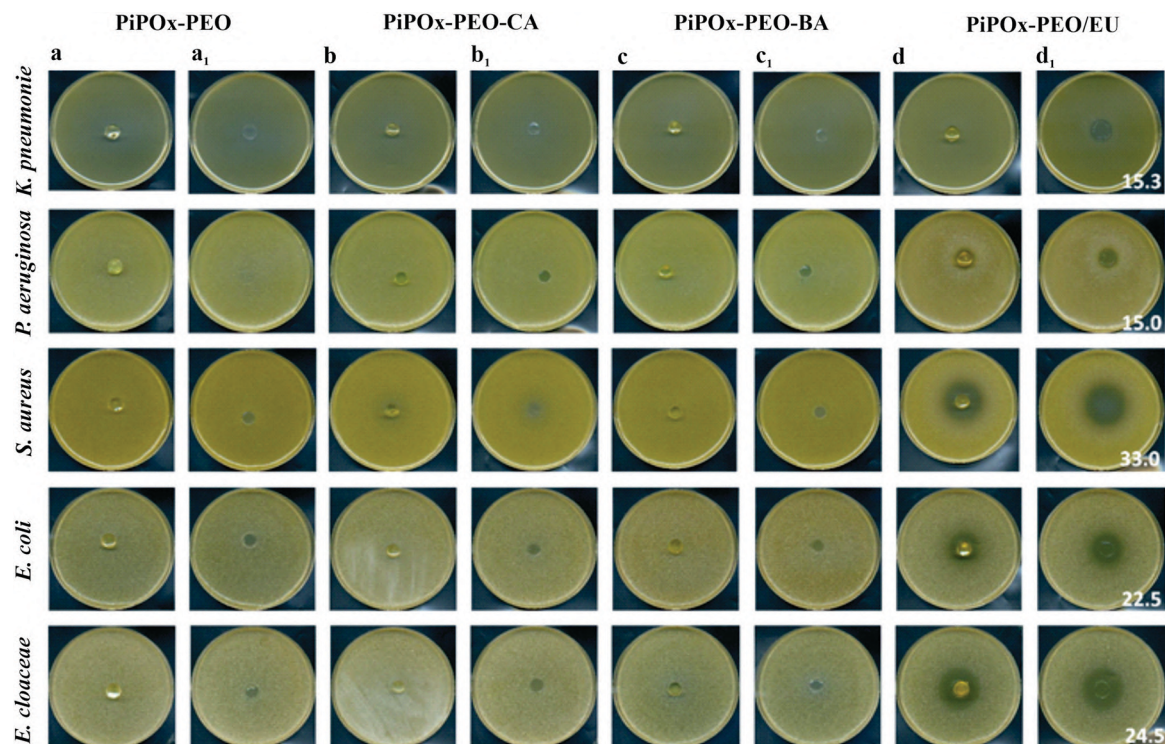


Fig. 8 Bacterial growth around the hydrogel discs (a–d) and under the specimen (a1–d1): neat hydrogel (PiPOx–PEO), hydrogel containing bounded cinnamic acid (PiPOx–PEO–CA), hydrogel containing bounded benzoic acid (PiPOx–PEO–BA), eugenol-loaded hydrogel (PiPOx–PEO/EU), in the agar diffusion plate test; figures indicate the average diameter of the growth inhibition zone in mm.

a wide frequency range are also interpreted as the result of a stable cross-linked network, and the minimum value at low frequencies is taken as the equilibrium shear modulus.^{57,58} Sample PiPOx–PEO/EU with the maximum storage modulus equal to 5.5×10^3 Pa demonstrated different rheological properties in comparison to other analyzed samples. This behavior can be attributed to the plasticization of the matrix by the presence of free (not attached to a network) eugenol. Moreover, this influence can also be seen for other viscosity parameters. For example, the loss modulus for this sample begins to increase with frequency at the latest, and this increase, seen from $\omega = 100 \text{ rad s}^{-1}$, is then the fastest. Fig. 8c also shows the change in the complex viscosity with frequency. The relationship for all samples is linear on a logarithmic scale. This means that the measurement conditions were far from the termination ones. The results of the rheological studies were basically consistent with the compression tests and indicated that the obtained hydrogels showed adequate mechanical strength to be ensured for their effective use.

Summarizing the results presented in this part of the research, it can be concluded that applying the addition reaction between side oxazoline rings in the polymer chain and appropriate reagents containing carboxylic functions allowed us to obtain multicomponent networks suitable for practical use as hydrogels.

Microbiological studies

Hydrogels seem to be very attractive carriers of active substances due to their high surface area to volume ratio and structural controllability.^{59,60} To our knowledge the mechanism

of a release of small molecules from the hydrogel has not been defined and may probably differ according to the compounds structure. A number of research studies on antibacterial hydrogels are focusing on their antimicrobial activity omitting the mechanistic approach.^{43,61} The release of small molecules upon acidic hydrolysis of the connecting ester bonds is highly probable but the rate of the hydrolysis and the antimicrobial action efficiency may be affected by several factors *e.g.* a type of the medium, a microorganism type, a physiological state of microorganism or mechanism of the resistance likewise the direct cell-molecule interactions.^{62,63} Further research will be necessary to explore the mechanism of the antimicrobial action of PiPOx–PEO hydrogels loaded with small molecules with antiseptic activity and herein we present preliminary results obtained at the first stage of studies.

The assessment of antibacterial activity of the tested hydrogels was carried out in TSA medium against bacteria considered as the most common etiological factors in wounds, skin and soft tissue infections: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *E. cloacae*. In the agar diffusion assay, we unexpectedly found that even the non-modified hydrogel (PiPOx–PEO) inhibited the growth of the tested strains in the direct contact zone (Fig. 8a and a1). The microbiological activity observed for hydrogels containing covalently bound cinnamic (PiPOx–PEO–CA) or benzoic (PiPOx–PEO–BA) acid was comparable to the activity of a non-modified hydrogel (Fig. 8b, b1 and c, c1). The hydrogel loaded with eugenol (PiPOx–PEO/EU) expressed the highest antibacterial activity evidenced by the broad inhibition zones around the

hydrogel discs ranging from the diameter of 15.0 ± 0.5 in *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* cultures to 33.0 ± 0.6 mm in *S. aureus* cultures (Fig. 8d and d1). The activity of the PiPOx-PEO/EU hydrogel against *E. coli* and *E. cloacae* was respectively 31.8 and 25.8% lower compared to its activity against *S. aureus* (22.5 ± 0.4 mm and 24.5 ± 0.6 mm inhibition zone diameter). The low activity of the hydrogel loaded with eugenol against *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* may be attributed to the high drug resistance of the tested bacterial strains. The differences in antibacterial activity of the hydrogel loaded with eugenol may be attributed to the diffusion of this active compound into the medium. Although according to the PN-EN ISO 20645:2006 standard all the newly synthesized hydrogels are classified as active against tested bacteria, however, one with eugenol expresses the disinfectant effect beyond the contact zone.

To check the release of active compounds from hydrogels their antimicrobial activity in the liquid cultures were also assessed. The obtained results were consistent with those received in the agar diffusion test. The neat PiPOx-PEO hydrogel as well as the ones with cinnamic (PiPOx-PEO-CA) and benzoic acid (PiPOx-PEO-BA) had no pronounced effect on the growth dynamics of all the tested bacteria (Fig. 10). Although statistically significant differences in the bacteria populations compared to the control culture without hydrogels were found after 48 h for PiPOx-PEO (*S. aureus*, *E. coli*) and PiPOx-PEO-BA (*K. pneumoniae*, *E. coli*) and PiPOx-CA (*E. coli*), they did not exceed 16.8%. The distinct antibacterial effect was observed in all growth cultures with eugenol-loaded hydrogel PiPOx-PEO/EU after 48-hour incubation (Fig. 9), where the bacteria populations were reduced from 42.3% (*K. pneumoniae*) to 92.3% (*E. cloacae*). This high antibacterial activity of eugenol-loaded hydrogel PiPOx-PEO/EU in TSB should be attributed to the release of eugenol from the studied sample.

The release of eugenol from the hydrogel specimen was evidenced by growth inhibition of the tested bacteria in the liquid cultures. Eugenol is recognized by its vast biological activity against a variety of microorganisms. High antimicrobial activity of this major component of clove essential oil has been reported against among others antibiotic-resistant *S. aureus*, *E. coli*, *Candida albicans*, pathogenic *E. coli* and *K. pneumoniae*, and clinical *Candida* spp. strains.^{64–66} The eugenol action is ascribed to the cell membrane disruption, cytoplasm leakage and potassium balance disorder, which was proven against *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *Proteus mirabilis*.^{67,68} Eugenol and its monomeric derivatives eugenyl methacrylate and ethoxyeugenyl methacrylate seem to be the promising compounds for biologically active copolymeric systems with biomedical applications since the eugenyl containing copolymer implants retarded the growth of *E. coli* and *Streptococcus* sp.⁶⁹ Eugenol may also be considered as the natural phenol serving as the aromatic building block for the biobased monomer synthesis with biological activity.⁷⁰ The antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus* of eugenol-derivative polymer poly(eugenol) was demonstrated by Prasetya *et al.*⁷¹

The *in vitro* release of eugenol from the PiPOx-PEO hydrogel was analyzed in PBS, at pH = 7.4, at 37 °C. In order to obtain the

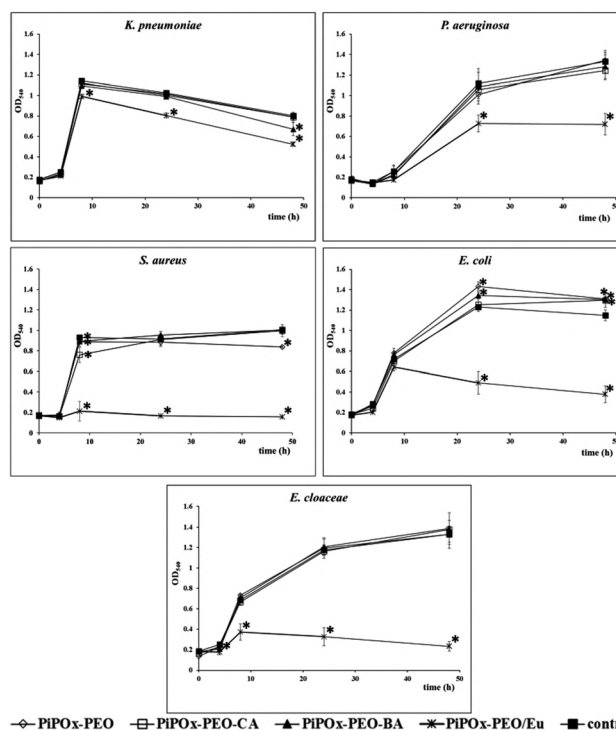


Fig. 9 Dynamics of bacterial growth in the presence of the hydrogel discs: diamond – neat hydrogel PiPOx-PEO, empty square – cinnamic acid-bounded hydrogel PiPOx-PEO-CA, triangle – benzoic acid-bounded hydrogel PiPOx-PEO-BA, asterisk – eugenol-loaded hydrogel PiPOx-PEO/EU, black square – control cultures without hydrogel discs; * indicates a statistically significant difference at the 5% level between the culture with hydrogel and the control culture.

drug release profile, the results expressed as cumulative release were plotted *versus* time (Fig. 10). From the obtained curve it is evident that the steady leaching of a biologically active compound from the network occurs for 70 hours. The obtained results showed that after 10 hours approximately 80% of eugenol was released from the gel. It may be assumed that at the first stage, the fast effect is caused by the diffusion of eugenol molecules from the surface of the hydrogel disc, and the slower release occurs from deeper parts of the hydrogel.

Based on the presented results, we can conclude that the binding of cinnamic and benzoic acids in the hydrogel structure did not affect considerably the antibacterial properties of the neat PiPOx-PEO hydrogel. The PiPOx-PEO and both cinnamic and benzoic acid-containing hydrogels expressed the antibacterial action in the contact zone. However, the literature data show both cinnamic and benzoic acids to be active against *Klebsiella pneumoniae* and multidrug-resistant *Escherichia coli*.³⁷ Cinnamic acid has been also demonstrated to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Candida albicans*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Bacillus subtilis*, and *Aspergillus niger*.^{37,72} Cinnamic and benzoic acids cause bacterial membrane perturbation or rupture, which results in nucleic acid and protein leakage leading to cell inactivation and death.^{62,72} Benzoic acid is allowed to be used as a chemical preservative in cosmetic, drug and food industries. Previously, benzoic acid functional groups

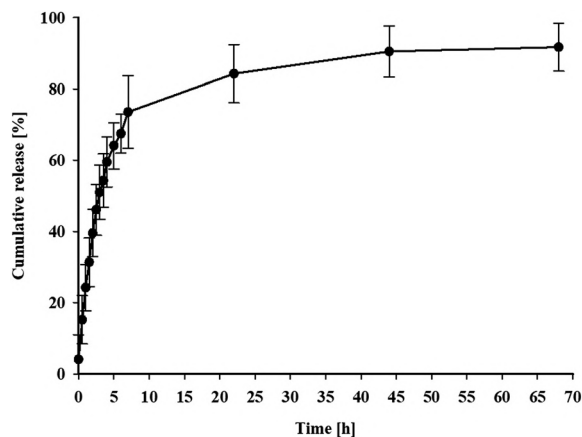


Fig. 10 Cumulative release of eugenol from the hydrogel.

were successfully incorporated into monomers, providing a material with antibacterial activity against *S. aureus* and *P. aeruginosa*.⁴⁵ Also, the use of cinnamic acid resulted in shape-memory polyurethane foams with antimicrobial properties against *E. coli* and *S. epidermidis*.⁷³ In our study no differences in the antibacterial activity of the neat hydrogel PiPOx and the hydrogels with cinnamic (PiPOx-PEO-CA) and benzoic acids (PiPOx-PEO-BA) in the liquid cultures may be presumably driven by the lack of acid diffusion from the hydrogels. It should be noted that the strongest antimicrobial activity of benzoic acid was observed at pH 2.5–4.0.⁷⁴ Therefore, it cannot be ruled out that the acidity of TSA and TSB media (close to neutral) used in the experiments may result in the loss of the antibacterial effect of benzoic acid, as observed by Krátký.⁶¹ Having this in mind, we plan in the future to carry out much more systematic studies to determine the suitable conditions for the enhanced microbiological activity of the obtained networks. As the current research was designed to evaluate network properties at neutral pH the subject of separate studies will include antimicrobial efficiency at lower pH.

Taken together the results presented here imply that the investigated hydrogels, containing crosslinked PiPOx and PEO, as well as, additionally covalently bounded cinnamic (PiPOx-PEO-CA) or benzoic (PiPOx-PEO-BA) acids, may be potentially applied on surfaces requiring the deactivation of bacteria on the contact zone. Thus, regarding the observed antimicrobial activity at the defined surface, these gels may be used as a top wound dressing. The eugenol-loaded hydrogel can be applied as an effective carrier for *in vivo* applications when leaching of the active compound is essential.

Conclusions

In conclusion, we described the synthesis and evaluation of the antimicrobial properties of multicomponent networks prepared from poly(2-isopropenyl-2-oxazoline), poly(ethylene oxide), cinnamic acid, benzoic acid, or eugenol. The efficient crosslinking of these selected biocompatible and hydrophilic polymers was demonstrated in a reactive system that was free from toxic catalysts and by-products, for the first time. The resulting

hydrogels obtained in the one-step synthesis showed suitable mechanical properties that allowed easy handling and practical application. Independently of the network composition the studied hydrogels present an antimicrobial effect in the direct contact zone. Additionally, the eugenol-loaded hydrogel expressed a broader bacteriostatic effect inhibiting microorganism growth beyond the contact zone. The resulting hydrogels may be of great interest as antimicrobial materials that can be used in wound healing and infection prevention dressings.

Author contributions

Bartosz Kopka: synthesis, material preparation, antibacterial tests. Bartłomiej Kost: synthesis and analysis, material preparation, visualization, reviewing and editing. Katarzyna Rajkowska: supervision of microbiological tests. Andrzej Pawlak: mechanical properties characterization. Alina Kunicka-Styczyńska: writing. Tadeusz Biela: discussion of results. Małgorzata Basko: conceptualization, original draft writing and supervising.

Conflicts of interest

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgements

Financial support from the National Science Centre, Poland, Grant No. 2020/37/B/ST5/03302 is gratefully acknowledged.

Notes and references

- 1 B. D. Fahlman, *Materials Chemistry*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2018, pp. 373–483.
- 2 E. M. Ahmed, *J. Adv. Res.*, 2015, **6**, 105–121.
- 3 W. A. Laftah, S. Hashim and A. N. Ibrahim, *Polym.-Plast. Technol. Eng.*, 2011, **50**, 1475–1486.
- 4 E. A. Kamoun, E. R. S. Kenawy and X. Chen, *J. Adv. Res.*, 2017, **8**, 217–233.
- 5 M. Mir, M. N. Ali, A. Barakullah, A. Gulzar, M. Arshad, S. Fatima and M. Asad, *Prog. Biomater.*, 2018, **7**, 1–21.
- 6 C. M. Kirschner and K. S. Anseth, *Acta Mater.*, 2013, **61**, 931–944.
- 7 A. M. Ribeiro and T. H. S. Flores-Sahagun, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, 2020, **69**, 979–989.
- 8 W. E. Hennink and C. F. Van Nostrum, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2002, **54**, 13–36.
- 9 V. Nele, J. P. Wojciechowski, J. P. K. Armstrong and M. M. Stevens, *Adv. Funct. Mater.*, 2020, **30**, 1–22.
- 10 A. S. Hoffman, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2012, **64**, 18–23.
- 11 F. M. Veronese and A. Mero, *BioDrugs*, 2008, **22**, 315–329.
- 12 B. Kost, M. Brzeziński, M. Socka, M. Baško and T. Biela, *Molecules*, 2020, **25**, 3404.
- 13 X. Li, M. Basko, F. Du Prez and I. F. J. Vankelecom, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 16539–16545.

- 14 J. Kim, K. W. Lee, T. E. Hefferan, B. L. Currier, M. J. Yaszemski and L. Lu, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 149–157.
- 15 S. Jo, H. Shin, A. K. Shung, J. P. Fisher and A. G. Mikos, *Macromolecules*, 2001, **34**, 2839–2844.
- 16 J. M. Scheiger and P. A. Levkin, *Adv. Funct. Mater.*, 2020, **30**, 1909800.
- 17 T. Sakai, T. Matsunaga, Y. Yamamoto, C. Ito, R. Yoshida, S. Suzuki, N. Sasaki, M. Shibayama and U. Il Chung, *Macromolecules*, 2008, **41**, 5379–5384.
- 18 Y. Bu, L. Zhang, J. Liu, L. Zhang, T. Li, H. Shen, X. Wang, F. Yang, P. Tang and D. Wu, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016, **8**, 12674–12683.
- 19 C. L. McCormick and A. B. Lowe, *Acc. Chem. Res.*, 2004, **37**, 312–325.
- 20 Z. Kroneková, M. Mikulec, N. Petrenčíková, E. Paulovičová, L. Paulovičová, V. Jančinová, R. Nosál', P. S. Reddy, G. D. Shimoga, D. Chorvát and J. Kronek, *Macromol. Biosci.*, 2016, **16**, 1200–1211.
- 21 T. Nishikubo, T. Iizawa and A. Tökairin, *Makromol. Chern., Rapid Commun.*, 1981, 91–94.
- 22 J. A. Frump, *Chem. Rev.*, 1971, **33**, 483–505.
- 23 C. Weber, T. Neuwirth, K. Kempe, B. Ozkahraman, E. Tamahkar, H. Mert, C. R. Becer and U. S. Schubert, *Macromolecules*, 2012, **45**, 20–27.
- 24 V. V. Jerca, F. A. Nicolescu, R. Trusca, E. Vasile, A. Baran, D. F. Anghel, D. S. Vasilescu and D. M. Vuluga, *React. Funct. Polym.*, 2011, **71**, 373–379.
- 25 F. A. Jerca, V. V. Jerca, A. M. Anghelache, D. M. Vuluga and R. Hoogenboom, *Polym. Chem.*, 2018, **9**, 3473–3478.
- 26 F. A. Jerca, V. V. Jerca and R. Hoogenboom, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2019, **57**, 360–366.
- 27 F. A. Jerca, A. M. Anghelache, E. Ghibu, S. Cecoltan, I. C. Stancu, R. Trusca, E. Vasile, M. Teodorescu, D. M. Vuluga, R. Hoogenboom and V. V. Jerca, *Chem. Mater.*, 2018, **30**, 7938–7949.
- 28 X. Xu, F. A. Jerca, V. V. Jerca and R. Hoogenboom, *Adv. Funct. Mater.*, 2019, **29**, 1–10.
- 29 M. N. Leiske, A. M. Mahmoud, N. M. Warne, J. A. C. M. Goos, S. Pascual, V. Montembault, L. Fontaine, T. P. Davis, M. R. Whittaker and K. Kempe, *Polym. Chem.*, 2020, **11**, 5681–5692.
- 30 D. Church, S. Elsayed, O. Reid, B. Winston and R. Lindsay, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2006, **19**, 403–434.
- 31 P. G. Bowler, B. I. Duerden and D. G. Armstrong, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2001, **14**, 244–269.
- 32 T. C. Jenkins, A. L. Sabel, E. E. Sarcone, C. S. Price, P. S. Mehler and W. J. Burman, *Clin. Infect. Dis.*, 2010, **51**, 895–903.
- 33 V. Ki and C. Rotstein, *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*, 2008, **19**, 173–184.
- 34 Organización Mundial de la Salud, Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS), 2015.
- 35 R. J. Fair and Y. Tor, *Perspect. Med. Chem.*, 2014, 25–64.
- 36 M. K. Yadav, S. W. Chae, G. J. Im, J. W. Chung and J. J. Song, *PLoS One*, 2015, **10**, 1–21.
- 37 G. G. F. Nascimento, J. Locatelli, P. C. Freitas and G. L. Silva, *Braz. J. Microbiol.*, 2000, **31**, 247–256.
- 38 S. Hemaiswarya and M. Doble, *Phytomedicine*, 2009, **16**, 997–1005.
- 39 Z. Fan, B. Liu, J. Wang, S. Zhang, Q. Lin, P. Gong, L. Ma and S. Yang, *Adv. Funct. Mater.*, 2014, **24**, 3933–3943.
- 40 I. A. Duceac, L. Verestiuc, C. D. Dimitriu, V. Maier and S. Coseri, *Polymers*, 2020, **12**, 1–20.
- 41 N. Raina, R. Rani, R. Pahwa and M. Gupta, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, 2020, 1–17.
- 42 X. Zhang, M. Qin, M. Xu, F. Miao, C. Merzougui, X. Zhang, Y. Wei, W. Chen and D. Huang, *Eur. Polym. J.*, 2021, **146**, 110268.
- 43 S. Li, S. Dong, W. Xu, S. Tu, L. Yan, C. Zhao, J. Ding and X. Chen, *Adv. Sci.*, 2018, **5**, 1700527.
- 44 S. Tawata, S. Taira, N. Kobamoto, J. Zhu, M. Ishihara and S. Toyama, *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 1996, **60**, 909–910.
- 45 E. S. Park, W. S. Moon, M. J. Song, M. N. Kim, K. H. Chung and J. S. Yoon, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2001, **47**, 209–214.
- 46 M. Mielecki and B. Lesyng, *Curr. Med. Chem.*, 2016, **23**, 954–982.
- 47 V. V. Jerca, F. A. Nicolescu, A. Baran, D. F. Anghel, D. S. Vasilescu and D. M. Vuluga, *React. Funct. Polym.*, 2010, **70**, 827–835.
- 48 Haryanto, S. Kim, J. H. Kim, J. O. Kim, S. Ku, H. Cho, D. H. Han and P. Huh, *Macromol. Res.*, 2014, **22**, 131–138.
- 49 M. Ahearne, Y. Yang and K. Liu, *Tissue Eng.*, 2008, **4**, 1–16.
- 50 D. Lee, H. Zhang, S. Ryu, *Elastic Modulus Measurement of Hydrogels in Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels*, Springer, 2018, pp. 1–24.
- 51 C. Xu, W. Lee, G. Dai and Y. Hong, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018, **10**, 9969–9979.
- 52 R. Wang, N. Li, B. Jiang, J. Li, W. Hong and T. Jiao, *Colloids Surf., A*, 2021, **615**, 126270.
- 53 M. Mostakhdemin, A. Nand and M. Ramezani, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 2021, **116**, 104333.
- 54 P. Chiarelli, D. De Rossi and P. Bassar, *J. Intell. Mater. Syst. Struct.*, 1993, **4**, 176–183.
- 55 E. Prouvé, B. Drouin, P. Chevallier, M. Rémy, M. Durrieu and G. Laroche, *Macromol. Biosci.*, 2021, 2100069.
- 56 F. C. Chang, C. T. Tsao, A. Lin, M. Zhang, S. L. Levengood and M. Zhang, *Polymers*, 2016, **8**, 112.
- 57 M. J. Moura, M. M. Figueiredo and M. H. Gil, *Biomacromolecules*, 2007, **8**, 3823–3829.
- 58 J. M. Zuidema, C. J. Rivet, R. J. Gilbert and F. A. Morrison, *J. Biomed. Mater. Res., Part B*, 2014, **102**, 1063–1073.
- 59 R. Y. Pelgrift and A. J. Friedman, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2013, **65**, 1803–1815.
- 60 S. Marchesan, Y. Qu, L. J. Waddington, C. D. Easton, V. Glattauer, T. J. Lithgow, K. M. McLean, J. S. Forsythe and P. G. Hartley, *Biomaterials*, 2013, **34**, 3678–3687.
- 61 M. Krátký, J. Vinšová and V. Buchta, *Sci. World J.*, 2012, **2012**, 1–7.
- 62 S. Brul and P. Coote, *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, **50**, 1–17.
- 63 D. Kalemba and A. Kunicka, *Curr. Med. Chem.*, 2003, **10**, 813–829.
- 64 C. Pavesi, L. A. Banks and T. Hudaib, *J. Pharm. Sci. Res.*, 2018, **10**, 337–339.

- 65 L. Dhara and A. Tripathi, *Eur. J. Integr. Med.*, 2013, **5**, 527–536.
- 66 K. Rajkowska, A. Kunicka-Styczyńska and M. Maroszyńska, *Microb. Drug Resist.*, 2017, **23**, 18–24.
- 67 S. E. Walsh, J. Y. Maillard, A. D. Russell, C. E. Catrenich, D. L. Charbonneau and R. G. Bartolo, *J. Appl. Microbiol.*, 2003, **94**, 240–247.
- 68 K. P. Devi, R. Sakthivel, S. A. Nisha, N. Suganthi and S. K. Pandian, *Arch. Pharmacol. Res.*, 2013, **36**, 282–292.
- 69 L. Rojo, J. M. Barcenilla, B. Vázquez, R. González and J. San Román, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 2530–2535.
- 70 S. Molina-Gutiérrez, A. Manseri, V. Ladmira, R. Bongiovanni, S. Caillol and P. Lacroix-Desmazes, *Macromol. Chem. Phys.*, 2019, **220**, 1–10.
- 71 N. B. A. Prasetya, N. Ngadiwiyana, Ismiyarto and P. R. Sarjono, *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.*, 2019, **509**, 012101.
- 72 R. Cai, M. Miao, T. Yue, Y. Zhang, L. Cui, Z. Wang and Y. Yuan, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2019, **54**, 1697–1705.
- 73 M. B. B. Monroe, A. D. Easley, K. Grant, G. K. Fletcher, C. Boyer and D. J. Maitland, *ChemPhysChem*, 2018, **19**, 1999–2008.
- 74 V. N. Kalpana and V. Devi Rajeswari, *Preservatives and Preservation Approaches in Beverages*, 2019.

Supporting information for:

A Simple Strategy for Efficient Preparation of Networks Based on Poly(2-isopropenyl-2-oxazoline), Poly(ethylene oxide), and Selected Biologically Active Compounds. Novel Hydrogels with Antibacterial Properties

B. Kopka¹, B. Kost^{1*}, K. Rajkowska², A. Pawlak¹, A. Kunicka-Styczyńska², T. Biela¹, M. Basko^{1*}

¹Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences,
Sienkiewicza 112, 90-363 Lodz, Poland

²Institute of Fermentation Technology and Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food
Sciences, Lodz University of Technology, Wólczajska 171/173, 90-924 Lodz, Poland

*Email: baskomeg@cbmm.lodz.pl, kost@cbmm.lodz.pl,

Table of contents:

Figure 1S. GPC, ¹ H NMR and ¹³ C NMR spectrum of PiPOx.....	2
Figure 2S. ¹ H NMR of di-carboxyl poly(ethylene oxide) (HOOC-PEO-COOH).....	3
Figure 3S. SEM micrographs of the dried networks surface.....	4
Figure 4S. Calibration curve.....	5
Table 1S. Content of gel fraction.....	6

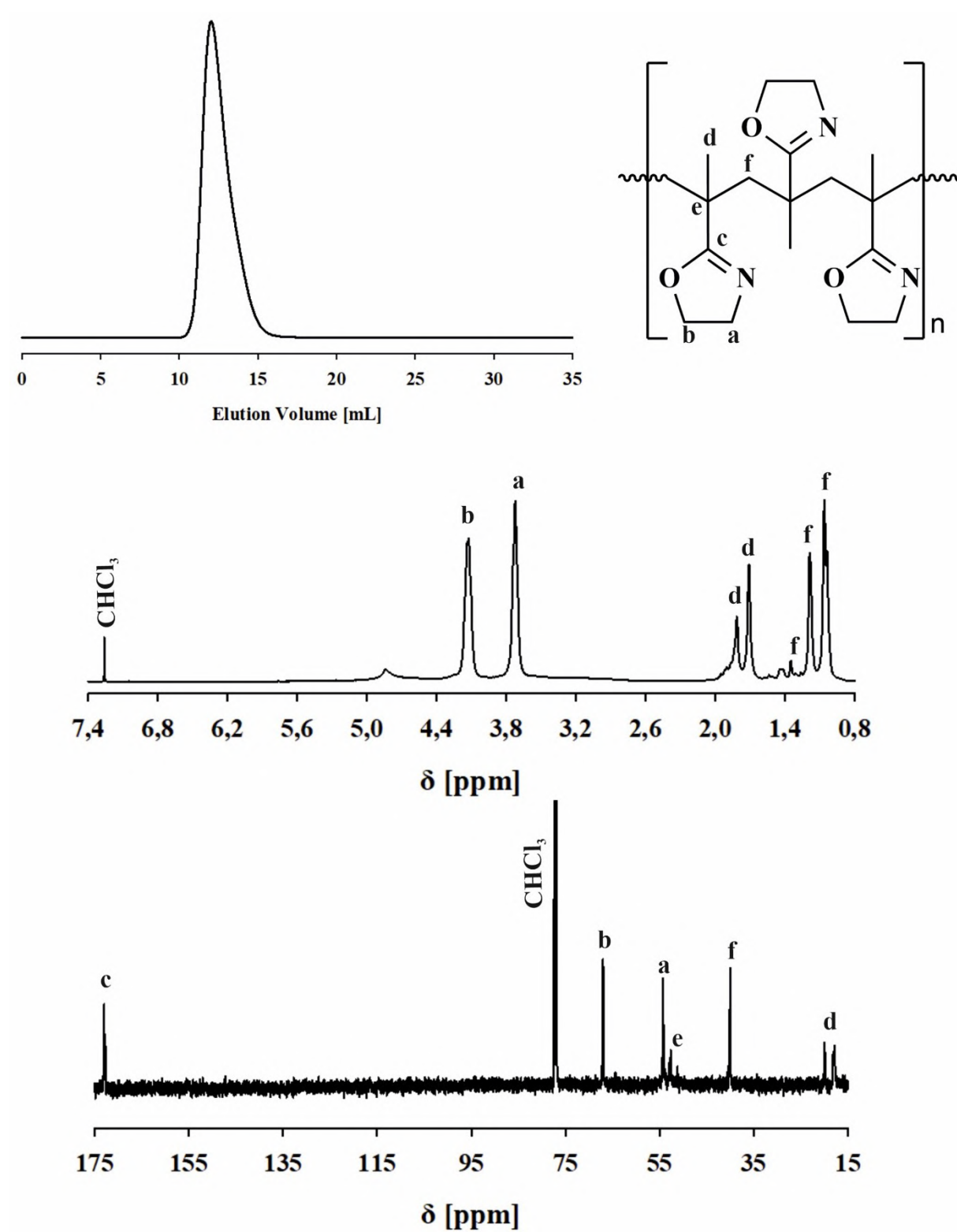


Figure 1S. GPC, ^1H NMR and ^{13}C NMR spectrum of PiPOx

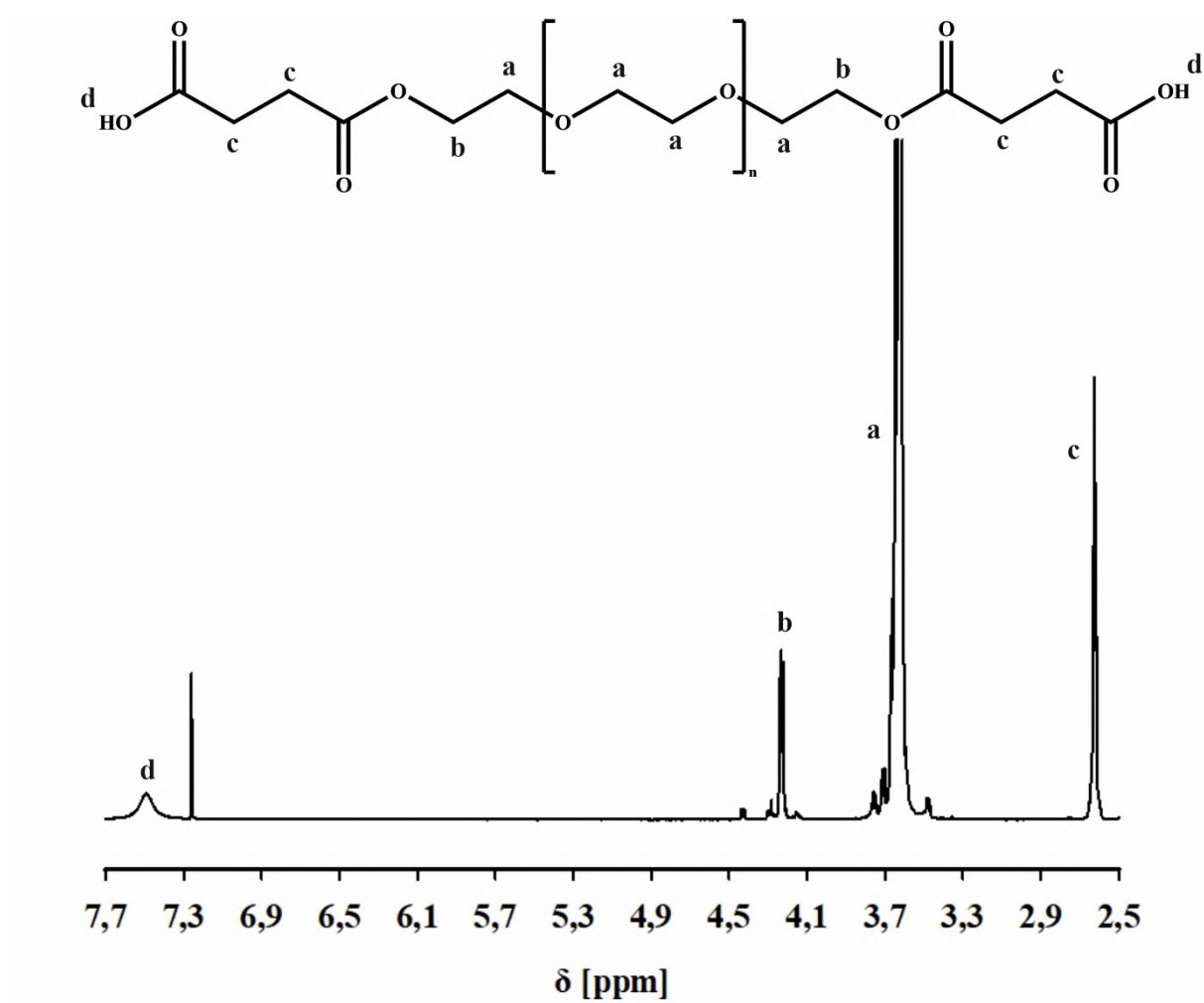


Figure 2S. ^1H NMR of di-carboxyl poly(ethylene oxide) (HOOC-PEO-COOH)

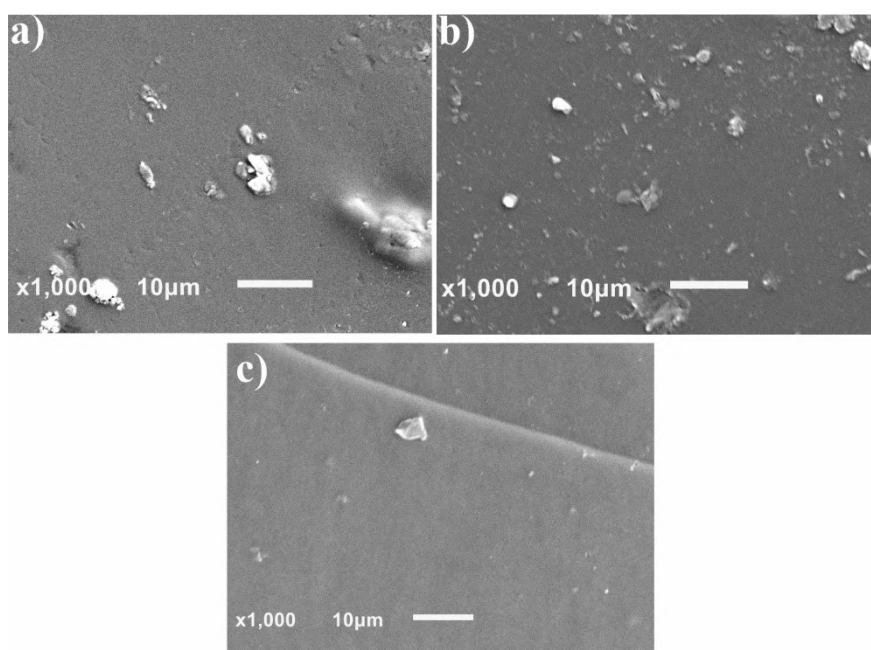


Figure 3S. SEM micrographs of the dried networks surface.

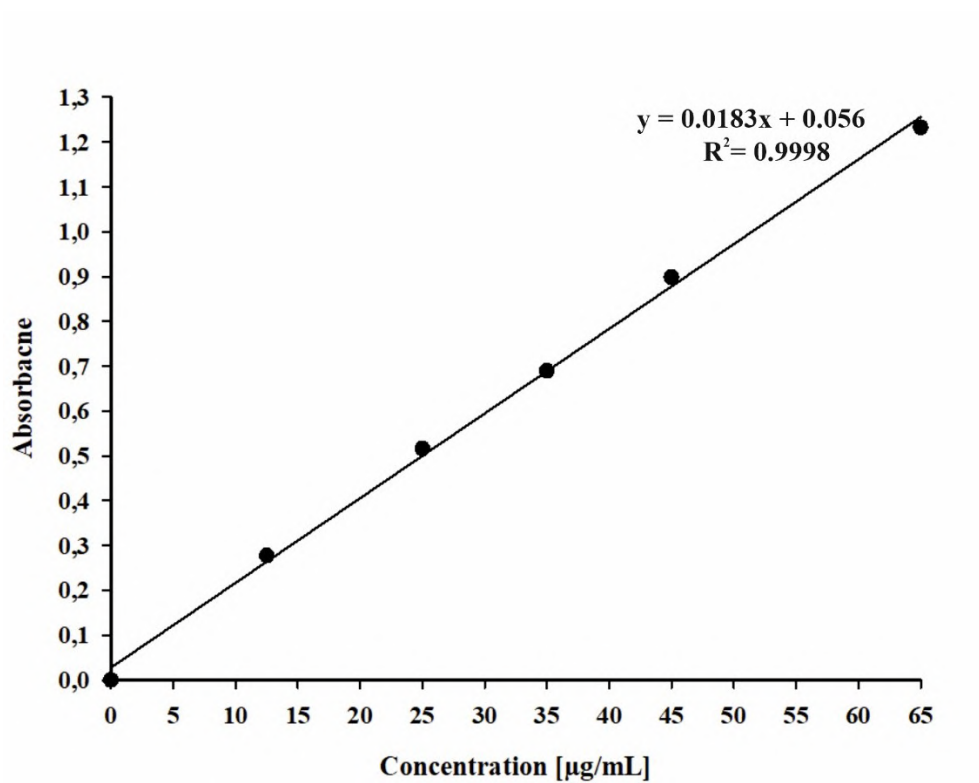


Figure 4S. Calibration curve

Table 1S. Content of gel fraction determined after extraction with dichloromethane and next, with ethanol.

Sample	m _{PiPOx} [mg]	m _{PEO} [mg]	m _{active compounds} [mg]	m _{dried network} [mg]	gel content [wt. %]
PiPOx-PEO	53	18	-----	69	97
PiPOx-PEO-CA	52	18	7	74	96
PiPOx-PEO-BA	53	18	6	73	94
PiPOx-PEO/Eu	51.5	18	7.5	69.5	90

Publikacja 2:

Kopka B., Kost B., Pawlak A., Tomaszewska A., Krupa A., Basko M., Covalent segmented polymer networks composed of poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) and selected aliphatic polyesters: designing biocompatible amphiphilic materials containing degradable blocks, **Soft Matter**, **2023**, **19**, **6987-6999**.



Cite this: DOI: 10.1039/d3sm00948c

Covalent segmented polymer networks composed of poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) and selected aliphatic polyesters: designing biocompatible amphiphilic materials containing degradable blocks†

Bartosz Kopka, ^a Bartłomiej Kost, ^a Andrzej Pawlak, ^a
 Agata Tomaszewska, ^{bc} Agnieszka Krupa ^b and Malgorzata Basko ^{*a}

To promote facile and efficient synthesis of segmented covalent networks, we developed a cross-linking process with reactive polymeric components in a system without catalysts or side products. To achieve the direct formation of amphiphilic networks, an addition reaction was performed between the polyesters containing carboxyl terminal groups with pendant groups distributed along poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) chains. Covalent cross-linking was achieved from predetermined amounts of components dissolved in DMSO at 140 °C. To tune the properties of the resulting networks, the composition and length of the polyester segments and the degree of cross-linking were changed in the feed. The chemical structure of the networks was characterized using Fourier transform infrared-attenuated total reflection spectroscopy and ¹³C magic-angle spinning NMR. The swelling ability of the formed networks was investigated in aqueous and organic media. Moreover, mechanical properties were tested during uniaxial compression. The cytocompatibility of the scaffolds was confirmed by MTT assay. Through the results obtained, the first report describing the cross-linking of polyesters on hydrophilic PiPOx was provided to prepare new, biocompatible materials with tuneable properties that are promising for potential biomedical applications.

Received 20th July 2023,
 Accepted 27th August 2023

DOI: 10.1039/d3sm00948c

rsc.li/soft-matter-journal

Introduction

Owing to their three-dimensional structure and specific properties resulting from this architecture, polymer networks are an essential class of materials in polymer chemistry.^{1,2} As a result of crosslinking, this kind of three-dimensional polymer is insoluble in all solvents; however, depending on the composition, the polymer can absorb various amounts of compatible solvent, maintaining a stable shape in the swollen state. Thus, networks composed of hydrophilic building blocks can hold large quantities of water, forming hydrogels.³ To construct hydrogels, water-soluble polymers are used, such as poly(ethylene glycol), poly(acrylic acid), poly(vinyl alcohol),

poly(vinylpyrrolidone), poly(acrylamide), poly(2-oxazoline), and some selected polysaccharides.⁴ Hydrogels, or water-swollen polymer networks, are of particular interest in biomedical fields and are applied, for example, as wound dressings and drug delivery systems.^{5–8} Two-component networks comprising covalently joined hydrophilic and hydrophobic segments show a unique capacity for swelling in aqueous and organic media.^{9,10} The properties of these amphiphilic networks can be broadly modulated in the desired direction by properly selecting building blocks.^{11,12} To introduce hydrophobic segments into the network, polybutadiene, polyisobutylene, polydimethylsiloxane or poly(tetrahydrofuran) may be used as building blocks.^{13–18} In addition, polyesters can be applied as hydrophobic components with controllable degradation due to hydrolysable linkages in the backbone.^{19–22} Recently, biodegradable and biocompatible networks that may undergo chain-cleavage reactions in specific environments have played a growing role in the design of materials for tissue engineering.²³ It has already been demonstrated that these exceptional materials can be used in a wide range of applications, such as drug delivery systems, tissue scaffolds, and degradable implants for fracture fixation.^{24,25}

^a Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, Sienkiewicza 112, 90-363 Lodz, Poland. E-mail: malgorzata.basko@cbmm.lodz.pl

^b Department of Immunology and Infectious Biology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland
^c Bio-Med-Chem Doctoral School, University of Lodz and Lodz Institutes of the Polish Academy of Sciences, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: <https://doi.org/10.1039/d3sm00948c>

To obtain amphiphilic networks containing polyester blocks, different synthetic routes may be used. Typically, randomly crosslinked networks are obtained in the radical copolymerization of telechelic macromonomers containing suitable functional groups in selected comonomers.^{15,26} In this approach, it is often necessary to functionalize the polyester chain with acryloyl or methacryloyl chloride.^{27–29} However, these chemicals are toxic and require special safety conditions, complicating laboratory work.³⁰ Additionally, networks prepared by radical processes may contain significant levels of residual reagents or catalysts so these materials must be carefully purified before the planned biomedical use. Another group of methods is based on the covalent end-linking of building blocks that involve the coupling of polymers fitted with complementary reactive end groups.^{31,32} In this case, using end-functionalized polymer-A as a crosslinker for polymer-B leads to two-component networks with a topology that can be altered by varying the crosslinker length and crosslink density. When looking for methods to introduce polyesters into cross-linked structures, one should strive to simplify the preparation process. This is especially important for intended medical applications in which undesirable residual compounds must be eliminated.

In this context, extraordinary opportunities offer reactive polymers containing functional groups that can be used to construct more complex structures, including polymer networks. Recently, poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) (PiPOx) has attracted growing interest as a reactive, hydrophilic polymer that enables efficient structural transformations and the creation of polymeric materials with tuned properties.^{33–39} In some applications, PiPOx can potentially replace the typical hydrophilic polymers; this is vital because the frequency of observed allergic reactions against classical PEG is increasing, as highlighted in reports.⁴⁰ The unique advantages of PiPOx result from the presence of reactive side groups distributed along the main chain, which enables a highly effective addition reaction with reagents containing carboxyl groups.^{41,42} In addition to mono-functional compounds, di-carboxyl acids have been used to prepare covalently cross-linked PiPOx with short carbohydrate fragments.⁴³ Recently, in our research group, we demonstrated the efficient crosslinking of PiPOx by a hydrophilic polymer (dicarboxyl-terminated poly(ethylene oxide) with a moderate molar mass ($M_n = 500 \text{ g mol}^{-1}$).⁴⁴ On this basis, in further research, we would like to investigate the potential of other polymers with carboxyl end groups for designing networks from carefully selected building blocks in a system without catalysts or side products.

In the present work, we have extended our approach to novel networks that contain covalently bonded polyesters on PiPOx. It was anticipated that by combining two structurally different polymers, a new generation of amphiphilic segmented polymer networks would be prepared in which shorter hydrophobic and degradable (polyester) chains are grafted with both chain ends to much longer hydrophilic polymer chains (PiPOx). To the best of our knowledge, this kind of amphiphilic network with PiPOx as the hydrophilic component has not yet been reported. To

uncover a relationship between the chemical structure of the networks and their final properties, the nature of the ester repeating unit, the ratio of the carboxyl group to oxazoline rings, and the molar mass of polyester cross-linker were changed in the reactive mixture. The network characterization was accomplished by FTIR-ATR and ^{13}C Magic-Angle Spinning (MAS) NMR. The thermal and mechanical properties of the networks were investigated in addition to swelling properties. Finally, the cytocompatibility of the networks was confirmed by MTT assay.

Experimental part

Materials

L-Lactide (LA) was purchased from Purac (99%, Netherlands), recrystallized from dry ethyl acetate, subsequently sublimated and stored under vacuum. 2-Isopropenyl-2-oxazoline (iPOx, 98%, Merck) was distilled under reduced pressure directly before use. Azobisisobutyronitrile (AIBN) was purchased from Merck, recrystallized from ethyl alcohol (40 °C), dried under vacuum and stored at 4 °C. Hexane-1,6-diol (97%), trifluoromethanesulfonic acid (99%), 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO, 99%), and succinic anhydride (99%) were purchased from Merck (99%) and used without further purification. Dimethyl sulfoxide, dichloromethane, chloroform, diethyl ether, ethyl alcohol, and hexane were purchased from POCH and used as received. For the biological assay, the L-929 (CCL-1TM) cell line of mouse fibroblasts (ATCC, Manassas, VA, USA), Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 medium (HyClone, Cytiva, MA, USA), foetal bovine serum (FBS) (HyClone), penicillin, streptomycin, trypsin-EDTA solution (Gibco, Waltham, MA, USA) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were used.

Synthesis of PiPOx

The homopolymer of iPOx was synthesized according to a previously published paper.⁴⁴ Briefly, 50 mg of AIBN was placed in a round bottom flask into which 10 mL of iPOx was directly distilled under vacuum. After that, the flask was filled with argon and placed into an oil bath at 60 °C for 24 h. Then, the polymer was dissolved in chloroform, precipitated to cold diethyl ether, and dried under vacuum until a constant weight was reached. Yield = 74%.

Molar mass determined by SEC with MALLS detector $M_n = 140\,000 \text{ g mol}^{-1}$, $M_w/M_n = 1.75$ ($d_n/d_c = 0.1320 \text{ mL g}^{-1}$) (Fig. S1A in the ESI†). $T_g = 171.43 \text{ °C}$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm) = 4.16 (2H, s, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}$), 3.76 (2H, s, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}$), 2.3–1.65 (2H, $-\text{CH}_2-$, overlapping, main chain), 1.52–0.95 (3H, overlapping, CH_3-), (Fig. S1B in ESI†).

^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm) = 172.55 (1C, $-\text{N}=\text{C}-\text{O}$), 66.67 (1C, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}$), 53.95 (1C, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}$), 52.32 (1C, $-\text{C}(\text{CH}_3)-$), 39.72 (1C, $-\text{CH}_2$, main chain), 19.65 and 17.75 (1C, CH_3-), (Fig. S1C in ESI†).

^{13}C NMR CP MAS (400 MHz), δ (ppm) = 172.79 (1C, s, $-\text{C}=\text{O}$), 67.39 (1C, s, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}$), 55.03 (1C, s, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}$), 40.53 (1C, s, $-\text{C}(\text{CH}_3)-$), 28.91–10.74 (1C, main chain) (Fig. 3).

One-pot synthesis of the dicarboxyl polyesters: HOOC-polyester-COOH

Poly lactide or polycaprolactone fitted with carboxyl end-groups (HOOC-PLA-COOH or HOOC-PCL-COOH) were prepared by the modification of the di-hydroxyl terminated homopolymers with succinic anhydride in reaction catalysed by DABCO, according to the method detailed elsewhere.⁴⁵ Briefly, for PLA synthesis: 5 g of LA (0.0347 mol), 0.1967 g of hexane-1,6-diol (0.0017 mol), and 10 mL of distilled methylene chloride were placed in a Schlenk flask. After the dissolution of LA, 0.5 g (0.0033 mol) of trifluoromethanesulfonic acid was added *via* silicon septum. The polymerization was carried out until the conversion of LA reached 97% (checked by ¹H NMR). Then, without polymer isolation, 0.74 g of DABCO (0.0066 mol) and 0.66 g of succinic acid (0.006 mol) were introduced to the reaction mixture. The polymer was precipitated into diethyl ether after complete conversion of the hydroxyl end groups to carboxyl groups was achieved. Yield = 78%.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): = 5.18 (H s, -O-(CH₃)-CH-C(O)-O-), 3.14 (2H, m, -O-CH₂-CH₂-), 2.73 (4H, m, -O-(O)C-CH₂-CH₂-C(O)-OH), 1.71–1.48 (3H, -CH₃-, overlapping, main chain) for HOOC-PLA-COOH, (Fig. S2B in ESI†).

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 177.09 (1C, s, HO-(O)C-CH₂-CH₂-C(O)-O-), 170.52 (1C, s, HO-(O)C-CH₂-CH₂-C(O)-O-), 170.00 (1C, s, -O-CH(CH₃)-C(O)-O-), 69.41 (1C, s, -O-CH(CH₃)-C(O)-O-), 65.74 (1C, s, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-), 28.73 (1C, s, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-), 25.73 (1C, s, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-), 17.04 (1C, s, -O-CH(CH₃)-C(O)-O-) for HOOC-PLA-COOH, (Fig. S4B in ESI†).

¹³C NMR CP MAS (400 MHz), δ (ppm): = 170.16 (1C, s, -O-(CH₃)-CH-C(O)-O-), 67.98 (1C, s, -O-(CH₃)-CH-C(O)-O-), 16.18 (1C, s, -O-(CH₃)-CH-C(O)-O-) for HOOC-PLA-COOH, (Fig. 3A)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 4.09 (2H, t, -O-CH₂-CH₂-), 2.65 (4H, m, -O-(O)C-CH₂-CH₂-C(O)-OH), 2.33 (2H, t, -CH₂-CH₂-C(O)-O-), 1.66 (2H, m, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-), 1.40 (2H, m, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-) for HOOC-PCL-COOH, (Fig. S3B in ESI†).

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 175.30 (1C, s, HO-(O)C-CH₂-CH₂-C(O)-O-), 173.63 (1C, s, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-O-), 172.26 (1C, s, HO-(O)C-CH₂-CH₂-C(O)-O-), 64.14 (1C, s, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-O-), 34.11 (1C, s, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-O-), 29.07 (1C, s, HO-(O)C-CH₂-CH₂-C(O)-O-), 28.52 (1C, s, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-), 28.33 (1C, s, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-O-), 25.52 (1C, s, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-O-), 24.57 (1C, s, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-O-) for HOOC-PCL-COOH, (Fig. S4A in ESI†).

¹³C NMR CP MAS (400 MHz), δ (ppm) = 172.49 (1C, s, -CH₂-CH₂-C(O)-O-), 64.28 (1C, s, -CH₂-CH₂-C(O)-O-), 26.85 (4C, m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-O-, overlapping, main chain) for HOOC-PCL-COOH, (Fig. 3B)

Synthesis of the PLA-*l*-PiPOx and PCL-*l*-PiPOx segmented networks

The networks were synthesized following the previous procedures reported by our group.⁴⁴ To obtain the PLA-*l*-PiPOx

network, 100 mg of PiPOx and 27 mg of HOO-PLA₃₀₀₀-COOH were dissolved in 1.0 mL of DMSO in a glass vial after 1 h of stirring. After complete dissolution of the components, the mixture was placed into an oven at 140 °C for 65 min.

¹³C NMR CP MAS (400 MHz), δ (ppm) = 170.99 (1C, s, -C(O)-), 69.29 (1C, s, -O-(CH₃)-CH-C(O)-O-), 55.08 (1C, s, -O-CH₂-CH₂-N=), 40.60 (1C, -(C)CH₃-), 29.00 (1C, s, CH₂-, PiPOx main chain), 17.02 (1C, s, CH₂-, PLA main chain) for PLA-*l*-PiPOx, (Fig. 3A).

¹³C NMR CP MAS (400 MHz), δ (ppm) = 173.27 (1C, s, -C(O)-), 67.50 (1C, s, -O-CH₂-CH₂-N=), 64.43 (1C, s, -CH₂-CH₂-C(O)-O-), 55.02 (1C, s, -C(CH₃)-), 40.61 (1C, -CH₂-, main chain), 34.37 (1C, s, -CH₂-CH₂-C(O)-O-), 29.14 (2C, s, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-O-), 25.23 (1C, s, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-O-), 18.08 (1C, s, CH₃-, PiPOx main chain) for PCL-*l*-PiPOx, (Fig. 3B).

Characterization

The average molar masses and molecular weight distribution of the polyesters were determined by obtaining LS measurements using a size-exclusion chromatography (SEC) system comprising an Agilent Pump 1100 Series (preceded by an Agilent G1379A Degasser), equipped with a set of two PLGel 5m MIXED-C columns. A Wyatt Optilab Rex differential refractometer and a Dawn Eos8 (Wyatt Technology Corporation) laser photometer were used as detectors. Dichloromethane was used as the eluent at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹ at room temperature. The system was calibrated according to polystyrene standards. PiPOx samples were analysed in water at 26 °C by an SEC setup consisting of three TSK-GEL columns (G5000 PWXL + 3000 PWXL + 2500 PWXL; 7.8 × 300 mm; Bioscience) with an Agilent pump and a triple detector system (Viscotek Dual Detector Refractometer/Viscometer Model 350 and Viscotek 270 Dual Detector). Poly(ethylene oxide) standards (Polymer Laboratories, USA) were used to determine polymer molar masses.

Fourier transform infrared spectroscopy spectra were recorded on a Nicolet 6700 spectrometer equipped with a deuterated triglycine sulfate (DGTS) detector. Attenuated total reflectance was used for IR measurements. The spectra were obtained by adding 128 scans at a 2 cm⁻¹ resolution. The solid-state ¹³C CP MAS and ¹H NMR experiments were performed on a BRUKER Avance III 400 spectrometer operating at 400 MHz for ¹³C and ¹H equipped with a MAS probe head using 4 mm ZrO₂ rotors.

A DSC Q-20 (Thermal Analysis) apparatus was used to conduct nonisothermal tests on samples with weights of 8–9 mg. For the test of PLA-*l*-PiPOx networks, the sample was heated to 210 °C at a rate of 10 °C min⁻¹, cooled to 20 °C at the same rate, and then heated to 210 °C. The PCL-*l*-PiPOx sample was heated from -100 °C to 210 °C at a rate of 10 °C min⁻¹, cooled to -100 °C at the same rate, and then heated a second time to 210 °C.

Thermogravimetric analysis (TGA) was performed under nitrogen flow by heating the samples from ambient temperature to 500 °C at a heating rate of 20 °C min⁻¹ on a Hi-Res TGA 2950 thermogravimetric analyser (TA Instruments). The

measurements were conducted by placing polymer samples (5 mg) in a measuring cell.

Swelling measurement

The swelling behaviour of the synthesized networks was determined by placing weighed dry polymer network disks (W_d) into a given solvent and equilibrating for 24 hours until the weight of the swollen networks reached a constant value. The samples were then gently dried with paper tissue to remove any remaining solvent from the surface and weighed (W_s). The equilibrium swelling degree (ESD) was calculated using the following equation:

$$\text{ESD} = \left(\frac{W_s - W_d}{W_d} \right) \times 100$$

The experiments were performed in duplicate, and the average value measurements were reported.

Mechanical properties

The mechanical properties of the hydrogels were examined during uniaxial compression using an Instron 5582 Model tensile machine. The tests were carried out at $T = 25^\circ\text{C}$ on selected networks (PLA₃₀₀₀-*l*-PiPOx-4 and PCLA₃₀₀₀-*l*-PiPOx-4) in the swollen state. The samples for the compression test had a diameter of 16 mm (PCL-*l*-PiPOx) or 14 mm (PLA-*l*-PiPOx) and a thickness of 7 mm. The deformation rate was 0.7 mm min^{-1} (i.e., 10% of initial thickness). In the experiment, the force and displacement were measured, from which the stress and compression ratio were calculated. The initial sample area was used in stress calculations. The compression ratio was defined as the ratio of the initial thickness to the actual thickness. 3 samples of each material were measured.

In vitro cytobiocompatibility

The hydrogels were subjected to cytotoxicity tests using a standard direct contact cytotoxicity assay with L929 fibroblasts (CCL-1™) according to ISO10993-5:2009 (Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity). Briefly, L929 cells at 80% confluency were detached with 0.25% trypsin solution, diluted to a density of $2 \times 10^5\text{ mL}$ in culture medium and transferred into 96-well plates (Nunc Delta Surface, Nunc, Rochester, NY, USA) in a volume of 100 μL per well. After 24 h of incubation at 37°C in a humidified incubator with 5% CO_2 , the culture medium was replaced with fresh medium, and fragments of hydrogels (diameter did not exceed 1/10 of the well area surface) were seeded onto the cells. Cells incubated in culture medium only served as a positive control for viability (PC), whereas cells treated with 0.03% H_2O_2 served as a negative control – cell lysis (NC). To assess cell viability, after 24 h of incubation with fragments of hydrogels, 10 μL of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) at a concentration of 5 mg mL^{-1} was added to each well. After 4 h of incubation, the plates were centrifuged (1200 rpm, 10 min), the supernatants were replaced with 200 μL of DMSO per well to dissolve the formazan crystals, and the absorbance was measured at a wavelength of 570 nm using a Multiskan EX microplate reader (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Results and discussion

Preparation of the telechelic dicarboxylic polyesters

As described in the introduction, the aim of the research was to prepare segmented networks by directly coupling polyesters containing carboxyl terminal groups with pendant groups distributed along poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) chains. To obtain polymer networks with the defined length of polyester segments between the crosslinks, these macromolecular crosslinkers must exhibit controllable dispersity, functionality and molar masses. For this purpose, in the first stage of our research, linear polyesters with different molar masses were obtained in the cationic ring-opening polymerization of lactide or caprolactone, employing conditions that were previously shown to provide well-defined products.⁴⁶ Next, synthesized homopolymers terminated with hydroxyl groups were modified into the corresponding reactive crosslinkers fitted with carboxyl end-groups by esterification reaction with succinic anhydride.⁴⁷ The intended modification was achieved in a “one-pot” system without the need to isolate the polymeric diols. The molar masses of the prepared telechelic polyesters were measured by SEC and calculated from their ^1H NMR spectra. Data concerning the dicarboxyl polyesters are presented in the ESI†. The degree of functionalization (F) was determined from normalized ^1H NMR spectra considering the integral ratio of the signals of protons of the end groups and the protons of the main chain (Fig. S2 and S3 in ESI†). Table 1 presents the characteristic parameters of the di-carboxyl polyesters that were prepared.

After hydroxyl end-group modification was performed, a series of well-defined polyesters terminated with carboxyl end-groups (HOOC-PLA-COOH or HOOC-PCL-COOH) were easily prepared (Fig. S5 in ESI†). The synthesized macromolecular crosslinkers with different molar masses displayed relatively narrow dispersity ($D \sim 1.3$). The degree of functionalization determined was close to 95%, demonstrating that almost each terminal hydroxyl group was derivatized with the necessary carboxyl end-group. The obtained reactive polyester blocks differ in terms of the repeating unit structure, melting and glass transition temperatures. Thus, these four types of macrocrosslinkers (Table 1), which are capable of reacting with oxazoline rings, have been used in synthesizing covalent, amphiphilic networks to evaluate crosslinking capacity with respect to the length of the polyester block.

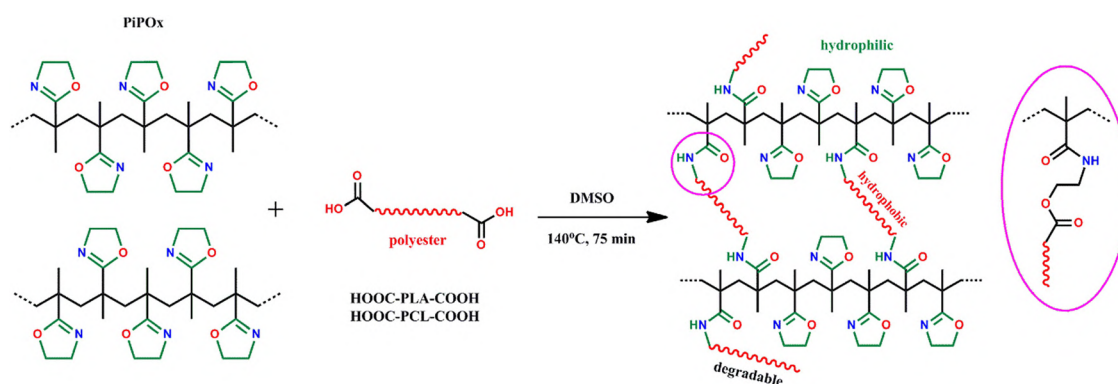
Synthesis of PLA-*l*-PiPOx and PCL-*l*-PiPOx segmented networks. With the goal of obtaining crosslinked structures, dicarboxyl polyesters were applied as coupling agents for PiPOx chains. As depicted in Scheme 1, when part of the 2-oxazoline rings reacts with carboxyl groups, an amphiphilic network consisting of hydrophobic polyester and hydrophilic PiPOx segments with ester-amide crosslinks was formed.

The coupling reaction between polyester carboxyl end groups and oxazoline rings was performed at 140°C after simple mixing of the components with a solvent. The reaction temperature was chosen according to our previous studies regarding the most efficient ring-opening addition reaction

Table 1 Nomenclature, molar mass (M_n), dispersity (D), degree of functionalization, T_m , T_g of the polyesters used for network synthesis

Sample	M_n		D^a	Degree of functionalization ^d (%)	T_m [°C]	T_g [°C]
	SEC ^a ($M_{n, \text{corr.}}$) ^b	NMR ^c				
HOOC-PLA ₃₀₀₀ -COOH	6300 (3600)	3100	1.3	94	130	39
HOOC-PLA ₆₀₀₀ -COOH	12 200 (7000)	5500	1.3	95	152	49
HOOC-PCL ₃₀₀₀ -COOH	5900 (3300)	3200	1.3	93	47	−55
HOOC-PCL ₆₀₀₀ -COOH	10 000 (5600)	5500	1.4	98	51	−58

^a Measured with SEC, (CH₂Cl₂ as eluent, calibration on polystyrene standards). ^b The M_n values after correction with coefficients determined as reported previously: 0.56 for PCL and 0.58 for PLA.⁴⁸ ^c Calculated with ¹H NMR spectra from the ratio of the integral of the signals at 5.15 ppm (−O−(O)C−(CH₃)CH−O−) and 2.73 ppm (−O−(O)C−CH₂−CH₂−C(O)−OH) for PLA and 4.06 ppm (−(O)C−(CH₂)₄−CH₂−O− and 2.65 ppm (−O−(O)C−CH₂−CH₂−C(O)−OH) for PCL. ^d Calculated with ¹H NMR normalized spectra from the ratio of the integral of the signals at 5.15 ppm (−O−(O)C−(CH₃)CH−O−) and 4.35 ppm (−O−(O)C−(CH₃)CH−OH) for PLA and 4.06 ppm (−(O)C−(CH₂)₄−CH₂−O− and 3.65 ppm (−(O)C−(CH₂)₄−CH₂−OH) for PCL.

**Scheme 1** Schematic representation of the network formation obtained by coupling PiPOx with dicarboxylic polyesters.**Table 2** Synthesis of PLA-*l*-PiPOx and PCL-*l*-PiPOx segmented networks

Network code	Reactive mixture		Time ^b [min.]	Insoluble fraction [%]
	[−COOH]/[iPOx] × 100 [%]	Ester content ^a [mol%]		
PLA ₃₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-2	2	17	65	95
PLA ₃₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-4	4	29	75	94
PLA ₃₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-15	15	61	130	92
PLA ₆₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-2	2	29	105	93
PLA ₆₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-4	4	46	120	91
PLA ₆₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-15	15	76	130	85
PCL ₃₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-2	2	21	65	95
PCL ₃₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-4	4	34	75	93
PCL ₃₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-15	15	66	150	91
PCL ₆₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-2	2	34	105	93
PCL ₆₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-4	4	51	120	90
PCL ₆₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-15	15	80	150	85

Conditions: polymer concentration = 10 wt%, DMSO as a solvent, 140 °C. ^a Ester content calculated from the reactive mixture composition. ^b The reaction time was optimised based on screening experiments.

between a macromolecular crosslinker based on HOOC-PEO-COOH with PiPOx.⁴⁴ To vary the chain length between two crosslinking points and the ester content in the network, telechelic HOOC-PLA-COOH or HOOC-PCL-COOH with different molar masses ($M_n = 3000 \text{ g mol}^{-1}$ and 6000 g mol^{-1}) were used as macrocrosslinkers. Additionally, the ratio of the carboxyl groups to oxazoline rings was varied ($[-\text{COOH}]/[\text{iPOx}] = 2, 4, 15\%$) to change the degree of crosslinking. The target degree of oxazoline ring opening did not exceed 15 mol% to ensure

that the obtained networks exhibited adequate hydrophilicity (swelling in water). The network codes and synthesis parameters are listed in Table 2.

For clarity, in the following text for a network code, we adopted the common PolyA-*l*-PolyB conetwork nomenclature, where “*l*” stands for “linked by” as proposed in earlier papers.^{49,50} Additionally, we included information about the percent of opened oxazoline rings and the molar mass of the crosslinker. Thus, code “PLA₃₀₀₀-*l*-PiPOx-2” determines networks

formed by using HOOC-PLA-COOH with $M_n = 3000 \text{ g mol}^{-1}$ as a crosslinker for PiPOx with theoretically 2% opened oxazoline rings.

The addition reaction between dicarboxylic polyesters and PiPOx was investigated at various [COOH]:[iPOx] molar ratios by applying DMSO as a common solvent for both polymers, keeping the polymer concentration at 10 wt%. We observed that under the conditions used, for each composition of the starting mixture, networks with a stable shape were obtained after a proper reaction time was selected. This parameter was determined after screening experiments, taking into account the effect of the reaction time on the cross-linking efficiency and visual appearance of the network. Very often, extending the time of crosslinking led to the formation of yellowness on the top of the samples without increasing the content of the gel fraction.

In the next step, the obtained products were characterized in terms of the insoluble fraction content, which was determined gravimetrically. As shown in Table 2, the content of an insoluble fraction depended on the composition of the reactive mixture and on average was higher than 90%. The highest content of the gel fraction ($\sim 95\%$) was found in the case of polyesters with $M_n = 3000 \text{ g mol}^{-1}$ applied for PiPOx cross-linking with the assumed degree of oxazoline ring opening $\sim 2\%$ and 4% . By increasing the molar mass of crosslinkers to 6000 g mol^{-1} and increasing the degree of oxazoline ring opening to 15% , the content of the insoluble fraction decreased to 85% . The content of the unreacted components might have increased due to the decrease in the proportion of reactive end groups in the reaction mixture and their lower reactivity which influences the efficiency of network formation. The observed gradual decrease of gel fraction with increasing molar mass of polyesters may be also caused by the higher viscosity of the reaction mixture and the lower availability of the reactive end-groups in the reactive systems due to partially hiding the chain ends inside the polymer random coils.

The soluble fraction was also analysed in ^1H NMR spectra to identify reagents that did not contribute to network formation. Typically, in the spectra, signals from unreacted polyester (Fig. S6 in ESI †) were observed.

As presented in Fig. S7 in ESI † at room temperature in a swollen state, the as-prepared networks were flexible and maintained their shape. The obtained materials could be easily transferred and manipulated without damage. After drying and reswelling, the networks easily returned to their original form. It should be emphasized that the investigated method, based on the addition reaction between the polyesters containing carboxyl end-groups with pendant groups distributed along poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) chains, enabled high-yielding polymer network synthesis and did not require special precautions to exclude moisture or oxygen. In addition, because efficient cross-linking was achieved without the addition of any catalysts and without the formation of byproducts, the presented synthetic approach simplifies the practical aspects of material preparation, which can be important in industrial production. Notably, PLA-*l*-PiPOx and PCL-*l*-PiPOx networks

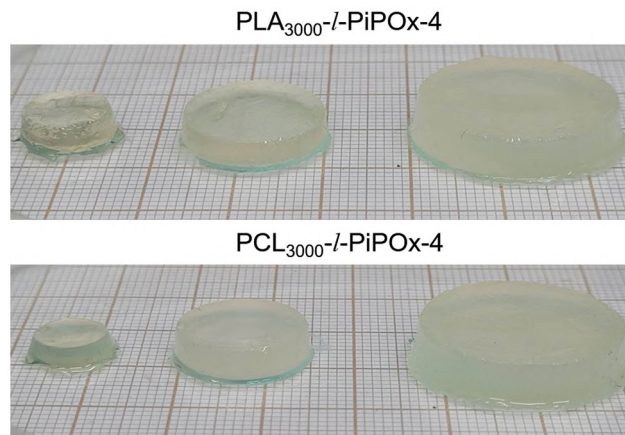


Fig. 1 PLA-*l*-PiPOx and PCL-*l*-PiPOx networks were freely moulded into the desired size using a simple crosslinking procedure.

may be freely moulded into the desired size with the preservation of stable shape and dimensions (Fig. 1).

Importantly, networks with the required structure were obtained by coupling dicarboxylic polyesters and PiPOx after a relatively short time in a system that is easily scalable. Thus, the proposed strategy enables a quick and convenient synthesis that is not readily available in other reaction systems. This method is very flexible for tuning the properties of these amphiphilic networks, as the length of the hydrophobic polyester chains can be predetermined in a very large range because their synthesis and post-modification is a well-controlled process.

It may be assumed that by the coupling of two different polymer chains, the formed network exhibits a structure in which polyester segments at both ends are grafted to a poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) chains by intermolecular reaction, with the formation of ester-amide bonds. The mechanism for the addition reaction that proceeds with oxazoline ring-opening (presented in Fig. S7 in ESI †) has been explained earlier for low molecular compounds containing a single carboxyl group, and later for di-carboxylic reagents enabling crosslinking.^{41–43,51} Typically, this kind of process yields networks with randomly distributed junction points.⁵² However, it cannot be excluded that obtained structures show topological defects, such as dangling ends, cyclic defects (loops), and heterogeneity in cross-link density.⁵³

To confirm the presence of the characteristic building units in the networks, the extracted and dried samples were studied by ATR FT-IR (Fig. 2).

In the networks, the signal corresponding to the carbonyl stretching vibration of the ester can be found at 1750 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$), whereas signals of the oxazoline ring are observed at 1651 cm^{-1} (C=N- stretching) and 1121 cm^{-1} (C-O stretching). The newly generated amide C(=O)NH- band may be observed as a small individual peak at 1520 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-N}}$). For the studied samples, the intensity of signals from the individual building units strongly depended on the composition of the initial mixture. Thus, FTIR data indicated efficient network formation from the selected reactive blocks.

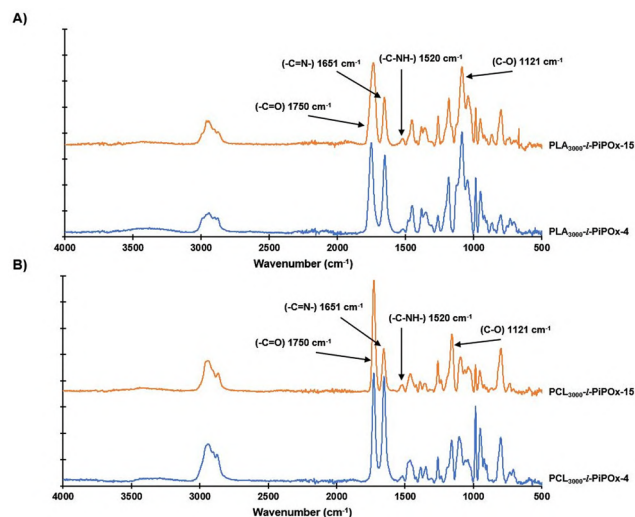


Fig. 2 ATR FT-IR spectra of networks obtained from PiPOx using HOOC-PLA₃₀₀₀-COOH and HOOC-PCL₃₀₀₀-COOH as crosslinkers (the assumed degree of iPOx crosslinking is equal to 4% and 15%).

Additionally, the CP MAS NMR spectra collected for the obtained networks enabled the identification of signals originating from the PiPOx chain and polyester crosslinkers (Fig. 3).

Therefore, the CP MAS analysis additionally confirmed that networks containing a differentiated proportion of hydrophilic and hydrophobic segments were successfully attained. The content of ester units in the final network can be largely controlled by the composition of the starting reaction mixture as the coupling reaction of dicarboxylic polyesters with the PiPOx chain proceeds with good efficiency (shown in Table 2). It should be noted that in the studied system, reactive polyesters differing in the structure of the repeating unit, chain flexibility and hydrophilicity were used as crosslinkers. Consequently, the nature of polyester segment/block and the distance between the two cross-linking points can be varied over wide ranges. As a result, segmented networks with a very diverse chemical composition and topology may be synthesized.

Thermogravimetric analysis

The thermal stability of the obtained materials was evaluated by performing thermogravimetric analysis on dried samples. A comparison between the TGA thermograms of the resulting networks and starting reactive blocks is shown in Fig. 4.

The thermal stability of PLA is lower than that of PCL, which was confirmed in the DTG analysis by the observed peaks at

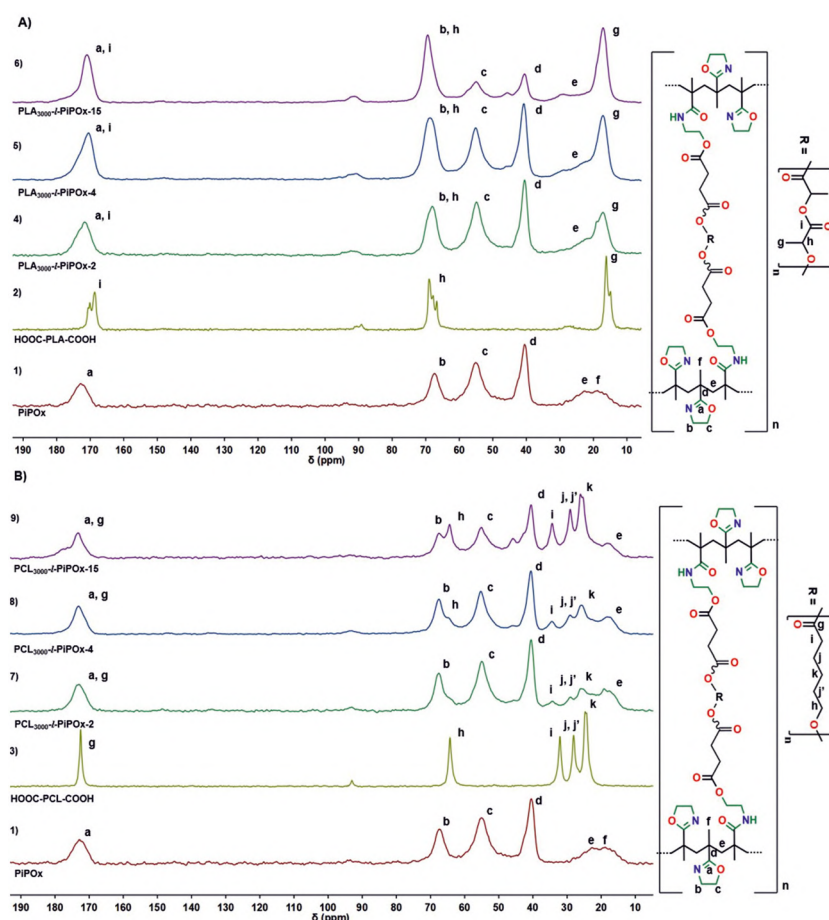


Fig. 3 ¹³C-CP/MAS spectra of starting blocks: PiPOx (1), telechelic polyesters (2) and (3), and resulting network: (4–6)–obtained with HOOC-PLA₃₀₀₀-COOH crosslinker, (7–9) obtained with HOOC-PCL₃₀₀₀-COOH crosslinker.

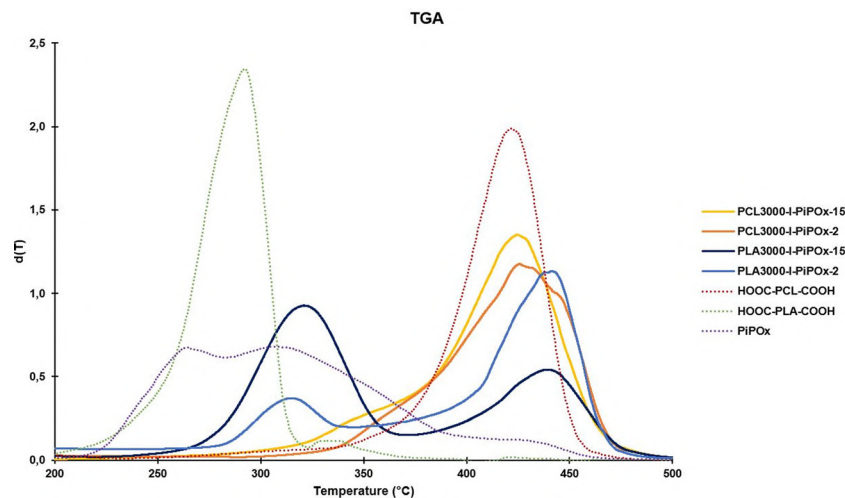


Fig. 4 Comparison of the thermal stability by DTG thermograms of the PLA-*l*-PiPOx and PCL-*l*-PiPOx networks and starting building blocks: PiPOx, HOOC-PLA₃₀₀₀-COOH, HOOC-PCL₃₀₀₀-COOH.

292 °C and 421 °C.⁵⁴ During the degradation of PiPOx, a broad peak was detected in the thermogram in the 200–470 °C range. The thermal degradation of the studied networks occurred within a wide temperature range with degradation profiles alluding to their composition. In the case of the PLA-*l*-PiPOx network, thermal degradation starts above 250 °C, displaying two distinct degradation steps, with derivative maxima located at approximately 330 °C and 450 °C. The PCL-*l*-PiPOx networks are more stable and start to degrade above 300 °C, showing a broad decomposition step with a maximum at approximately 430 °C.

DSC analysis

By coupling two structurally different polymers, the formed network exhibits a structure in which hydrophobic polymer chains at both ends are grafted to a hydrophilic polymer chain. Typically, the forced compatibility of the segmented polymer networks significantly reduces the crystallinity.¹⁵ To examine

the crystallization behaviour of the polyester segments in the networks, DSC analysis was performed for the extracted and dried networks. The second heating scan was used to determine the crystallinity and the glass transition temperature (T_g) of the analysed materials (Fig. 5A and B).

While the starting polyester crosslinkers show melting peaks ($T_m = 130$ °C for HOOC-PLA₃₀₀₀-COOH, and $T_m = 47$ °C for HOOC-PCL₃₀₀₀-COOH, see Table 1), no melting endotherms of PLA or PCL were observed for the networks formed with PiPOx. The lack of polyester T_m indicates that the PLA or PCL chains were distributed throughout the network and were not separated into polyester-rich phases. These data on phase morphology strongly indicate that the obtained networks exhibit an amorphous structure in the dry state.

Generally, chemical crosslinking of linear chains within the network structure restricts the mobility of polymer segments, influencing the T_g of networks. The starting building blocks exhibit strongly diverse T_g as follows: HOOC-PLA-COOH was in the range 39–49 °C, HOOC-PCL-COOH was in the range of

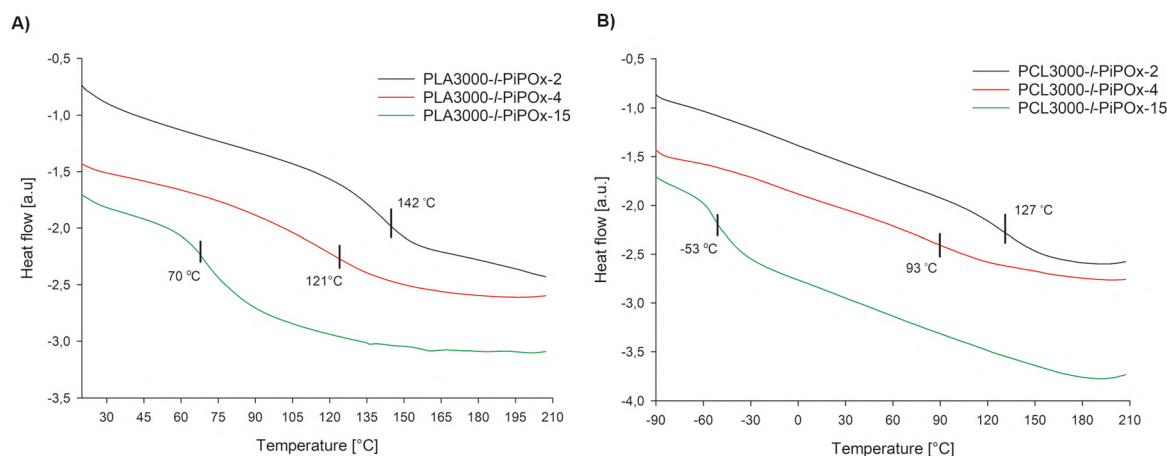


Fig. 5 DSC thermograms of networks that were obtained by applying in a starting mixture the different ratios of the carboxyl groups (2, 4, 15%) of PLA₃₀₀₀ and PCL₃₀₀₀ to oxazoline rings (second heating scan).

−58 °C, and PiPOx was 170 °C. Typically, if the network components are immiscible, the material exhibits two T_g values, which can be associated with the presence of different microphases.¹⁴ In general, one T_g was detected for our networks, but in some runs, the peak of this transition was very broad and hardly observable. The values of the determined glass transition temperatures depended on the network composition. With higher ester content (networks: PLA₃₀₀₀-*l*-PiPOx-15 and PCL₃₀₀₀-*l*-PiPOx-15), the observed T_g (70 °C and −53 °C) was closer to the value characteristic for the used PLA or PCL. With lower ester content, T_g values were higher than 120 °C but much lower than 170 °C. This may indicate that ring opening exhibits some plasticizing effect on PiPOx in these networks.

Swelling properties of the segmented amphiphilic networks

As a result of the covalent junction in the cross-linked structure of polymer segments with different affinities for water, the obtained material can swell both in water and in organic solvents with different polarities. PiPOx is a hydrophilic polymer that is also soluble in common organic solvents, while high molecular weight polyesters are insoluble in water and alcohols. The swelling behaviour of the obtained networks was studied in water, ethanol, tetrahydrofuran and dimethylformamide.

Graphs showing the equilibrium swelling degree (ESD) in each solvent are shown in Fig. 6 and Fig. 7. As expected, due to their amphiphilic character, the obtained PiPOx/PLA and PiPOx/PCL networks can swell in both aqueous and organic solvents with different polarities.

The degrees of equilibrium swelling in distilled water for networks formed with macrocrosslinkers of various lengths are shown in Fig. 6A and B.

As expected, the equilibrium swelling degrees in water are strongly dependent on the composition of the networks. The water uptake is the highest for networks formed with the lowest degree of oxazoline ring opening (2%), regardless of the length of the macrocrosslinker. Moreover, the swellability of the networks in water decreased with increasing −COOH/iPOx molar ratio ($ESD_{4\%} > ESD_{15\%}$), irrespective of the type of cross-linker used. This behaviour may have occurred because for a given crosslinker ($M_n = 3000 \text{ g mol}^{-1}$ or $M_n = 6000 \text{ g mol}^{-1}$), a larger content of carboxyl groups leads to networks with more cross-linked structures that absorb less water. Additionally, as the content of hydrophobic ester units in the structure of the network increases, the material's ability to swell in water decreases. The obtained results indicate that the networks with PCL segments have a slightly higher capacity to swell in water than the networks comprising PLA segments. This is a little unexpected observation concerning higher hydrophobicity of PCL.⁵⁵ However it should be remembered that the total amount of water sorbed by a polymer network depends on several factors including hydrophilicity, elasticity of building blocks, topology, and distance of the polymer chains between the neighbouring crosslink points.⁵⁶ These factors can be expected to have a significant, differentiated effect on the swelling capacity of the obtained networks. A quantitative understanding of the correlation between network structure and swelling remains challenging due to the complexity of the crosslinked system and is planned in a separate study, in the near future. Summarizing the results presented in this part of the research, it can be concluded that the synthesized networks composed of hydrophilic building blocks cross-linked with polyester chains show differentiated water absorption capacities, enabling hydrogel formation. Importantly, we observed that in the swollen state, the hydrogels with increased dimensions maintained adequate durability, allowing further manipulation of the material (Fig. S8 in ESI†).

Additionally, we tested the swelling behaviour of networks in ethanol, tetrahydrofuran, and dimethylformamide and the results are presented in Fig. 7A–C.

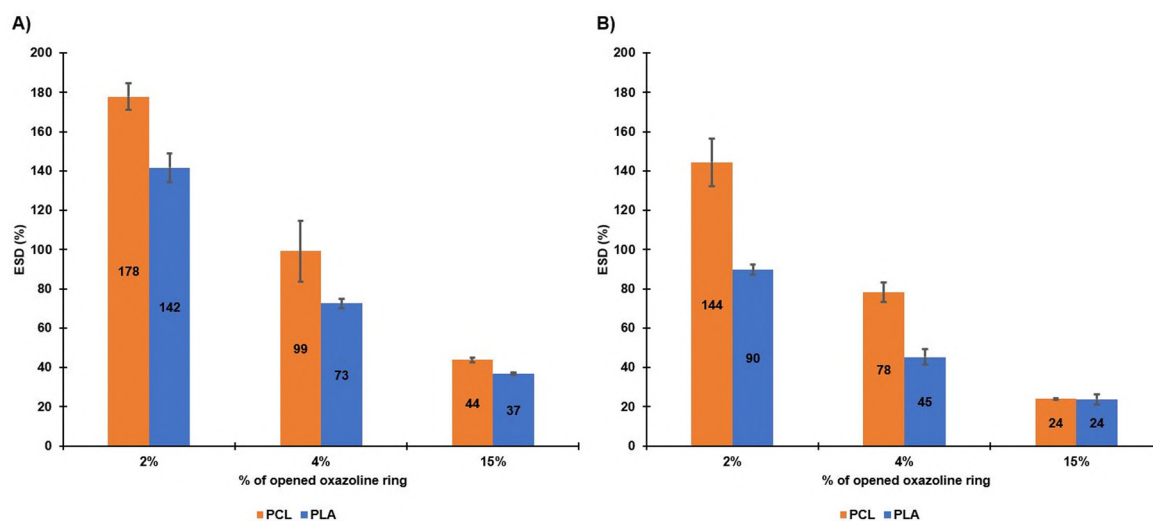


Fig. 6 Dependence of network ESD in water on the number of oxazoline opened rings and the length of the polyester macrocrosslinkers used: (A) $M_n = 3000 \text{ g mol}^{-1}$, (B) $M_n = 6000 \text{ g mol}^{-1}$.

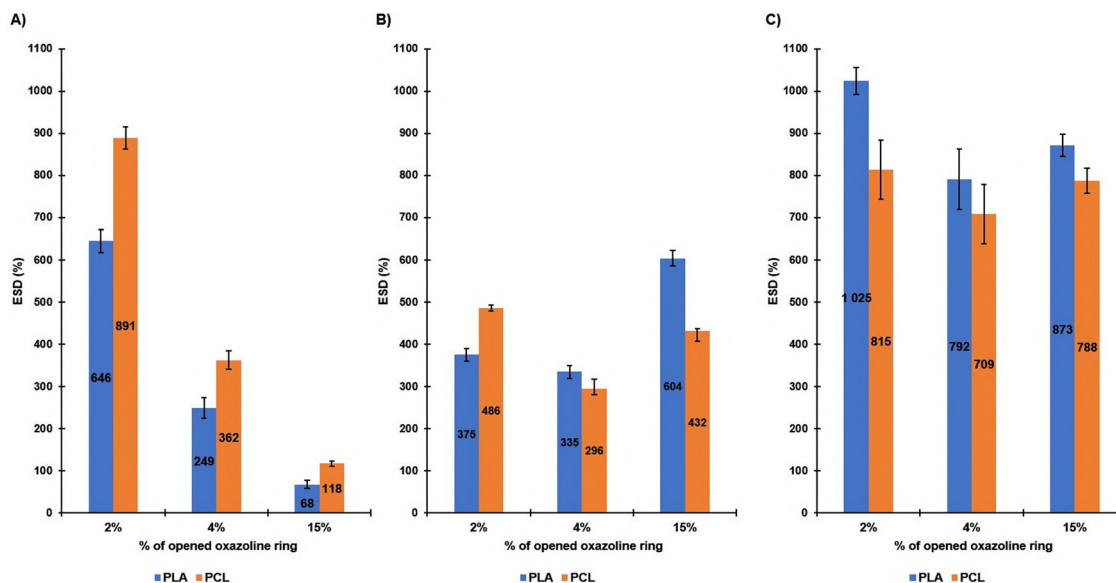


Fig. 7 Dependence of network ESD in selected organic solvents on the number of oxazoline opened rings (for macrocrosslinkers with $M_n = 3000 \text{ g mol}^{-1}$): (A) ethanol, (B) THF, (C) DMF.

It was found that the equilibrium swelling ratios depend on the nature of the solvent and segmented network composition. For ethanol, which is a poor solvent for polyesters, lower swelling was observed with a higher ester content in the network. In contrast, for THF and DMF, network swellability is not dependent on composition, as all components are well soluble in these solvents. Moreover, for networks swollen in these solvents, the degrees of swelling were independent of the degree of the oxazoline opened rings.

In summary, the presented preliminary results indicated that by selecting the composition of the starting reactive mixture (type and molar mass of the crosslinker, molar content of ester units), networks with tuned properties might be synthesized. After a proper design is chosen, the resulting network may behave as either a hydrogel or a hydrophobic gel, depending on the nature of the medium's philicity. To obtain amphiphilic networks with a high capacity to swell in water, the proportion of ester units in the structure should be low. Thus, to design suitable water-swallowable hydrogels, the length of the polyester blocks must be relatively short compared to the length of the PiPOx blocks.

The ability to swell in both organic and aqueous media is an attractive feature of amphiphilic networks, which may be exploited, especially for biomedical applications. For example, in the proper solution, these materials can be used to immobilize lipophilic or hydrophilic drugs.

Mechanical characterization

The mechanical properties of the networks are an important factor in determining the practical application of these polymeric materials.⁵⁷ Thus, selected networks (PLA₃₀₀₀-*l*-PiPOx-4 and PCL₃₀₀₀-*l*-PiPOx-4) were preliminary studied in the swollen state during uniaxial compression. Fig. 8 illustrates the

relationship of the stress-compression ratio determined for the examined networks.

As shown in Fig. 8, the analysed materials have different mechanical properties. The stress in the hydrated PCL₃₀₀₀-*l*-PiPOx-4 network increased more slowly, and at a degree of compression of 2.2, the process of sample destruction began. On the other hand, for PLA₃₀₀₀-*l*-PiPOx-4, much higher stress values were observed at the same degree of compression. The PLA crosslinked network was also stronger and retained structural continuity at a compression ratio of 3.0. The elastic modulus was $80 \pm 10 \text{ kPa}$ for PCL network and $210 \pm 15 \text{ kPa}$ for PLA network. Observed differences in mechanical properties mainly result from the introduction into the network linear polyester segments that differ according to mechanical properties and as well as water affinity.⁵⁸ The two coupling polymers

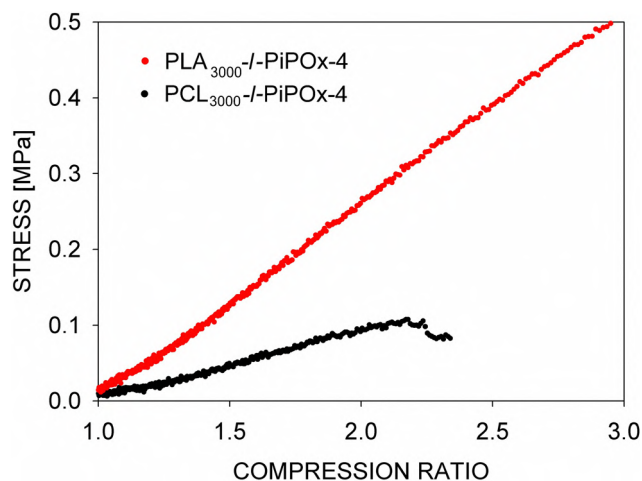


Fig. 8 Representative stress-compression ratio curves for the PLA₃₀₀₀-*l*-PiPOx-4 and PCL₃₀₀₀-*l*-PiPOx-4 networks in the swollen state.

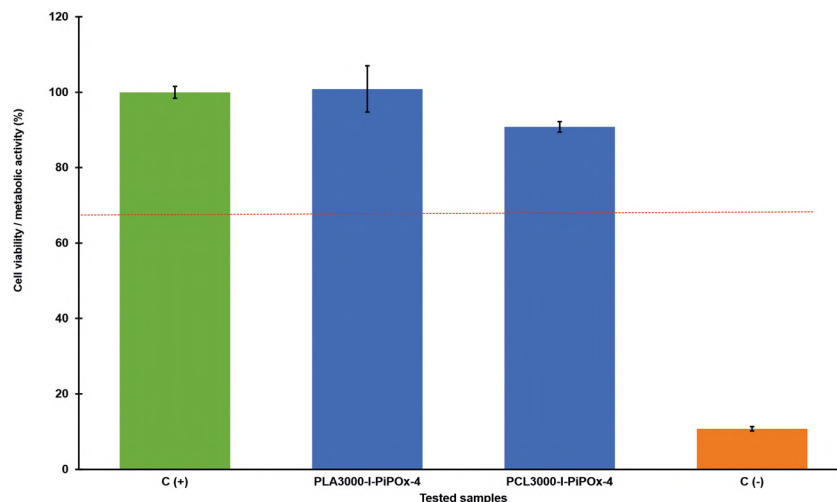


Fig. 9 Biocompatibility of tested biomaterials: viability/metabolic activity of mouse fibroblast L929 cell line after 24 h incubation with PLA₃₀₀₀-l-PiPOx-4 and PCL₃₀₀₀-l-PiPOx-4 biomaterials assessed using the MTT reduction assay. Cells cultured with medium only served as the positive control (C(+)) for cell viability (100% viable cells), and cells treated with 0.03% H₂O₂ served as the negative control (C(-), cell lysis).

have significantly different glass transition temperatures (39 °C for PLA and -55 °C for PCL, see Table 1), meaning that in bulk at ambient temperature, PLA has rigid chains, while PCL macromolecules are flexible. Thus, linear PLA behaves like a glassy material, showing high strength and high modulus (4–5 GPa), PCL on the contrary, shows low strength and modulus (400 MPa).⁵⁹ Of course in the presence of water, some plasticization of the macromolecules can be observed, reducing the glass transition and thus the modulus, especially important in the PLA case.⁶⁰ The introduction of polyester fragments (PCL or PLA) modified the properties of the PiPOx network. As found in DSC studies (Fig. 5) analyzed networks show wide glass transitions with an inflection point at 93 °C for PCL₃₀₀₀-l-PiPOx and 121 °C for PLA₃₀₀₀-l-PiPOx. This means that, as expected, the PLA-based network is much stiffer than the PCL network. It was reflected in the recorded Young's modulus and stress measured during deformation. Interestingly, the determined elastic modulus for PLA₃₀₀₀-l-PiPOx-4 networks is close to the articular cartilage modulus (0.45–0.8 MPa).⁶¹ Thus, this initial result from mechanical studies, combined with the biocompatible and biodegradable nature of the networks, suggests that the obtained materials can potentially be used in cartilage tissue engineering. We are currently planning separate studies to determine the dependence of mechanical properties on network composition and crosslinking density to further explore the potential of these materials.

In vitro cytobiocompatibility

Since PiPOx and polyesters are biocompatible polymers and have been used for biomedical applications, networks that combine these blocks should show similar properties.⁶² To evaluate the cytobiocompatibility of the designed hydrogels, PLA₃₀₀₀-l-PiPOx-4 and PCL₃₀₀₀-l-PiPOx-4 networks were chosen for the studies by MTT assay. We can conclude that both tested hydrogels met the criterion

of ISO 10993-5:2009 and did not affect the metabolic activity of L929 mouse fibroblasts (reference cell line). According to ISO 10993-5:2009, cell viability/metabolic activity below 70% (cut off) shows the cytotoxic effect of tested compounds towards eukaryotic cells.⁶³ Tested hydrogels: PLA₃₀₀₀-l-PiPOx-4 and PCL₃₀₀₀-l-PiPOx-4 should be recognized as cytobiocompatible (Fig. 9) and may be further tested in more complex *in vitro* experiments.

Conclusions

In summary, we successfully applied a chain coupling strategy between polyesters containing carboxyl end groups and oxazoline pendant groups in polymer chains to synthesize a series of novel polyester-l-PiPOx segmented networks. Efficient linking of hydrophobic HOOC-PLA-COOH or HOOC-PCL-COOH degradable blocks on the hydrophilic polymer was achieved in a reactive system without catalysts or byproducts. As a result, segmented networks were prepared with a tremendous advantage, namely, the applied procedure eliminates the risks posed by the presence of residual undesired compounds. The obtained amphiphilic polymer networks were able to swell in water and in organic solvents. It was shown that the physicochemical and swelling properties of PLA-l-PiPOx and PCL-l-PiPOx networks could be controlled by the content of hydrophobic polyesters and hydrophilic PiPOx segments as well as the polymers' crosslinked nature. As building polymers are approved as safe biomaterials, these networks may be widely used in tissue engineering and regenerative medicine, in which flexible scaffolds are desirable. The applied methodology can be easily adopted for a large variety of other types of carboxy-functionalized polyester to build new amphiphilic network structures.

Conflicts of interest

The authors declare no competing financial interest. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Acknowledgements

Financial support from the National Science Centre, Poland, Grant No. 2020/37/B/ST5/03302 is gratefully acknowledged. Bio-Med-Chem Doctoral School of the University of Lodz and Lodz Institutes of the Polish Academy of Sciences are acknowledged for the support of this study by Bartosz Kopka.

References

- 1 C. S. Patrickios, *Macromol. Symp.*, 2010, **291–292**, 1–11.
- 2 Y. Gu, J. Zhao and J. A. Johnson, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2020, **59**, 5022–5049.
- 3 C. S. Patrickios and T. K. Georgiou, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2003, **8**, 76–85.
- 4 A. S. Hoffman, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2012, **64**, 18–23.
- 5 S. R. Caliri and J. A. Burdick, *Nat. Methods*, 2016, **13**, 405–414.
- 6 V. G. Muir and J. A. Burdick, *Chem. Rev.*, 2021, **121**, 10908–10949.
- 7 K. Y. Lee and D. J. Mooney, *Chem. Rev.*, 2001, **101**, 1869–1879.
- 8 J. S. Boateng, K. H. Matthews, H. N. E. Stevens and G. M. Eccleston, *J. Pharm. Sci.*, 2008, **97**, 2892–2923.
- 9 G. Erdodi and J. P. Kennedy, *Prog. Polym. Sci.*, 2006, **31**, 1–18.
- 10 C. S. Patrickios, *RSC Polymer Chemistry Series*, The Royal Society of Chemistry, 2020, pp. 1–14.
- 11 C. S. Patrickios and K. Matyjaszewski, *Polym. Int.*, 2021, **70**, 10–13.
- 12 B. R. Clarke and G. N. Tew, *Macromolecules*, 2022, **55**, 5131–5139.
- 13 B. Iván, M. Haraszti, G. Erdödi, J. Scherble, R. Thomann and R. Mülhaupt, *Macromol. Symp.*, 2005, **227**, 265–274.
- 14 A. Domján, G. Erdödi, M. Wilhelm, M. Neidhöfer, K. Landfester, B. Iván and H. W. Spiess, *Macromolecules*, 2003, **36**, 9107–9114.
- 15 W. Lequeieu and F. E. Du Prez, *Polymer*, 2004, **45**, 749–757.
- 16 J. C. Tiller, C. Sprich and L. Hartmann, *J. Controlled Release*, 2005, **103**, 355–367.
- 17 Y. Guan, W. Zhang, G. Wan and Y. Peng, *New J. Chem.*, 2002, **26**, 1682–1685.
- 18 C. Fodor, G. Kali and B. Iván, *Macromolecules*, 2011, **44**, 4496–4502.
- 19 I. Barakat, P. H. Dubois, C. Grandfils and R. Jerome, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 1999, **37**, 2401–2411.
- 20 N. Koupaei, A. Karkhaneh and M. Daliri Joupri, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, 2015, **103**, 3919–3926.
- 21 H. Peng, S. Varanasi, D. K. Wang, I. Blakey, F. Rasoul, A. Symons, D. J. T. Hill and A. K. Whittaker, *Eur. Polym. J.*, 2016, **84**, 448–464.
- 22 J. V. S. Antti, O. Helminen and H. Korhonen, *Macromol. Chem. Phys.*, 2002, **203**, 2630–2639.
- 23 F. Khan, M. Tanaka and S. R. Ahmad, *J. Mater. Chem. B*, 2015, **3**, 8224–8249.
- 24 F. J. O'Brien, *Mater. Today*, 2011, **14**, 88–95.
- 25 D. W. G. Bas van Bochove, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 2019, **30**, 77–106.
- 26 X. Li, M. Basko, F. Du Prez and I. F. J. Vankelecom, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 16539–16545.
- 27 R. F. Storey, S. C. Warren, C. J. Allison, J. S. Wiggins and A. D. Puckett, *Polymer*, 1993, **34**, 4365–4372.
- 28 J. A. Burdick, L. M. Philpott and K. S. Anseth, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2001, **39**, 683–692.
- 29 T. Fuoco, T. T. Nguyen, T. Kivijärvi and A. Finne-Wistrand, *Eur. Polym. J.*, 2020, **141**, 110098.
- 30 A. Pathan, I. Ahmad, R. Girase, V. Jagatap and H. Patel, *ACS Chem. Heal. Saf.*, 2022, **29**, 405–420.
- 31 M. Weber and R. Stadler, *Polymer*, 1988, **29**, 1071–1078.
- 32 S. Rimmer, P. Tattersall, J. R. Ebdon and N. Fullwood, *React. Funct. Polym.*, 1999, **41**, 177–184.
- 33 B. Kopka, B. Kost and M. Basko, *Polym. Chem.*, 2022, **13**, 4736–4746.
- 34 F. A. Jerca, V. V. Jerca and R. Hoogenboom, *Biomacromolecules*, 2021, **22**, 5020–5032.
- 35 V. V. Jerca, F. A. Nicolescu, R. Trusca, E. Vasile, A. Baran, D. F. Anghel, D. S. Vasilescu and D. M. Vuluga, *React. Funct. Polym.*, 2011, **71**, 373–379.
- 36 V. V. Jerca, F. A. Nicolescu, A. Baran, D. F. Anghel, D. S. Vasilescu and D. M. Vuluga, *React. Funct. Polym.*, 2010, **70**, 827–835.
- 37 M. C. Spiridon, F. A. Jerca, V. V. Jerca, D. S. Vasilescu and D. M. Vuluga, *Eur. Polym. J.*, 2013, **49**, 452–463.
- 38 V. Raus, A. Hološ, J. Kronek and J. Mosnáček, *Macromolecules*, 2020, **53**, 2077–2087.
- 39 M. Ilčíková, M. Mrlík, M. Cvek, D. Bondarev, Z. Kroneková, J. Kronek, P. Kasák and J. Mosnáček, *Macromolecules*, 2023, **56**, 3904–3912.
- 40 L. Hong, Z. Wang, X. Wei, J. Shi and C. Li, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 2020, **102**, 106678.
- 41 F. A. Jerca, V. V. Jerca, A. M. Anghelache, D. M. Vuluga and R. Hoogenboom, *Polym. Chem.*, 2018, **9**, 3473–3478.
- 42 C. Weber, T. Neuwirth, K. Kempe, B. Ozkahraman, E. Tamahkar, H. Mert, C. R. Becer and U. S. Schubert, *Macromolecules*, 2012, **45**, 20–27.
- 43 F. A. Jerca, A. M. Anghelache, E. Ghibu, S. Cecoltan, I. C. Stancu, R. Trusca, E. Vasile, M. Teodorescu, D. M. Vuluga, R. Hoogenboom and V. V. Jerca, *Chem. Mater.*, 2018, **30**, 7938–7949.
- 44 B. Kopka, B. Kost, K. Rajkowska, A. Pawlak, A. Kunicka-Styczyńska, T. Biela and M. Basko, *Soft Matter*, 2021, **17**, 10683–10695.
- 45 A. Michalski, M. Brzeziński, P. Kubisa and T. Biela, *React. Funct. Polym.*, 2018, 67–73.
- 46 M. Baško and P. Kubisa, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2007, **45**, 3090–3097.
- 47 A. Michalski, M. Brzeziński, P. Kubisa and T. Biela, *React. Funct. Polym.*, 2018, **128**, 67–73.
- 48 M. Save and A. Soum, *Macromol. Chem. Phys.*, 2002, **203**, 2591–2603.
- 49 M. Weber and R. Stadler, *Polymer*, 1988, **29**, 1064–1070.
- 50 S. Pásztor, B. Iván and G. Kali, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2017, **55**, 1818–1821.
- 51 M. N. Leiske, A. M. Mahmoud, N. M. Warne, J. A. C. M. Goos, S. Pascual, V. Montembault, L. Fontaine, T. P. Davis,

- M. R. Whittaker and K. Kempe, *Polym. Chem.*, 2020, **11**, 5681–5692.
- 52 G. Erdödi and B. Iván, *Chem. Mater.*, 2004, **16**, 959–962.
- 53 R. Wang, J. A. Johnson and B. D. Olsen, *Macromolecules*, 2017, **50**, 2556–2564.
- 54 A.-C. Albertsson, Degradable Aliphatic Polyesters, *Advances in Polymer Science*, 2002, vol. 157.
- 55 E. Torres, I. Dominguez-Candela, S. Castello-Palacios, A. Vallés-Lluch and V. Fombuena, *Polymers*, 2020, **12**, 1703.
- 56 A. H. Karoyo and L. D. Wilson, *Materials*, 2021, **14**, 1–36.
- 57 M. Ahearne, Y. Yang and K. Liu, *Tissue Eng.*, 2008, **4**, 1–16.
- 58 A.-C. Albertsson and I. K. Varma, Aliphatic Polyesters: Synthesis, Properties and Applications, *Advances in Polymer Science*, 2002, vol. 157, pp. 1–40.
- 59 N. López-Rodríguez, A. López-Arraiza, E. Meaurio and J. R. Sarasua, *Polym. Eng. Sci.*, 2006, **46**, 1299–1308.
- 60 S. D'Amico, *Res. Rev. Mater. Sci. Chem.*, 2014, **3**, 115–122.
- 61 P. Guo, Y. Yuan and F. Chi, *Mater. Sci. Eng., C*, 2014, **42**, 622–628.
- 62 E. Paulovičová, Z. Kroneková, L. Paulovičová, M. Majerčíková and J. Kronek, *Materials*, 2021, **14**, 1371.
- 63 M. Kasprzak, A. Szablowska, A. Kurzyk, P. Tymowicz-Grzyb, A. Najmrodzki, A. Woźniak, A. Antosik, J. Pagacz, P. Szterner, A. Plichta, P. Wieciński, P. Rusek-Wala, A. Krupa, P. Płociński, K. Rudnicka and M. Biernat, *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, **23**, 10454.

Supporting Information

Covalent segmented polymer networks composed of poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) and selected aliphatic polyesters: Designing biocompatible amphiphilic materials containing degradable blocks.

Bartosz Kopka^a, Bartłomiej Kost^a, Andrzej Pawlak^a, Agata Tomaszewska^{b,c}, Agnieszka Krupa^b, Malgorzata Basko^{a*}

Table of contents:

Figure S1. PiPOx characterization: A) SEC (H ₂ O), B) ¹ H NMR and C) ¹³ C NMR spectra (400 MHz, CDCl ₃).	2
Figure S2. ¹ H NMR spectra of: A) starting and B) modified poly(lactide) diol: HOOC-PLA-COOH (400 MHz, CDCl ₃).	3
Figure S3. ¹ H NMR spectra of: A) starting and B) modified poly(caprolactone) diol: HOOC-PCL-COOH (400 MHz, CDCl ₃).	4
Figure S4. ¹³ C NMR spectra of: modified polyester diols: A) HOOC-PCL-COOH and B) HOOC-PLA-COOH (400 MHz, CDCl ₃).	5
Figure S5. SEC curves of starting and modified polyester diols (CH ₂ Cl ₂).	6
Figure S6. ¹ H NMR spectrum of the soluble fraction of: A) PCL- <i>l</i> -PiPOx and B) PLA- <i>l</i> -PiPOx (400 MHz, CDCl ₃).	7
Figure S7. The mechanism for adduct formation with the ester-amide structure obtained by ring-opening oxazoline with a reagent containing carboxyl group.	7
Figure S8. Physical appearance of: A) as-prepared and B) dried (after extraction) PLA ₃₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-2 and PCL ₃₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-2 networks.	8
Figure S9. Physical appearance of: A) PLA ₃₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-2 and PCL ₃₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-2 networks swollen in water and B) PLA ₃₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-4 and PCL ₃₀₀₀ - <i>l</i> -PiPOx-4 networks swollen in DMF.	8
Figure S10. TGA curves of the PLA- <i>l</i> -PiPOx and PCL- <i>l</i> -PiPOx networks and starting building blocks: PiPOx, HOOC-PLA ₃₀₀₀ -COOH, HOOC-PCL ₃₀₀₀ -COOH.	9

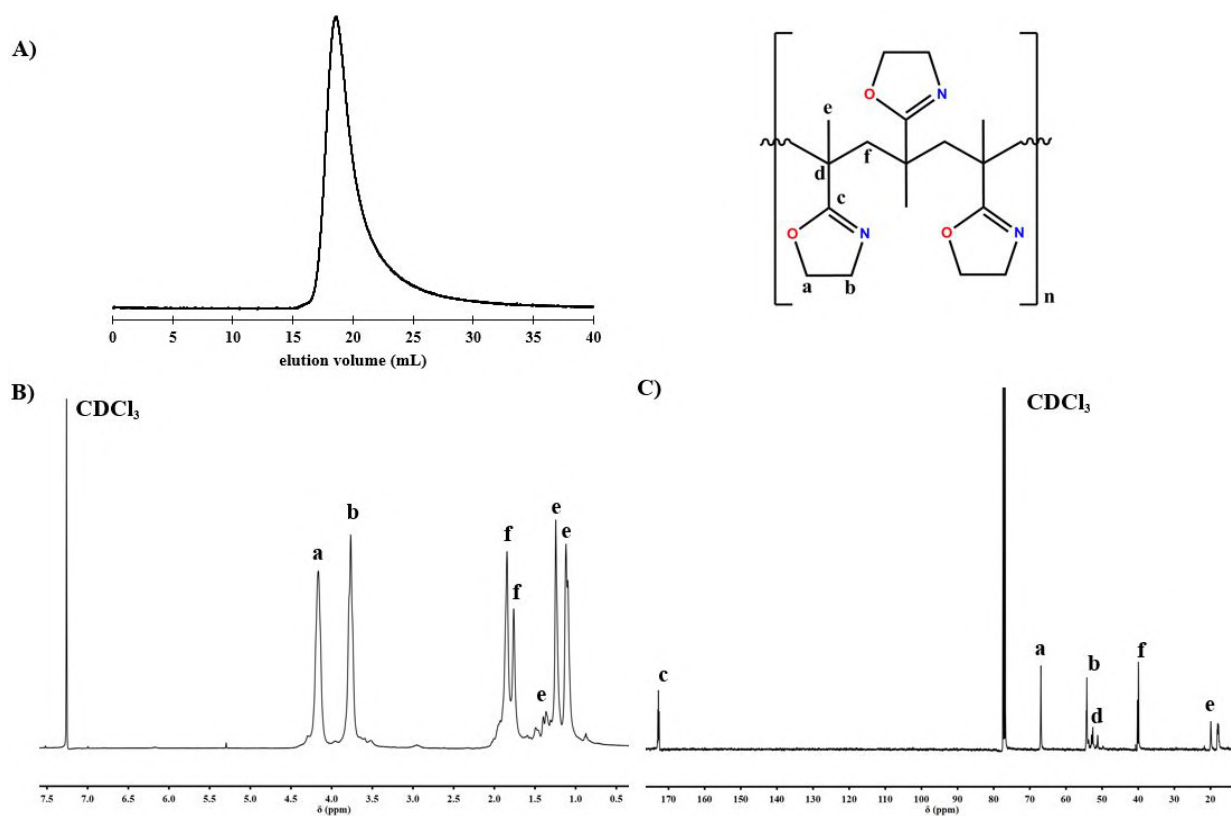


Figure S1. PiPOx characterization: A) SEC (H₂O), B) ¹H NMR and C) ¹³C NMR spectra (400 MHz, CDCl₃).

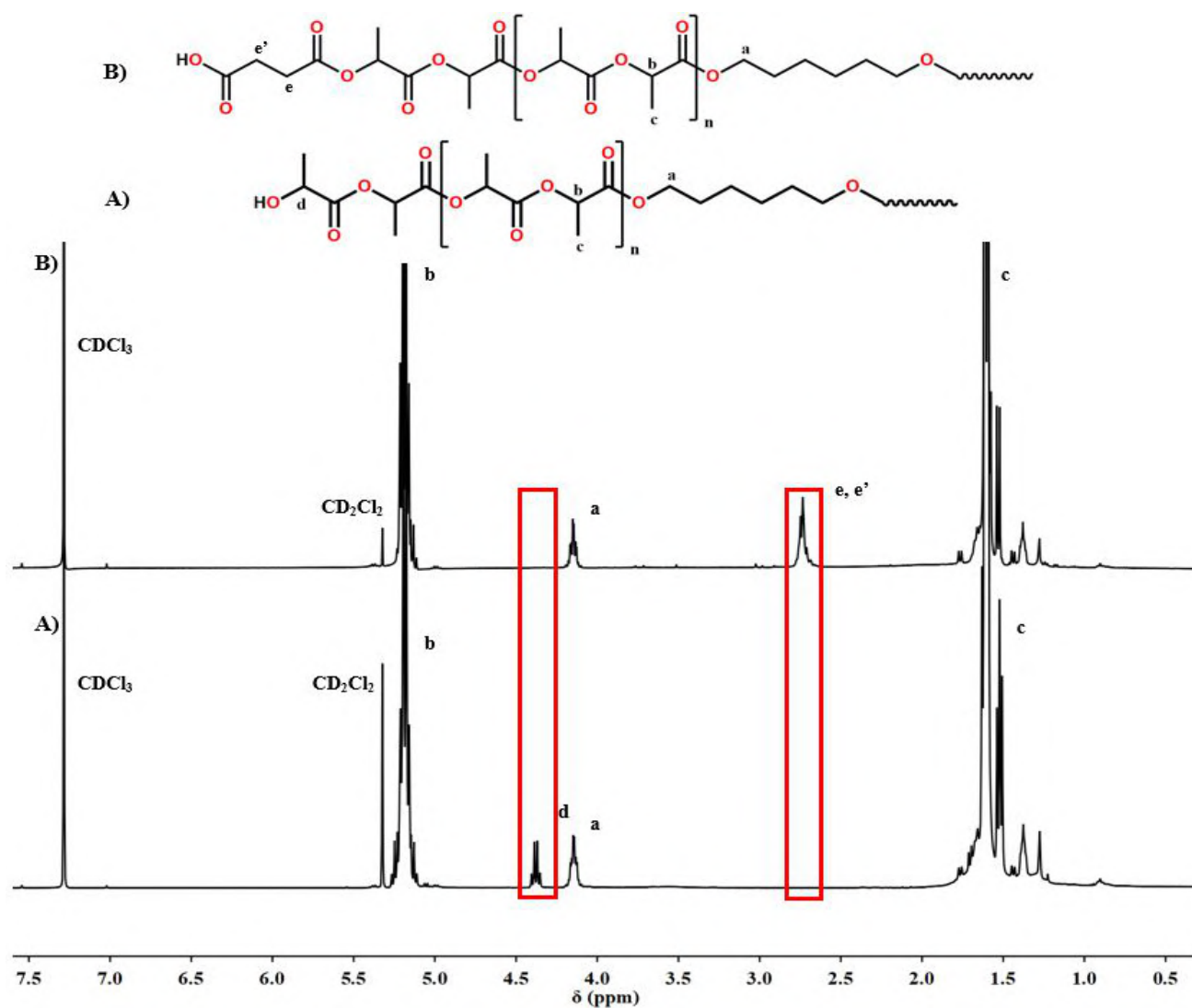


Figure S2. ^1H NMR spectra of: A) starting and B) modified poly(lactide) diol: HOOC-PLA-COOH (400 MHz, CDCl_3).

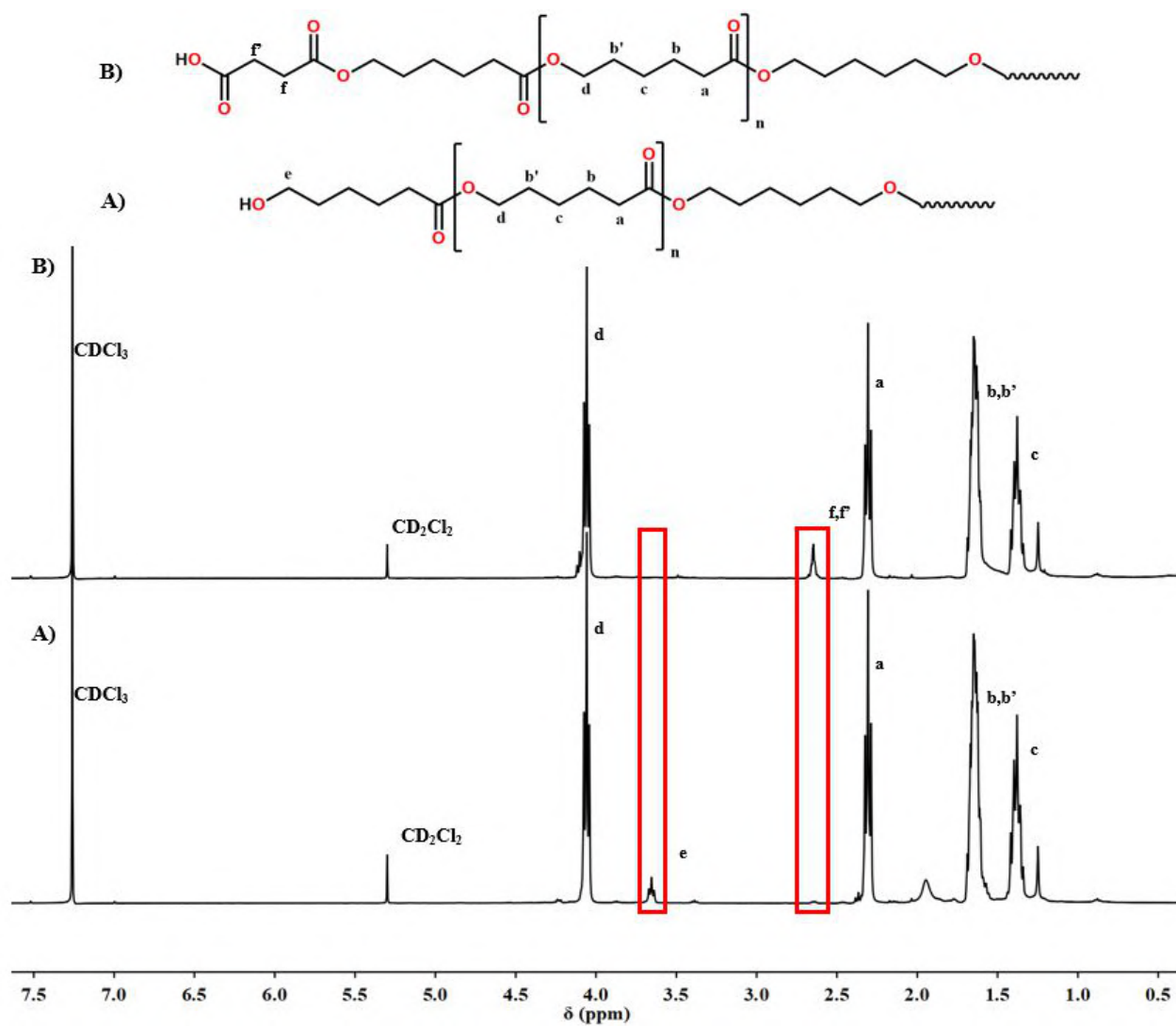


Figure S3. ¹H NMR spectra of: A) starting and B) modified poly(caprolactone) diol: HOOC-PCL-COOH (400 MHz, CDCl₃).

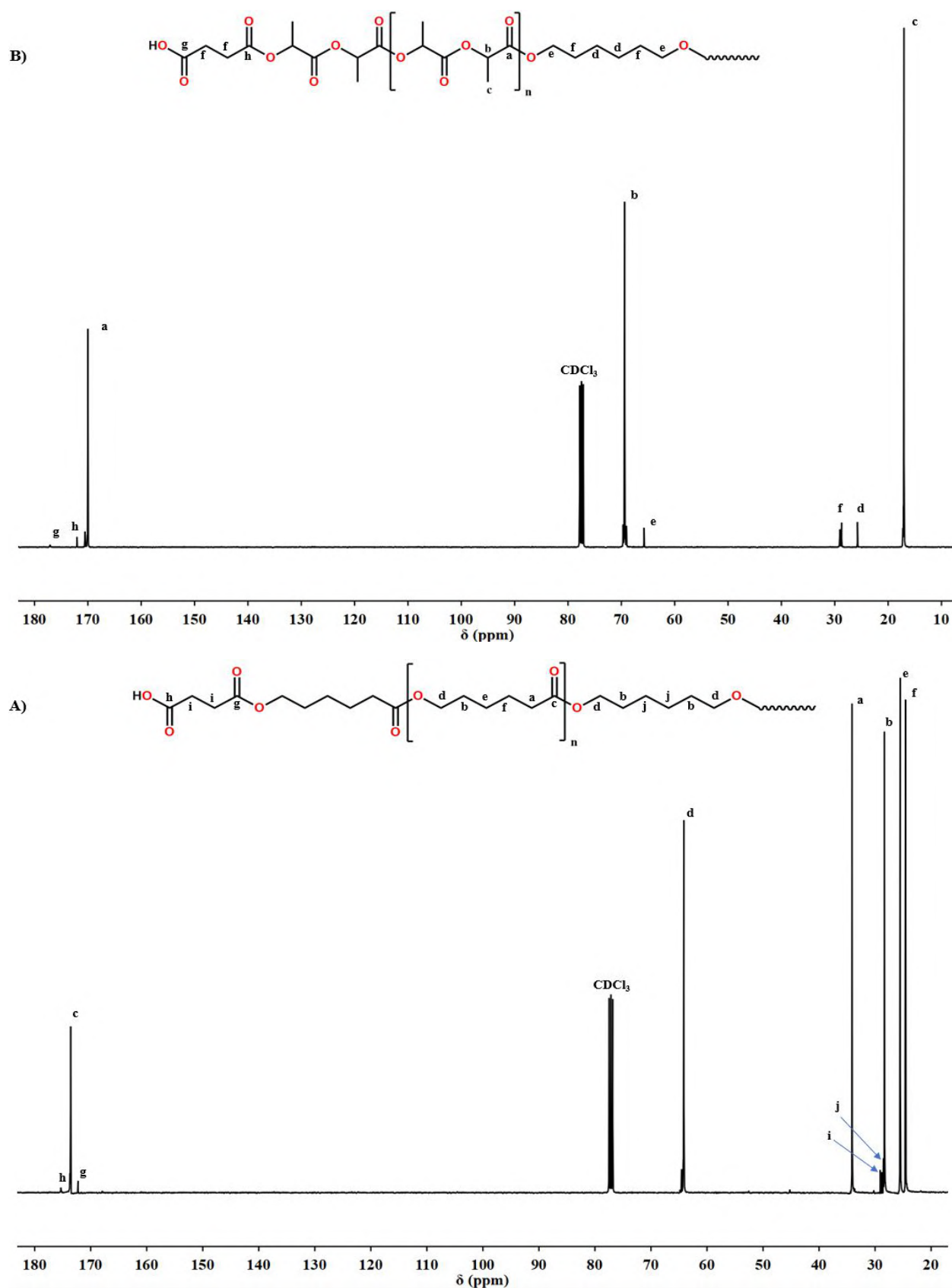


Figure S4. ^{13}C NMR spectra of: modified polyester diols: A) HOOC-PCL-COOH and B) HOOC-PLA-COOH (400 MHz, CDCl_3).

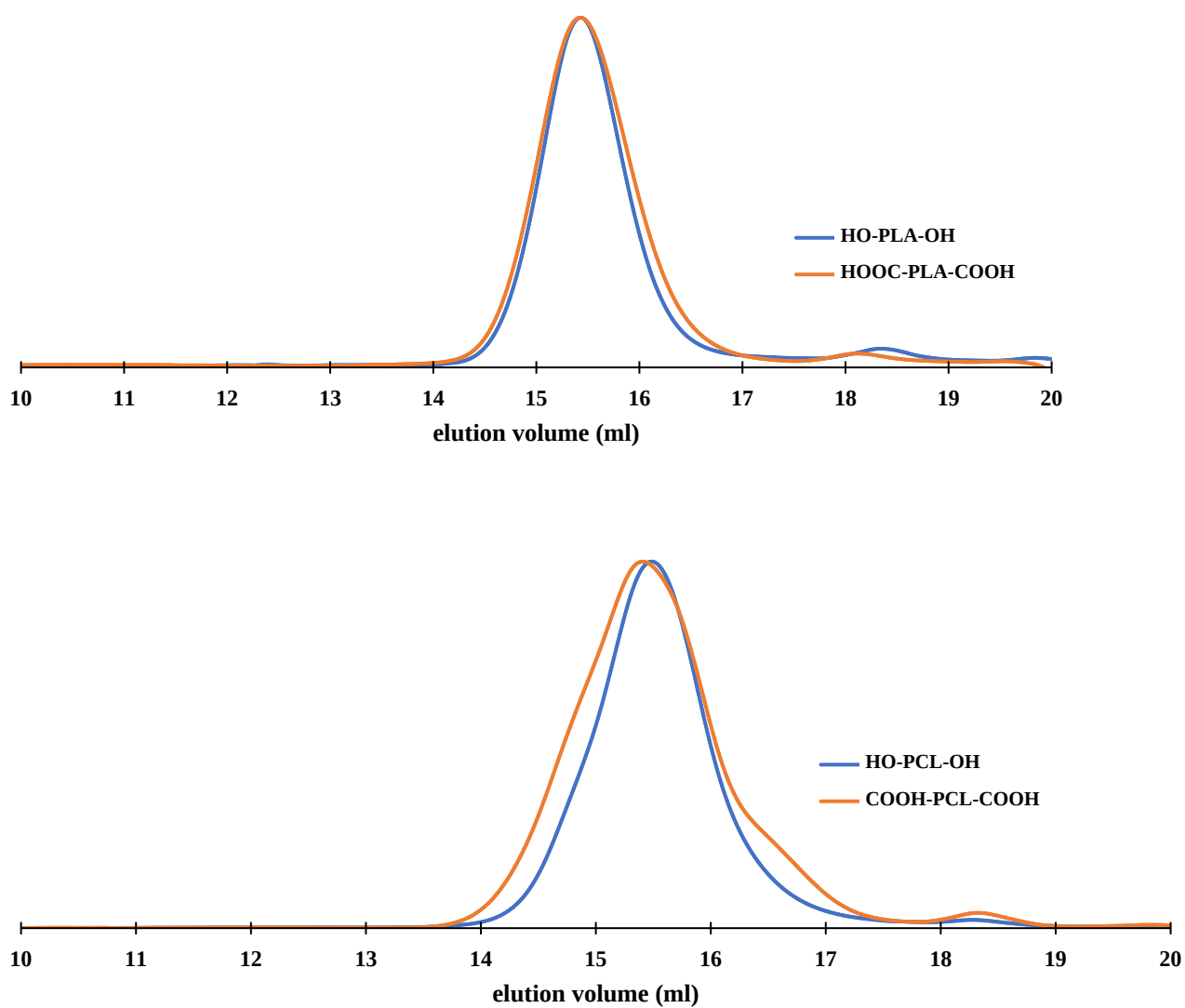


Figure S5. SEC curves of starting and modified polyester diols (CH_2Cl_2).

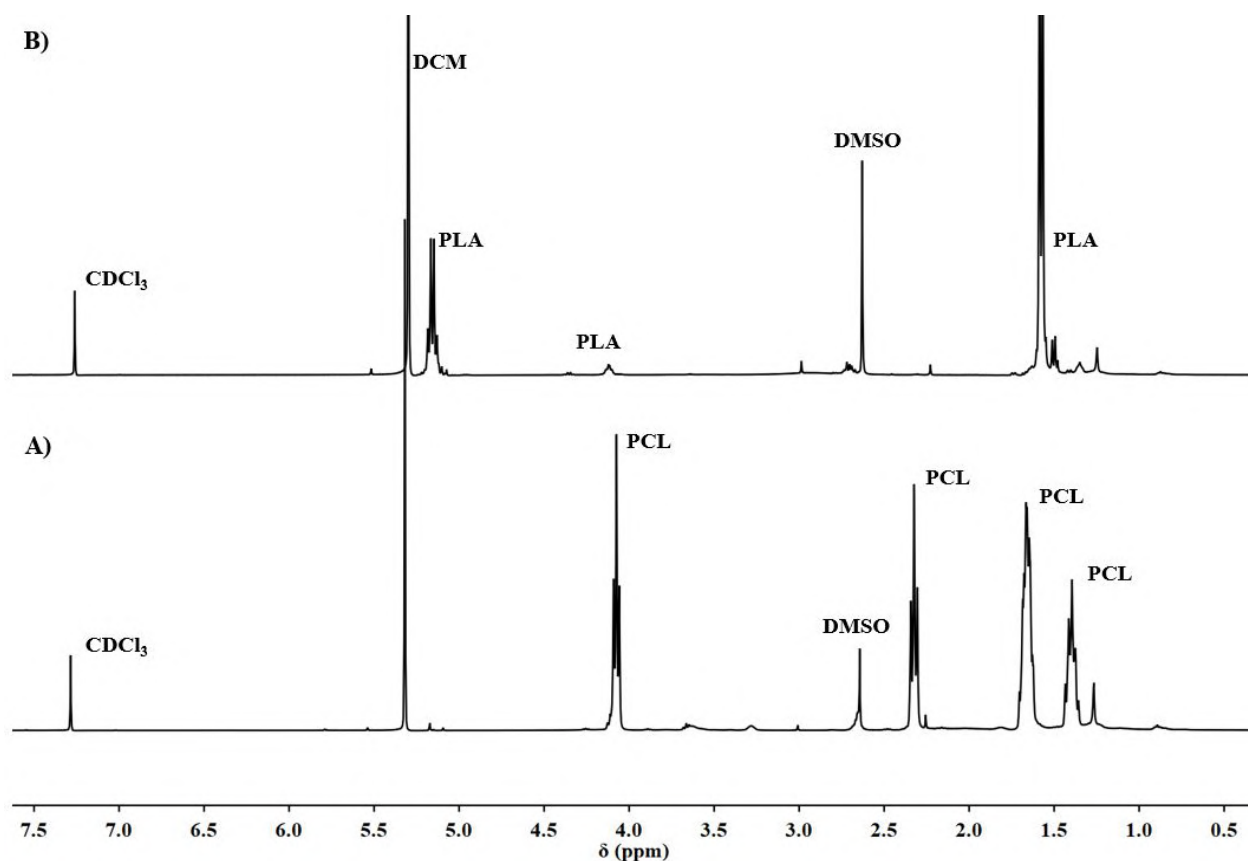


Figure S6. ^1H NMR spectrum of the soluble fraction of: A) PCL-*l*-PiPOx and B) PLA-*l*-PiPOx (400 MHz, CDCl_3).

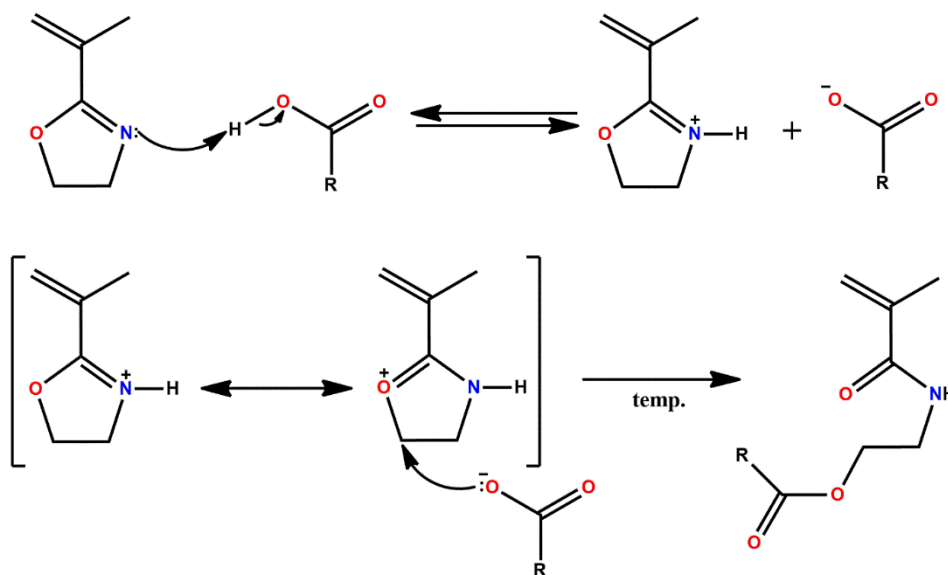


Figure S7. The mechanism for adduct formation with the ester-amide structure obtained by ring-opening oxazoline with a reagent containing carboxyl group. [Reproduced from ref. 33 with permission from Polymer Chemistry, copyright 2022]

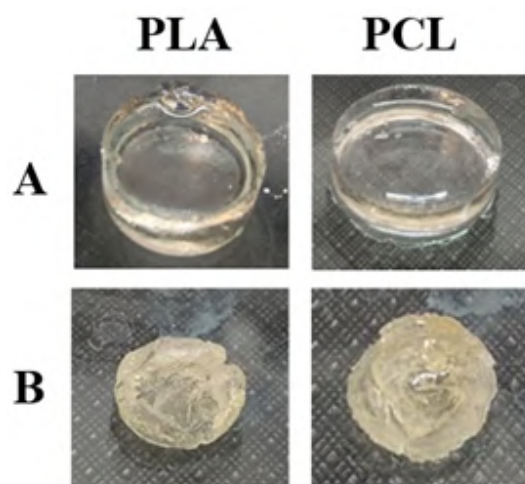


Figure S8. Physical appearance of: A) as-prepared and B) dried (after extraction) PLA₃₀₀₀-*l*-PiPOx-2 and PCL₃₀₀₀-*l*-PiPOx-2 networks.

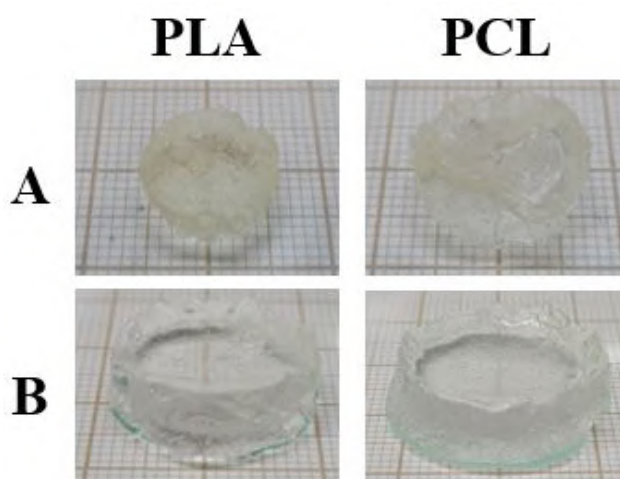


Figure S9. Physical appearance of: A) PLA₃₀₀₀-*l*-PiPOx-2 and PCL₃₀₀₀-*l*-PiPOx-2 networks swollen in water and B) PLA₃₀₀₀-*l*-PiPOx-4 and PCL₃₀₀₀-*l*-PiPOx-4 networks swollen in DMF.

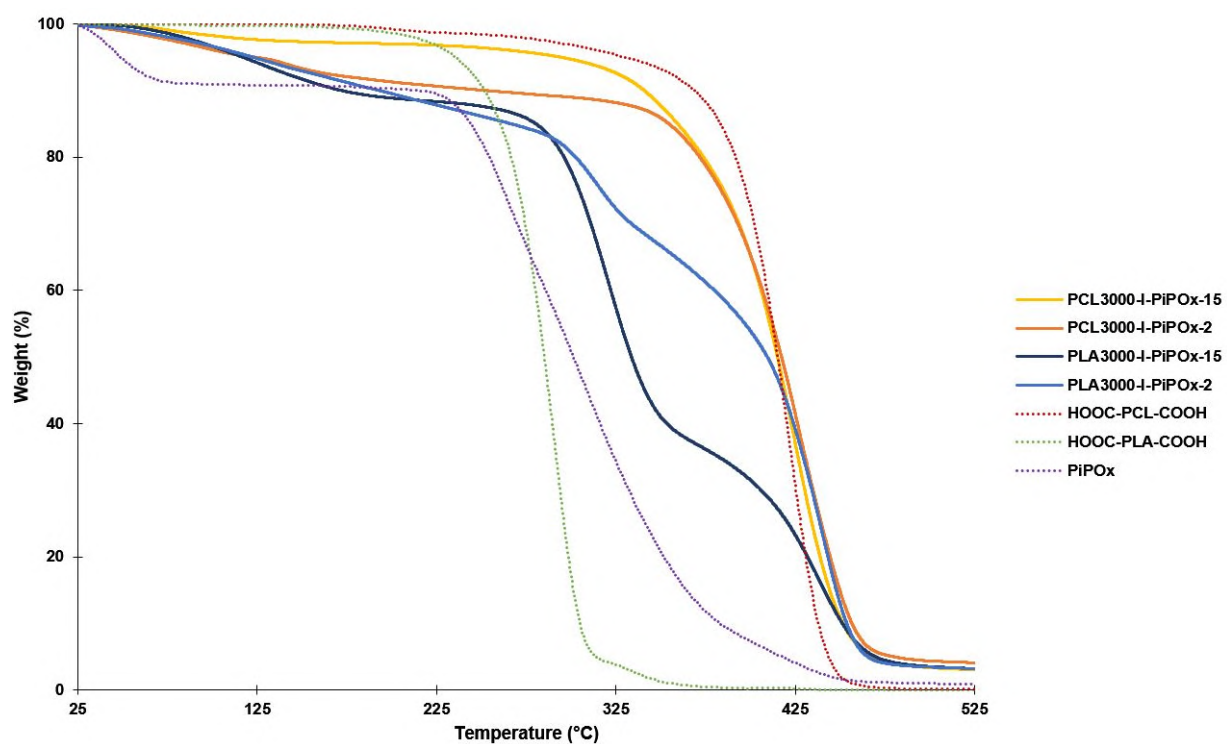


Figure S10. TGA curves of the PLA-*l*-PiPOx and PCL-*l*-PiPOx networks and starting building blocks: PiPOx, HOOC-PLA₃₀₀₀-COOH, HOOC-PCL₃₀₀₀-COOH.

Publikacja 3:

Kopka B., Kost B., Pawlak A., Bąk-Sypień I., Brzeziński M., Tomaszewska A., Krupa A., Józwiak P., Basko M., Biocompatible, porous hydrogels composed of aliphatic polyesters and poly(2-isopropenyl-2 oxazoline). Their application as scaffolds for bone tissue regeneration, **Soft Matter**, **2024**, **20**, **6655–6667**.



Cite this: DOI: 10.1039/d4sm00615a

Biocompatible, porous hydrogels composed of aliphatic polyesters and poly(2-isopropenyl-2-oxazoline). Their application as scaffolds for bone tissue regeneration†

Bartosz Kopka, ^{ac} Bartłomiej Kost, ^a Andrzej Pawlak, ^a Irena Bąk-Sypień, ^a Marek Brzeziński, ^a Agata Tomaszewska, ^{bc} Agnieszka Krupa, ^b Piotr Józwiak ^d and Malgorzata Basko ^{*a}

In this study, porous networks were efficiently prepared by crosslinking hydrophilic poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) (PiPOx) with dicarboxylic polyesters (HOOC–PLA–COOH or HOOC–PCL–COOH) in the presence of sodium chloride as a water-soluble porogen. Importantly, by using a relatively simple synthetic protocol, the resulting spongy materials were freely formed to the desired size and shape while maintaining stable dimensions. According to the SEM data, the porous 3D structure can be altered by the pore dimensions, which are dependent on the porogen crystal size. After porosity characterization, the mechanical properties were also evaluated via uniaxial compression and tensile tests. The porous networks formed hydrogels with a high water absorption capacity. Finally, after showing cytocompatibility by the MTT assay, we also demonstrated the applicability of the porous hydrogels as scaffolds for cell cultivation. The presented results suggest that this type of hydrogels is a promising material for tissue engineering.

Received 21st May 2024,
Accepted 29th July 2024

DOI: 10.1039/d4sm00615a

rsc.li/soft-matter-journal

Introduction

Covalent polymer networks can provide tuneable materials with properties controlled by several parameters, such as chemical composition, the nature of the building chains, or the density of cross-linking points. As a result of cross-linking of the polymer chains, these types of materials are characterized by better dimensional stability (compared to linear analogues) and have the ability to swell without losing the desired shape and without losing cohesion or strength.¹ Due to these specific features, polymer networks encompass a wide range of useful materials that are practically applied in many areas of life.²

The properties of network-based materials can also be modified by introducing porosity, which provides void space

in the material.³ Depending on the size, shape, and distribution of the pores, some possible positive effects can be gained, including an increase in elasticity and enhanced water sorption. Porous materials can be applied as sorbents or separation membranes due to their large surface areas.⁴ In particular, porous materials are valuable in biomedical applications, such as bone tissue engineering, where proper porosity of suitable size and interconnections between the pores are required to provide an environment to promote cell infiltration, migration, vascularisation, and nutrient and oxygen flow.⁵

Polymer networks that comprise two distinct macromolecule segments are particularly intriguing due to their ability to facilitate straightforward adjustment of the end properties of the material.⁶ Depending on their composition, the networks may possess the ability to hold large amounts of water (forming hydrogels) or may show a unique capacity for swelling in aqueous and organic media.^{7,8}

For hydrogel construction, classical water-soluble polymers or selected biopolymers must be used.^{9–11} Recently, poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) (PiPOx) has been proposed as a hydrophilic polymer that can replace typical hydrophilic polymers. Due to its noncytotoxic nature, biocompatibility and adequate durability, this polymer can be used in biomedical applications.^{12–15} The undoubted advantage of this polymer is the presence of many reactive sites located in the side chains,

^a Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, Sienkiewicza 112, 90-363 Lodz, Poland. E-mail: malgorzata.basko@cbmm.lodz.pl

^b Department of Immunology and Infectious Biology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland

^c BioMedChem Doctoral School of the University of Lodz and Lodz Institutes of the Polish Academy of Sciences, Matejki 21/23, 90-237 Lodz, Poland

^d Department of Invertebrate Zoology and Hydrobiology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: <https://doi.org/10.1039/d4sm00615a>

allowing further transformations and modifications.^{16–22} As already presented, the application of difunctional reagents enabled the preparation of PiPOx cross-linked structures with covalent nodes. Initially, the effectiveness of this synthetic approach was demonstrated with simple dicarboxylic acids (succinic, glutaric, adipic, pimelic, suberic, azelaic, sebacic, and dodecanedioic acids), leading to hydrophilic PiPOx covalently joined by relatively short, aliphatic hydrophobic linkers.²³ Additionally, networks containing rigid nodes from macrocycles have been proposed to adjust the final properties of the material. Using dicarboxylic acid pillar[5]arene as a cross-linker enabled the introduction of covalently bound bulky macrocycles into PiPOx networks, resulting in hydrogels with enhanced mechanical properties.²⁴ The partial modification of poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) with terpyridine provided access to supramolecular hydrogels with self-healing properties.²⁵ Dual-crosslinked hydrogels (created by both covalent and physical interactions) were also obtained from PiPOx modified with terpyridine and crosslinked covalently with azelaic acid.²⁶ Transient crosslinking was triggered by complexation of the terpyridine units with different divalent transition metal ions. By applying this methodology, hydrogels with superior mechanical properties were obtained compared to those of pure covalently crosslinked PiPOx hydrogels.

Our research group investigated the effectiveness of conjugating polymers containing terminal carboxyl groups and PiPOx to obtain segmented networks. We first demonstrated the efficient cross-linking of PiPOx by poly(ethylene oxide), a widely used hydrophilic polymer that is considered the gold standard for preparing drug carriers with improved physico-chemical properties and circulation in the body.^{27,28} Next, we have extended our approach to select polyesters for the synthesis of biocompatible amphiphilic materials containing degradable blocks.²⁹ Our results confirmed that segmented networks can be effectively prepared according to a procedure that eliminates the risk posed by the presence of residual undesirable catalysts or side compounds.

In this study, we aimed to obtain porous materials with properties distinct from their non-porous counterparts, particularly in terms of increased water absorption, which allows for the formation of durable hydrogels. Additionally, we hypothesized that this type of network would demonstrate potential as scaffolds for cell culture, providing access to innovative materials suitable for tissue engineering. Generally, porous polymer networks are important in materials science due to their unique properties, such as lightness and excellent dimensional stability. There are many methods for pore generation in materials, including particle etching, phase separation, gas foaming, melt blending, spinning, drawing, extrusion, and laser ablation. We aimed to obtain a porous crosslinked morphology throughout the network built from biocompatible polyester blocks and PiPOx using relatively simple and benign chemistry.

A salt leaching technique with appropriate posttreatment is presented here to prepare spongy materials with specific porosities and pore sizes. The morphologies of the resultant networks were examined by scanning electron microscopy

(SEM), and their porosities and pore volumes were investigated. The mechanical properties of the PiPOx-polyester porous hydrogels were then evaluated during compression and tensile tests. Next, human osteoblasts were seeded within the scaffolds to confirm biocompatibility and to determine the cell seeding efficiency and viability.

The results of our research confirmed the possibility of using a simple method to obtain porous hydrogels composed of biocompatible elements (hydrophilic PiPOx chains and polyester connectors). The use of this new type of cross-linked porous material can be envisaged for tissue engineering, hydrogel dressings or removal of contaminants from water.

Experimental section

Materials

l-LA was purchased from Purac (99%, Netherlands), recrystallized from dry iso-propanol, subsequently sublimated and storage under vacuum. 2-Isopropenyl-2-oxazoline (iPOx, 98%, Merck) was distilled under reduced pressure directly before use. Azobis(isobutyronitrile) (AIBN) was purchased from Merck, recrystallized from ethyl alcohol (40 °C), dried under vacuum and storage at 4 °C. Hexane-1,6-diol (97%), trifluoromethanesulfonic acid (99%), DABCO (99%), succinic anhydride (99%) were purchased from Merck (99%) and used without further purification. Dimethyl sulfoxide (DMSO), dichloromethane, chloroform, diethyl ether, ethyl alcohol, hexane (analytical grade) were purchased from POCH S.A. (Polish Chemicals Reagents) and used as received. PiPOx ($M_{nMALS} = 150\,000\text{ g mol}^{-1}$, H₂O as eluent, calibration on poly(ethylene oxide) standards), HOOC-PLA₃₀₀₀-COOH and HOOC-PCL₃₀₀₀-COOH ($M_{nRI} = 3000\text{ g mol}^{-1}$, CH₂Cl₂ as eluent, calibration on poly(styrene) standards) were obtained according previous reported procedure.²⁹ NaCl (Cenos, Poland) used as received. Hydroxyapatite (Aldrich) was calcinated at 900 °C for 3 hours at a heating rate of 5 °C min⁻¹.

Fabrication of the porous PiPOx-PLA and PiPOx-PCL networks

The synthesis of porous networks was carried out according to the method developed by our research group, and the composition of the reaction mixture was modified by introducing a solid porogen.²⁹ In this study, di-carboxyl terminated polyesters with $M_n = 3000\text{ g mol}^{-1}$ (HOOC-PLA₃₀₀₀-COOH and HOOC-PCL₃₀₀₀-COOH) were selected for PiPOx cross-linking, assuming 4% oxazoline ring opening. To obtain different porosities of the material, three sizes of NaCl crystals were used (salt A ~ 50–150 µm, B ~ 270–560 µm, C ~ 3.2–6.2 mm). The porogen was added to the mixture of polymers in DMSO, and the weight ratio between the polymers and NaCl was 1 : 24.

Typically, to obtain the PiPOx-PLA-porous network, 83 mg of PiPOx, 44 mg of HOOC-PLA₃₀₀₀-COOH, and 1.0 mL of DMSO were placed in a glass vial and stirred for 1 h. After the complete dissolution of the components, 3 g of NaCl was added to the mixture. The resultant paste was placed in a mould for 75 minutes at 140 °C. Next, the obtained solid materials were washed extensively with distilled water to remove any salt.

The water was changed every 2 h until a constant weight of the wet specimen was obtained. The effectiveness of NaCl removal was confirmed by TGA analysis and by determining the chloride ions in the solution using a 0.1 M silver nitrate solution. Finally, the porous networks were kept in water in a closed container.

The cross-linking efficiency was assessed after washing the network with water and subsequent extraction with CH_2Cl_2 . Then, the content of the gel fraction was determined based on the ratio of the mass of the dried network to the mass of polymers that were cross-linked. The procedure used allowed the creation of porous networks with a relatively good gel fraction, which was 95% for both types of networks. Table S1 in the ESI† shows an example of the composition of the pastes used for crosslinking.

For comparison, nonporous networks were also prepared using the same proportion of reactive polymers in DMSO.

Fabrication of PiPOx-PLA and PiPOx-PCL porous networks with hydroxyapatite particles (PiPOx-PLA-HA and PiPOx-PCL-HA)

To obtain a porous network containing hydroxyapatite particles, NaCl was mixed with 14 mg of calcined hydroxyapatite and added to a prepared reactive mixture. After cross-linking, further procedures were performed as described above.

Characterization

The average molar masses and molecular weight distribution of the polyesters were determined by obtaining LS measurements using a size-exclusion chromatography (SEC) system comprising an Agilent Pump 1100 Series (preceded by an Agilent G1379A Degasser), equipped with a set of two PLGel 5m MIXED-C columns. A Wyatt Optilab Rex differential refractometer and a Dawn Eos8 (Wyatt Technology Corporation) laser photometer were used as detectors. Dichloromethane was used as the eluent at a flow rate of 0.8 mL min^{-1} at room temperature. The system was calibrated according to polystyrene standards. PiPOx samples were analysed in water at 26 °C by an SEC setup consisting of three TSK-GEL columns (G5000 PWXL + 3000 PWXL + 2500 PWXL; $7.8 \times 300 \text{ mm}$; Bioscience) with an Agilent pump and a triple detector system (Viscotek Dual Detector Refractometer/Viscometer Model 350 and Viscotek 270 Dual Detector). Poly(ethylene oxide) standards (Polymer Laboratories, USA) were used to determine polymer molar masses.

Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) was performed on a Nicolet 6700 spectrometer equipped with a deuterated triglycine sulfate (DGTS) detector. Attenuated total reflectance was used for IR measurements. The spectra were obtained by adding 128 scans at a 2 cm^{-1} resolution. The solid-state ^{13}C CP MAS and ^1H NMR experiments were performed on a BRUKER Avance III 400 spectrometer operating at 400 MHz for ^{13}C and ^1H and equipped with a MAS probe head using 4 mm ZrO_2 rotors.

Thermogravimetric analysis (TGA) was performed under nitrogen flow by heating the samples from ambient temperature to 600 °C at a heating rate of 20 °C min^{-1} on a Discovery

5500 apparatus. The measurements were conducted by placing polymer samples (5 mg) in a measuring cell.

SEM observation of the prepared porous networks

The dried networks were analysed using a JEOL 6010LA scanning microscope operating in high-vacuum mode at an accelerating voltage of 10 kV. The cross-sections of the scaffolds were obtained by fracturing in liquid nitrogen and coating them with a thin layer (20 nm) of gold using a gold sputter-coater (Q150R ES, Quorum Technologies, East Sussex, England).

BET surface area analysis

Before performing the adsorption test, the glass vessel containing the samples was degassed at 40 °C under vacuum in one of the degassing stations of an ASAP 2020 Plus (Micromeritics Instrument Corporation, Norcross, GA, USA) device until the pressure stabilized at $5 \text{ } \mu\text{m Hg min}^{-1}$. N_2 and Kr adsorption (Linde HiQ, 99.999% pure) was performed at liquid nitrogen temperature (77 K) at pressures ranging from $0.05 p/p_0$ to $0.3 p/p_0$ to obtain surface area data. We processed the captured adsorption data using MicroActive software (for Windows). BET multipoint analysis (Brunauer-Emmett-Teller) was used to calculate the total area.

Water uptake capacity estimation

The equilibrium water uptake of the porous networks was determined after NaCl leaching. The specimens ($n = 3$) were conditioned in water at room temperature (20 °C) for 7 days. Then, the samples were gently dried with paper tissue to remove any remaining solvent from the surface and weighed (W_s). Next, the network disks were dried and weighed (W_d). The water uptake was calculated with the following equation:

$$\text{ESD} = \left(\frac{W_s - W_d}{W_d} \right) \times 100$$

Mechanical properties

The mechanical properties of the hydrogels were examined during a tensile experiment and during uniaxial compression using a Linkam TST 350 mini tensile tester. The tests were carried out at $T = 25 \text{ °C}$. The swollen samples for tensile testing were $22 \times 10 \times 4\text{--}5 \text{ mm}$ in size. The deformation rate during stretching was $50 \text{ } \mu\text{m s}^{-1}$, and the temperature was 20 °C .

Two types of cylindrical samples were tested during compression: swollen with water and after drying for 24 h at room temperature. The first samples were 10 mm in diameter and 8–9 mm in height, and the second samples were 4.5 mm in diameter and 3.0–3.5 mm in height. These samples were placed in a special homemade holder that enabled uniaxial compression, and the compressive force was measured as a function of distance. The deformation rates were $15 \text{ } \mu\text{m s}^{-1}$ for the wet samples and $5 \text{ } \mu\text{m s}^{-1}$ for the dry samples, equivalent to an initial compression rate of $10\% \text{ min}^{-1}$. Three gel samples were measured in each experiment. The stress was calculated from the measured force related to the original area of the sample surface, and the compression ratio was defined as the initial thickness of the sample divided by the actual thickness.

A compression experiment was also used to evaluate the stress relaxation in the samples. Upon reaching a compression ratio of CR = 8, the compression was stopped, and a change in stress in the compressed sample was observed over time.

Tests showing the ability of the hydrogels to recover shape after compression were carried out with the use of an Instron 5582 Model tensile machine. For this purpose, PCL discs with a height of approximately 10 mm and PLA discs with a height of 12–13 mm were compressed at a rate of 5% min⁻¹ to selected compression ratios of 2, 4, 6 and 8. After obtaining the desired compression ratio, the load was released within 1–2 seconds, allowing the sample to recover its shape.

Biological properties of hydrogels

Sterilization. All hydrogel samples were sterilized in an autoclave at 121 °C for 15 min before use in biological assays.

Cell culture. To assess the potential use of the tested hydrogels for bone regeneration applications, the human foetal osteoblast cell line hFOB 1.19 (CRL-11372™, ATCC, Manassas, VA, USA) was used in *in vitro* studies. The cells were cultured in a 1:1 mixture of phenol red-free Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's 12-F medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2.5 mL of L-glutamine (100×) and 0.3 mg mL⁻¹ geneticin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) at 34 °C in a humidified incubator with 5% CO₂. The culture medium was changed twice a week, and when the cell monolayer reached 90% confluence, the cells were passaged with 0.25% trypsin-EDTA solution (Biowest, Nuaillé, France).

Cytobiocompatibility of hydrogels. The cytobiocompatibility of the hydrogels towards human foetal osteoblasts was assessed by using the MTT assay. hFOB (1.19) osteoblasts were added to a 96-well plate at a density of 4×10^4 cells per well in a 200 µL per well volume and incubated overnight to attach and form a confluent monolayer. The next day, the hydrogels were cut into small pieces with a size equal to 1/10 of the well, placed in 96-well plates containing hFOB 1.19 cells and incubated for 24 h under appropriate conditions. At the same time, a positive control for cell viability (PC), which included cells cultured in medium alone, and a negative control (NC), which included cells treated with 0.03% H₂O₂ solution, were prepared. After incubation, 20 µL of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solution (5 mg mL⁻¹) was added to each well, and the mixture was incubated for an additional 4 h. In the next step, the supernatants were replaced with 200 µL of DMSO to dissolve the formazan crystals formed for 4 hours. Then, the absorbance was measured spectrophotometrically using a Multiskan EX plate reader (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at 570 nm.

Cell proliferation assay and SEM imaging. The tested hydrogels were placed in a 12-well cell culture plate and incubated overnight with 2 mL of hFOB 1.19 growth medium at 34 °C and 5% CO₂ in a humidified incubator. The next day, the medium from the wells was discarded, and 100 µL of a suspension of human foetal hFOB 1.19 osteoblasts was seeded at the centre of each hydrogel (1×10^6 cells per hydrogel) following incubation

for 1.5 h under the appropriate conditions for osteoblast cells. Next, the cells were supplemented with 2 mL of medium and cultured for 7, 14 or 21 days at 34 °C and 5% CO₂ in a humidified incubator. The growth medium was replaced every third day during the 21-day incubation period. On Days 7, 14, and 21, hydrogels with cells were collected for SEM imaging or proliferation assays.

The number of osteoblasts in the samples was evaluated using the CyQUANT™ Cell Proliferation Assay (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) after 7, 14, and 21 days of culture, as described by Biernat and Kurzyk.^{30,31} After the cells in the samples were cultured for 7, 14, or 21 days, they were washed once with PBS and then kept frozen at -80 °C. Prior to use, the hydrogel samples were thawed and warmed to room temperature. The reagents and cell number standard curves were prepared according to the manufacturer's protocol for the assay. The fluorescence of the samples was measured using a SpectraMax® i3x Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) with an excitation wavelength of 405 nm and an emission wavelength of 520 nm.

SEM imaging was conducted to examine the control hydrogel, which did not contain any cells and was incubated for 24 hours with medium. Additionally, the samples were examined after they were incubated for 7, 14, or 21 days. After the appropriate incubation times, the hydrogels were fixed for 2 hours using a solution containing 2% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer. The samples were then washed once in PBS and stained with a 1% solution of OsO₄ for 1 hour. After washing again with PBS, the samples were dehydrated and dried for imaging using SEM. The first stage of the dehydration process for the hydrogels was carried out using a Leica EM TP automatic tissue processor (Leica Microsystems GmbH, Vienna, Austria). The samples were rinsed in an ethanol series at concentrations of 10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 96% and 99.6% for 45 minutes at each concentration. After that, the samples were moved to a Leica EM CPD300 critical point dryer from the same manufacturer. The following protocol was used: 15% CO₂ was mixed slowly with 120 second delays between cycles, the CO₂ exchange speed was set to 1, the gas-out heat was set to slow, and the gas-out speed was also set to slow (20%). The process consisted of a total of 35 cycles. Once the hydrogels were dry, they were mounted on stubs using carbon adhesive tabs. The samples were examined using a Phenom ProX scanning electron microscope (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA). To install the stubs, a charge reduction sample holder was used.

Statistical analysis in biological studies. Statistical analyses and graphs for biological studies were generated using GraphPad Prism version 10.1.2 for Windows (licence number 324; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). For the statistical analysis of cell proliferation, the Kolmogorov-Smirnov test was used to assess the Gaussian distribution. The Brown-Forsythe test was used to verify the equality of group variances. The data were analysed separately for each hydrogel using Brown-Forsythe and Welch ANOVA tests following Dunnett's T3 multiple comparisons test.

Results and discussion

Synthesis of the PiPOx-PLA and PiPOx-PCL porous segmented networks

As we recently reported, the grafting of carboxyl-functionalized polyesters to the PiPOx backbone allows the direct and efficient formation of amphiphilic segmented networks in a system free from any catalyst or side products.²⁹ This work aimed to introduce porosity into networks using a relatively simple technique that provides access to macroporous polymer sponges and opens up wider applications of this type of material.³² To this end, the reactive polymers (HOO-PLA₃₀₀₀-COOH or HOO-PCL₃₀₀₀-COOH and PiPOx) were mixed with DMSO in the presence of NaCl, which was used as the water-soluble porogen. The coupling reaction between the carboxyl end groups of the polyesters and the oxazoline rings was performed at 140 °C, depending on the mass of the reaction mixture (typically 70–80 minutes). The theoretical ratio of -COOH groups to iPOx rings in all cases was 0.04, and the polymer weight concentration was 10%. After washing with water and salt leaching, porous networks were obtained, as shown in Scheme 1.

The obtained networks were designed as “PiPOx-PCL” or “PiPOx-PLA” to show the characteristic material components. Scheme S1 in the ESI[†] illustrates the process of fabricating porous networks in the presence of porogens. The presence of salt did not disturb the cross-linking efficiency of the reactive polymers (the content of an insoluble fraction on average was approximately 95%), and stable networks were easily synthesized under the applied formation conditions. Importantly, in practice, the prepared materials were easily detached from the moulds after the crosslinking process, enabling further processing without damage. By changing the NaCl crystal size (from several μm to mm, as shown in Fig. S1 in the ESI[†]), we prepared a series of porous materials with different morphologies. Even in the case of the synthesis carried out in the presence of the largest crystals (salt C in Fig. S1, ESI[†]), a cross-linked material was obtained that was largely openwork but retained its consistency, enabling practical use. We selected this type of sponge for separate, future research aimed at examining the possibility of using it as a porous substrate for plant growth. The networks obtained in the presence of salt B (NaCl crystals with a size of

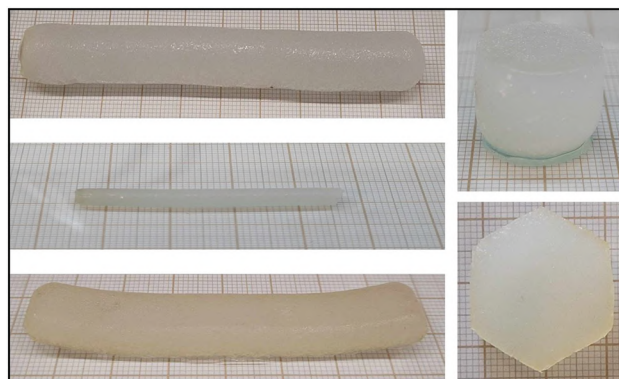


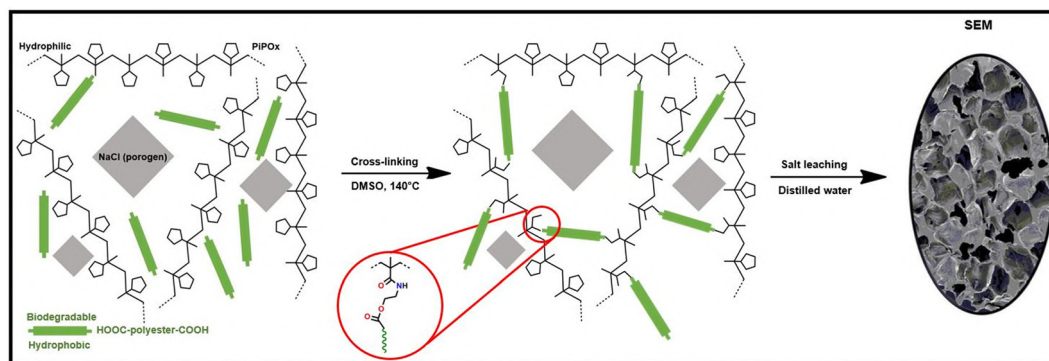
Fig. 1 The physical appearance of the porous materials formed into selected shapes, as demonstrated by cylinders, strips, and others (swelling in water, after salt extraction).

~270–560 μm , Fig. S1, ESI[†]) were characterized by the most uniform structure. These materials were selected for the present study to evaluate the usability of the method and characterize the properties of these novel, porous networks.

As shown in Fig. 1, the moulds of various shapes enabled the preparation of porous materials formed into the desired, precisely defined 3D architecture tested in our work for cylinders, strips, or cuboids with a hexagonal base.

In the wet state, the obtained materials were flexible and durable and thus could be easily manipulated without damage, as shown in Fig. 2 and the Supplementary Video (ESI[†]).

However, during further tests, we observed that after complete drying and reswelling, the material lost some of its primary durability, which might have been caused by the partial collapse of the pores. For this reason, after washing, the studied porous materials were kept in water in closed containers. The collapse of polymeric networks upon drying can be explained by understanding the behavior of the polymer chains and the interactions between them. When networks are in a wet state, the presence of water molecules increases the mobility of the polymer chains which allows the network to maintain a more expanded structure. With the loss of water, the polymer chains begin to reorganize and move closer together which results in a more compact and dense structure compared to the wet state.



Scheme 1 Schematic illustration of the preparation of porous networks by coupling PiPOx with di-carboxy-terminated polyesters in the presence of NaCl, which is used as a water soluble porogen.

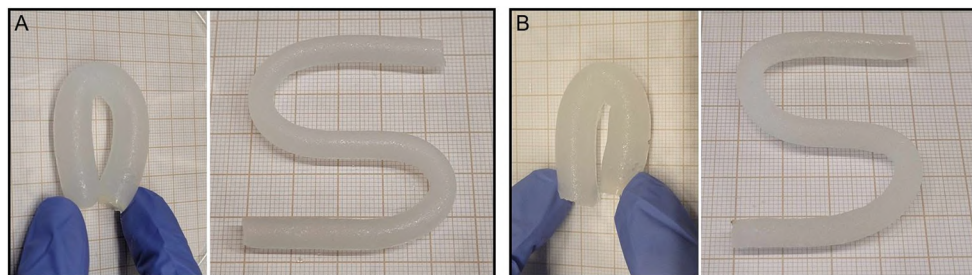


Fig. 2 The various forms of deformation tested to demonstrate the elasticity and durability of the water-swollen PiPOx-PLA (A) and PiPOx-PCL (B) networks.

This reorganization is driven by the reduction in free volume and the need to minimize the system's energy which may be achieved in different ways.³³

To confirm the effective removal of NaCl, we performed TGA, which showed that the contents of the remaining components in the porous networks that were not decomposed at the applied temperature were the same as those in the networks obtained without salt (Fig. 3).

TGA analysis confirmed that the porous PiPOx-PCL networks are more stable (beginning of the decomposition above 300 °C) than the porous PiPOx-PLA networks (the degradation starts around 275 °C), which was also observed previously for the non-porous analogues. However, porous networks decompose much faster than non-porous ones (the decomposition temperature shifts by approximately 40 °C), which may be related to the presence of pores and a different heat transport mechanism in the material. As reported, porous polymeric

networks generally have a higher surface area and more void spaces, which can influence their thermal stability. The presence of pores can facilitate the escape of volatile decomposition products, potentially leading to a lower decomposition temperature compared to nonporous networks which tend to have a more uniform and dense structure and the lack of pores causes volatile products to be less easily released, which can lead to a higher decomposition temperature.³⁴

Additionally, total salt leaching was examined by testing the presence of chloride ions in a solution of silver nitrate. The obtained results revealed that in all cases, no salt could be detected after 5 days of leaching. Moreover, SEM micrographs did not show any visible salt residues, indicating the successful removal of the porogen from the material. Because the cross-linking of the reactive polymers used was very efficient, porous, amphiphilic, segmented polymer networks were relatively easily obtained, in which shorter hydrophobic and degradable (polyester) chains were grafted with both ends to much longer hydrophilic polymer chains (PiPOx). As in previous work, the presence of the characteristic building segments in the networks was confirmed by ATR FT-IR and CP MAS analysis using purified and dried samples.²⁹ The corresponding, exemplary spectra are presented in the ESI† as Fig. S3 and S4.

The physicochemical properties of the networks are expected to result from the properties of the components.³⁵ As the obtained porous networks comprise covalently joined hydrophilic and hydrophobic segments, they show a unique capacity for swelling in aqueous and organic media.²⁹ In the present study, we focused on the water sorption abilities of the obtained porous networks. This feature could be crucial for many potential applications, such as adsorbents for water purification or scaffolds for cell growth. Previous observations of nonporous networks synthesized from corresponding polyesters ($M_n = 3000 \text{ g mol}^{-1}$) and PiPOx (4% opened rings) showed that networks with PCL segments have a slightly greater capacity to swell in water than networks comprising PLA segments.²⁹ The equilibrium swelling degrees in distilled water for these non-porous networks were 99% for the PiPOx-PCL sample and 73% for the PiPOx-PLA sample. The present results show that the introduction of porosity into the PiPOx-polyester network structure significantly influenced the ability to absorb water (Fig. 4).

The porous networks showed high water absorption capacities of 2130% for PiPOx-PLA and 2222% for PiPOx-PCL

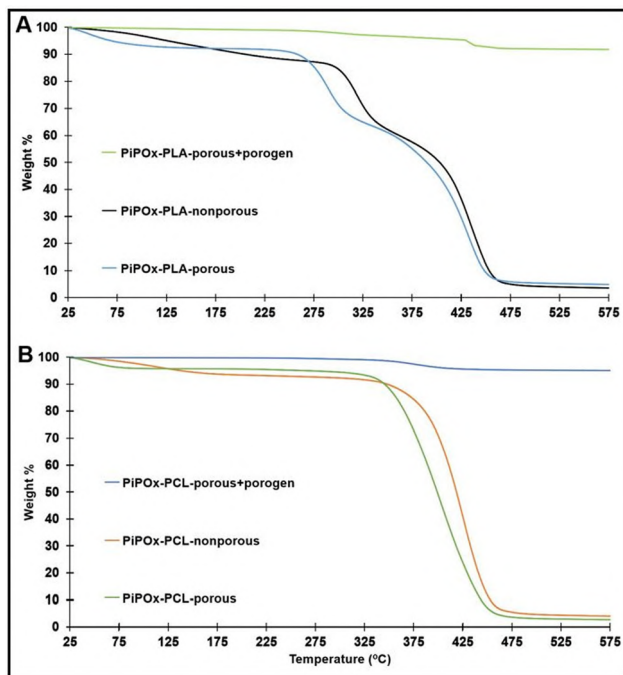


Fig. 3 TGA analysis of nonporous and porous networks of (A) PiPOx-PLA and (B) PiPOx-PCL.

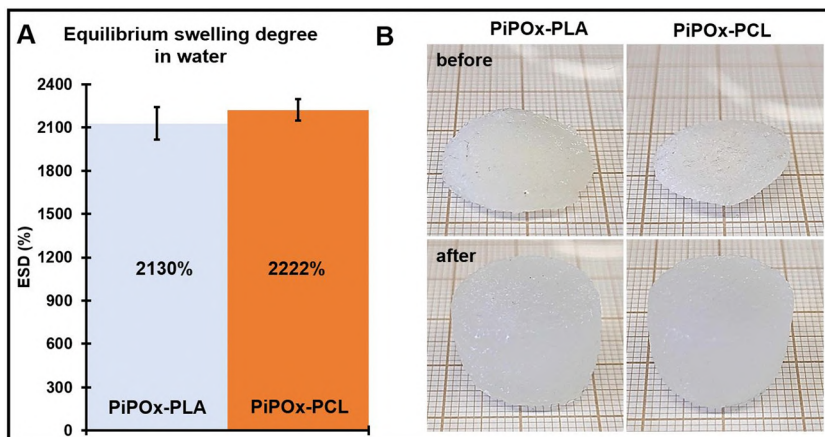


Fig. 4 Swelling of porous PiPOx-PCL and PiPOx-PLA networks in water: (A) equilibrium swelling degree and (B) physical appearance of squeezed sponges before swelling and stable forms after swelling.

(Fig. 4A). The networks obtained in the presence of salt “A” showed even a slightly higher degree of swelling (2300% for PiPOx-PLA and 2295% for PiPOx-PCL) (Fig. S5A in ESI†). Importantly, by absorbing large amounts of water up to the equilibrium concentration, these spongy samples undergo a simultaneous increase in volume without losing stability, resulting in the formation of durable superabsorbent hydrogels.³⁶ Hydrogels’ ability to maintain a given shape (additionally illustrated in a video in the ESI†) is further demonstrated in Fig. 4B, which shows squeezed sponges before swelling and their excellent recovery to stable forms after swelling.

It should be noted that this is quite a remarkable observation because the material being analysed consists of approximate concentrations of 91% water and 9% polymer. The material’s ability to hold a large amount of aqueous solution is the result of its three-dimensional structure, the presence of hydrophilic PiPOx blocks and the occurrence of pores (*i.e.*, void space in the material).

Determining the porosity of hydrogels is difficult due to their specific properties, such as their high water content.

Therefore, typical methods used to measure the porosity of hard porous materials (such as mercury porosimetry or gas adsorption) are rather ineffective at assessing the porosity of hydrogels because the network structure of dried and pressure-compressed samples is significantly distorted.³⁷ With this in mind, we performed an analysis of dried porous networks to gain rough insight into the structure of the obtained material. First, the nature of the pores was studied by SEM. The cross-sectional morphologies of the dried PiPOx-PCL and PiPOx-PLA networks obtained in the presence of salt A and B are shown in Fig. S2 in ESI.† The SEM technique could not be used to analyse the networks obtained with salt C due to the large pore size, so digital photos are presented for illustration. Presented images clearly show that the porosity of materials can be controlled by changing the size of the salt particles used as porogen. The size of the pores was evaluated using SEM image analysis. It was found that the networks formed in the presence of salt A, show pores much smaller than networks formed in the presence of salt B: with sizes of approximately 109 μm (PiPOx-PLA) and 127 μm (PiPOx-PCL), respectively. The PiPOx-PLA networks

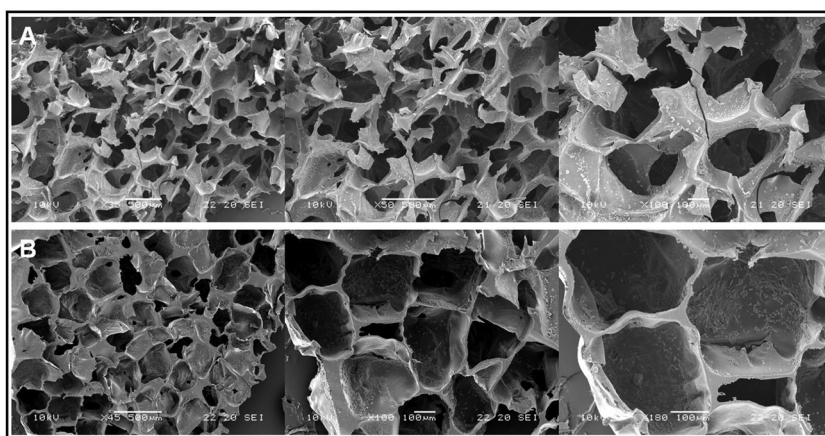


Fig. 5 SEM images of the porous PiPOx-PLA network (A) and the PiPOx-PCL network (B) obtained with NaCl powder (salt B), showing the morphology of the samples after salt leaching (dry samples).

Table 1 Parameters of the porous structure: specific surface area (S_{BET}), single point adsorption (sp), and total pore volume V_{tot} of pores at $p/p_0 = 0.3$ for krypton adsorption

Material	Adsorption parameters		
	$S_{\text{BETsp0.3N}_2}$ ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	S_{BETKr} ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	$V_{\text{tot0.3Kr}}$ ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)
PiPOx-PLA (non-porous)	0.06	0.01	0.000002
PiPOx-PLA salt "B"	0.15	0.14	0.000040
PiPOx-PLA salt "A"	0.32	0.22	0.000074
PiPOx-PCL (non-porous)	n.d.	n.d.	n.d.
PiPOx-PCL salt "B"	0.01	0.03	0.000005
PiPOx-PCL salt "A"	0.02	0.04	0.000009

formed in the presence of salt B exhibited a highly porous structure with an open, interconnected geometry (Fig. 5A). The PiPOx-PCL networks exhibited a less interconnected morphology than did the PLA networks, but they exhibited more regular cubic pores (Fig. 5B).

Connections between pores may be important for many applications, particularly for cell loading in tissue engineering and cell ingrowth in tissue induction. The PiPOx-PLA networks had a slightly larger average pore size (490 μm) than the PiPOx-PCL networks (351 μm). This pore size (> 300 μm), according to the literature, is recommended for biomedical scaffolds designed to meet the specificity of bone repair needs.³⁸

Furthermore, we analysed the specific surface area (S_{BET}) of the obtained porous networks based on the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method.³⁹ Nonporous networks were also examined to compare network properties. A single-point measurement of the specific surface area (S_{BETsp}) carried out using traditional nitrogen gas showed that the materials had surface areas of less than $0.5 \text{ m}^2 \text{g}^{-1}$ (Table 1). Measuring samples with this surface area using nitrogen volume adsorption experiments is limited by the detection limit. In such cases, the recommended alternative is the adsorption of krypton at liquid nitrogen temperature.⁴⁰ The results revealed that in the case of PiPOx-PLA networks prepared in the presence of porogens, the specific surface areas were considerably greater than those of nonporous networks. The value of this parameter increased as the size of the NaCl crystals used for modification decreased.

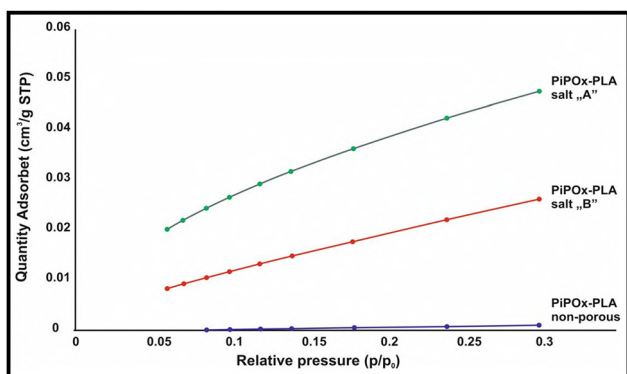


Fig. 6 Krypton adsorption isotherms for PiPOx-PLA nonporous networks and porous networks prepared with salt B and with salt A.

This tendency was also observed when examining the amount of adsorbed gas (Fig. 6).

In the case of the PiPOx-PCL network, BET analysis did not provide clear results (Fig. S7 in ESI†). It can be speculated that in this case, due to the more closed structure of the pores or their susceptibility to collapse during drying, this type of research does not reflect the original morphology of the network.

Mechanical properties

The mechanical properties of synthetic hydrogels are affected by many factors, including the topology of the network, the nature of the network nodes, and the crosslink density.⁴¹ In the case of biomedical applications, where the main role is mimicking natural tissues, the required parameters strongly depend on the planned functions.⁴² For example, for use in regenerative medicine, the elastic moduli of various hydrogels are in the range of 0.18–1000 kPa.⁴³

The studied PiPOx-polyester porous hydrogels were examined according to their mechanical properties in the “wet state”. However, “dry” behaviour is also important to the user, and the analysis was performed for samples after water removal. The compression experiments using a mini mechanical tester showed that the examined PiPOx-PLA and PiPOx-PCL swollen samples were very soft, but after drying, they became harder and more brittle. During compression, a gradual release of water from the tested hydrated samples was observed. Fig. 7 shows the stress-compression ratio relationship for the studied materials.

Fig. 7a shows that initially, a very small force was required for the compression of the PiPOx-PLA specimen. The force and stress started to increase when the sample thickness was decreased by half, *i.e.*, the degree of compression exceeded 2. The experiment was stopped at a high compression ratio, close to 9. The measured stress was then 25 kPa. Fig. 7a shows the also the properties of the second material tested, *i.e.*, the PiPOx-PCL hydrogel. The nature of the dependence was similar to that for PLA, but the stress increased, as lower compression and higher values of stress were recorded for the same compression. The measured stress was 50 kPa when the compression ratio was 9. Thus, the results indicate that the swollen hydrogels can be compressed to 9 times their original height without failure. These findings are consistent with the behaviour observed under manual compression, as shown in Movie 1 (ESI†).

When dried, the PiPOx-PLA material showed different properties (Fig. 7b). First, a much greater force must be applied to obtain the desired compression, *e.g.*, when the thickness of the sample is reduced by half, the stress must increase by two orders of magnitude. Initially, the stress changed linearly with compression, but at a compression ratio of 1.2, the dependence ceased to be linear. After the compression ratio of 2 was exceeded, local cracking of the sample started, which is visible in the graph as “saw teeth”. A rough estimate of the modulus of elasticity for a porous, dry PLA sample is approximately 800 kPa, while for a wet PLA sample, it is only 5 kPa. A similar

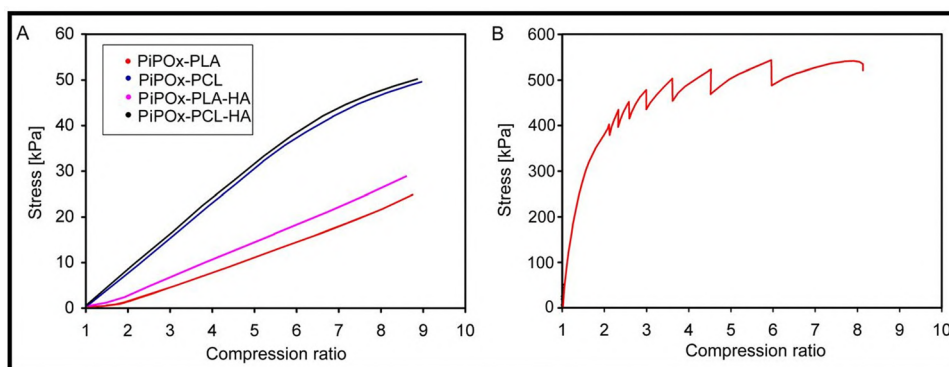


Fig. 7 Stress as a function of the compression ratios calculated for the water swollen PiPOx-PLA, PiPOx-PCL, PiPOx-PLA-HA, PiPOx-PCL-HA samples (A) and the PiPOx-PLA dry sample (B).

measurement was not performed for dry PCL because less regular shapes of the samples were obtained after drying.

Stress relaxation is another important mechanical property of hydrogels. Fig. 8 shows the decreases in stress in the PiPOx-PCL and PiPOx-PLA samples compressed to a CR = 8 with time after compression. The measured stresses were normalized to the stress value at the moment of stopping the compression process. The stress relaxation in both materials was most intense in the first 60 seconds. In the case of the networks crosslinked with PLA, the decrease at the end of the observation, *i.e.*, after 5 min, was significant, and the final stress was 0.65 of the initial stress, which still slowly decreased. However, in networks with PCL crosslinking, the stress did not change much, only up to 0.95 of the initial value. The above-described observations indicate that during compression, the PiPOx-PCL network offers more resistance and allows less stress relaxation when it is in a highly compressed state.

The mini tester did not provide a good opportunity to analyse the return of the compressed samples to their original shape because the machine action was too slow. Therefore, the proper experiment was performed using an Instron Model 5582 universal machine. The cylindrical samples were compressed to compression ratios of 2, 4, 6 and 8. The samples were compressed at two different rates, 5 min^{-1} and 50 min^{-1} . After obtaining the desired compression ratio, the load was released within 1–2 seconds, allowing the sample to recover its shape. During compression, the release of small amounts of water was observed. In all tested samples, despite the loss of water during compression, significant relaxation was observed, and to a large extent, the original shape was reconstructed. Fig. 9 shows the changes in shape of the exemplary PiPOx-PCL sample before the test, in the compressed state, and after the recovery of shape.

Fig. 10 shows a comparison of sample heights measured before and after the quick release of applied compression.

The reconstruction of the shape by the sample after the release of the applied force was fast, and after a few seconds, further shape changes were insignificant. The final thickness of the sample depended on the degree of compression and rate of applied deformation. After the experiment with highest

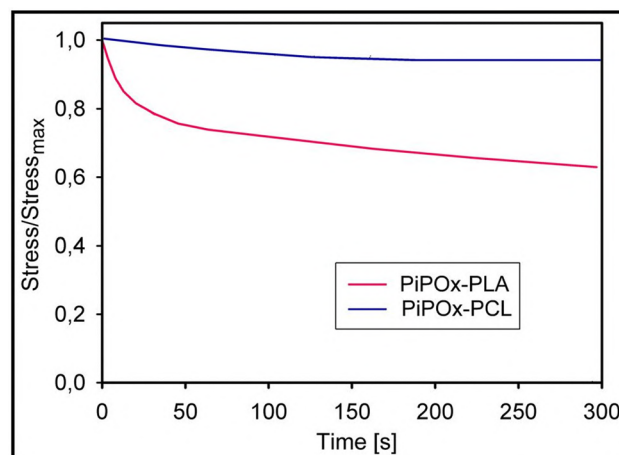


Fig. 8 Relaxation of stresses in samples compressed to a ratio of CR = 8.

compression, the thicknesses of the samples, H_{R_1} , were 0.80 of the initial thickness for PiPOx-PLA and 0.96 for PiPOx-PCL. When the compression rate was increased from 5 to 50 min^{-1} , the recovery capacity was even greater, reaching H_{R_1}/H_0 ratios of 0.98 and 0.99, respectively, when the sample was compressed eight times. These results indicate that some irreversible changes in the macromolecular network occur, especially in PLA, with a longer experiment time, such as in the case of a slower compression at a rate of 5 min^{-1} . These changes were also responsible for the previously observed more intense relaxation in the PiPOx-PLA networks (see Fig. 8).

Both porous networks were also tested *via* tensile testing, *i.e.*, during uniaxial stretching using a Linkam mini-tensile tester. The mechanical properties during stretching may not be fully consistent with the results obtained during compression because other deformation mechanisms, such as cavitation, may reveal themselves, modifying the stress distribution. Fig. 11 shows the stress-strain relationship for exemplary samples of PiPOx-PLA and PiPOx-PCL. Contrary to compression, low amounts of water were released from the samples during tensile deformation. The reason is that the volume of the sample increases during deformation and the “holes” are

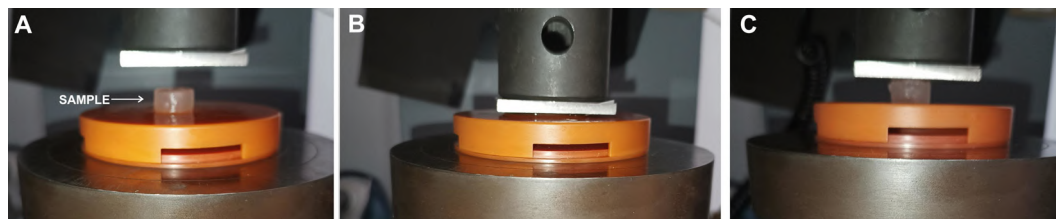


Fig. 9 The compression experiment of the PiPOx–PCL sample was performed with an Instron machine at a rate of $5\% \text{ min}^{-1}$: (A) sample before the test, (B) sample compressed to CR = 8, and (C) sample after shape recovery.

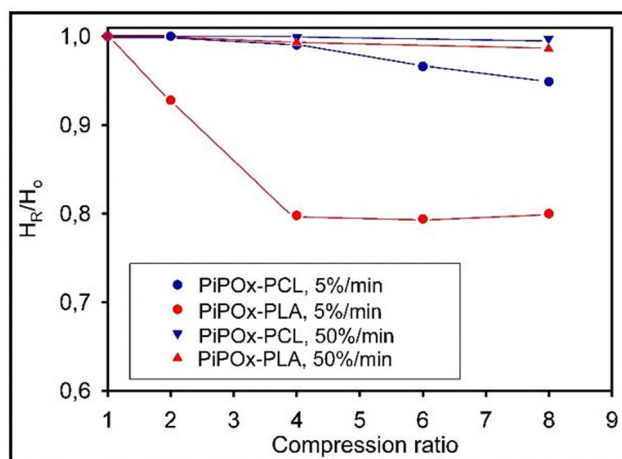


Fig. 10 Ratios of the final thicknesses of the PiPOx–PLA and PiPOx–PCL samples after release of compression (H_R) to the initial thickness (H_0) measured for samples of both materials compressed to the selected compression ratios with two different compression rates.

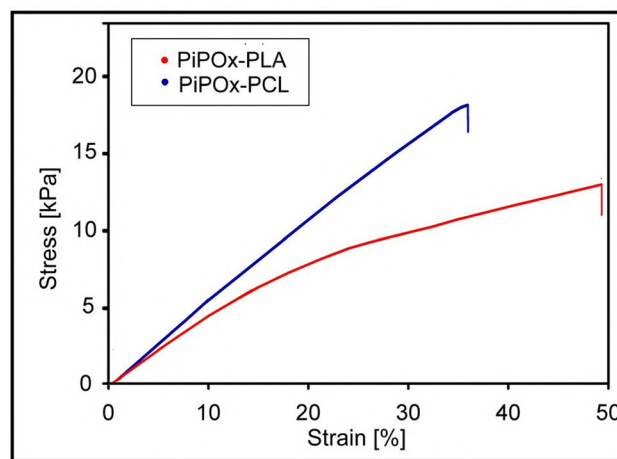


Fig. 11 Strain–stress relationship for hydrogels obtained during tensile deformation.

formed in its volume, which allows most of the water to be retained inside the sample.

Stretching a PiPOx–PCL gel requires more force than stretching a PiPOx–PLA gel. The samples deformed uniformly, without necking, and the mean levels of strain at break were 35% for PiPOx–PCL and 49% for PiPOx–PLA. The modulus of elasticity of PLA measured during the tensile experiment was 60 kPa; for PCL under similar conditions, it was 70 kPa. These values, although not high in general, are greater than those when the materials are compressed. This is probably because during compression, the rejection of water made the movement of macromolecular fragments possible, and the necessary force was not very high. In contrast, during the tensile test, the stretching of the network of macromolecules requires a greater applied force.

Based on the results, it can be concluded that the mechanical properties of the obtained hydrogels were satisfactory and may enable practical use of the materials, including the formulation of scaffolds for tissue engineering purposes.

Fabrication of PiPOx–PLA and PiPOx–PCL porous networks with hydroxyapatite particles (PiPOx–PLA–HA and PiPOx–PCL–HA)

To prepare hydrogels suitable for cell culture, hydroxyapatite (10 w%) was also introduced into the networks as an

osteoconductive (hydrophilic) component.⁴⁴ The composite materials with porous morphologies containing HA particles embedded in the polymer network structure were analysed *via* SEM, IR and TGA.

Fig. 12 shows a fragment of the PiPOx–PLA and PiPOx–PCL porous networks with HA particles observed by SEM. EDS examination of the crystals confirmed the presence of hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) as peaks from corresponding elements (Ca, P and O) are observed in the spectrum.

The characteristic bands of hydroxyapatite were also clearly visible in the FTIR spectrum of the composite material (Fig. S3, ESI†).⁴⁵ TGA (Fig. S7, ESI†) also showed that the networks produced with hydroxyapatite contained approximately 10% permanent residue, indicating that composite hydrogels containing the required biomineral were successfully prepared.

The properties of hydrogels after the introduction of hydroxyapatite were also examined. Typical stress–compression relationships for PiPOx–PLA–HA and PiPOx–PCL–HA are shown in Fig. 7a. The introduction of the filler strengthened the tested networks and therefore led to an increase in the measured stresses. The effect was more visible in the PiPOx–PLA sample, which was more easily compressed without a filler than PiPOx–PCL. Hydroxyapatite, which is more difficult to deform than polymers, proportionally increased the stresses in the more easily deformed one, *i.e.* in PiPOx–PLA–HA. Hydrogels containing HA showed a high ability to retain water in their structures (ESD

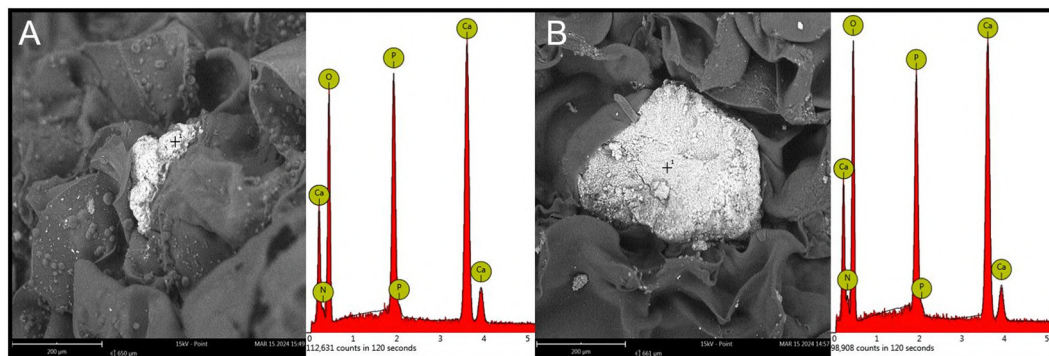


Fig. 12 SEM images of porous PiPOx-PLA (A) and PiPOx-PCL (B) networks with HA particles and their corresponding EDS analysis.

= 2053% for PiPOx-PLA-HA and ESD = 2085% for PiPOx-PCL-HA, Fig. S5B in ESI†) what is crucial for the proposed application.

Evaluation of the biocompatibility of the PiPOx-PLA-HA and PiPOx-PCL-HA hydrogels against hFOB 1.19 osteoblasts

Generally, hydrogels with desirable properties, such as low porosity, high water sorption capacity, and strong mechanical properties, are well suited for tissue engineering, promoting cell adhesion and the formation of new bone tissue. To ensure that the porous hydrogels we obtained would not be harmful to eukaryotic cells, the first step was to determine cell viability/metabolic activity. A test was conducted based on specific *in vitro* cytocompatibility criteria (ISO 10993-5:2009); however, the study utilized human hFOB 1.19 osteoblasts.

The MTT reduction test measures mitochondrial dehydrogenase activity in cells, with 70% of metabolically active cells being at the lower acceptable safety limit for test formulations

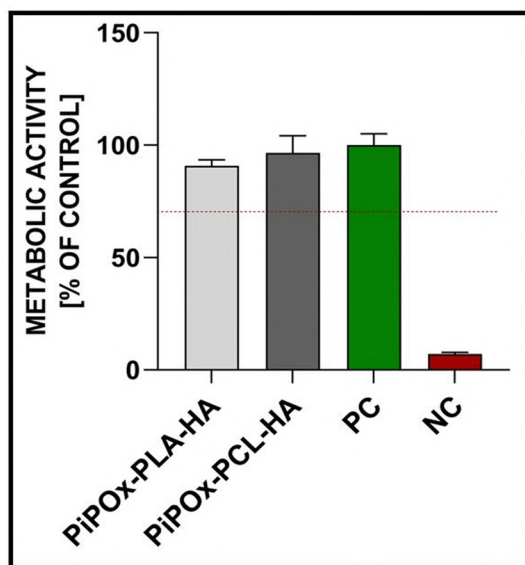


Fig. 13 Biocompatibility of the tested hydrogels towards hFOB 1.19 human osteoblasts. Complete culture medium was used as a positive control (PC) (100% viable cells), and 0.03% H_2O_2 as a negative control (NC) (100% dead/metabolically inactive cells). The results are presented as the mean values $\pm$ SDs.

against eukaryotic cells. PiPOx-PLA-HA and PiPOx-PCL-HA biomaterials were found to be biosafe for hFOB 1.19 human osteoblasts, with cell viabilities of $96 \pm 3\%$ when cocultured (Fig. 13).

Colonization of porous PiPOx-PLA-HA and PiPOx-PCL-HA hydrogels by human osteoblasts

To assess the potential of the porous PiPOx-PLA-HA and PiPOx-PCL-HA hydrogels to support the growth of bone cells, we conducted coculturing experiments with human hFOB 1.19 cells over 7, 14, and 21 days. We evaluated the adhesion of hFOB.1.19 cells to the surface at each time point (*via* SEM) and measured the number of cells over time (cell proliferation assay).

Fig. 14B illustrates a significant increase in the number of hFOB 1.19 osteoblasts cultured on the PiPOx-PLA-HA hydrogel after 14 days, with no further changes observed after 21 days. Moreover, SEM observation of the cells growing on the PiPOx-PLA-HA hydrogel (Fig. 14A) revealed that the cells populated the pores of the composite but did not show a morphologically typical appearance (*i.e.*, spindle-like cells).

On the other hand, the hFOB 1.19 cells cultured with the PiPOx-PCL-HA hydrogel displayed a typical spindle-shaped appearance (Fig. 15A). Interestingly, the number of cells significantly increased in the presence of the PiPOx-PCL-H test material; thus, after 21 days of coculture with the test material, the number of cells present was three times greater than that in the culture on day 7th (Fig. 15B).

Upon comparison of the PiPOx-PLA-HA and PiPOx-PCL-HA networks, it was observed that both types of hydrogels exhibited complete biocompatibility with bone cells at an *in vitro* level. Both networks facilitated the colonization and adhesion of bone cells. However, only the PiPOx-PCL-HA hydrogels promoted the growth of osteoblasts with a typical elongated shape.

Conclusions

In summary, we have demonstrated that porous PiPOx-polyester hydrogels can be efficiently fabricated using a straightforward and robust salt-leaching procedure. The resulting biocompatible materials exhibited porosity ranging from

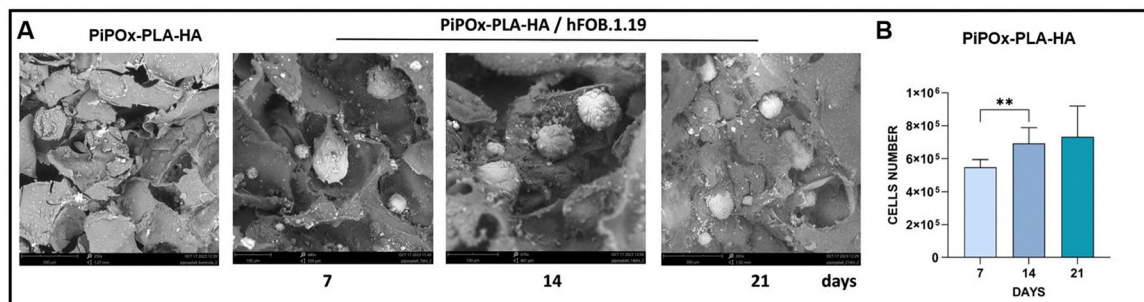


Fig. 14 Colonization of porous PiPOx-PLA-HA hydrogels by hFOB 1.19 human osteoblasts after 7, 14, and 21 days of culture. (A) Representative images of FOB 1.19 cells visualized by SEM. (B) Proliferation of hFOB 1.19 osteoblasts after 7, 14, and 21 h of incubation with PiPOx-PLA-HA. The results are presented as the mean values $\pm$ SDs. Statistical analysis was performed using the Brown-Forsythe and Welch ANOVA tests following Dunnett's T3 multiple comparisons test; $**p = 0.0021$.

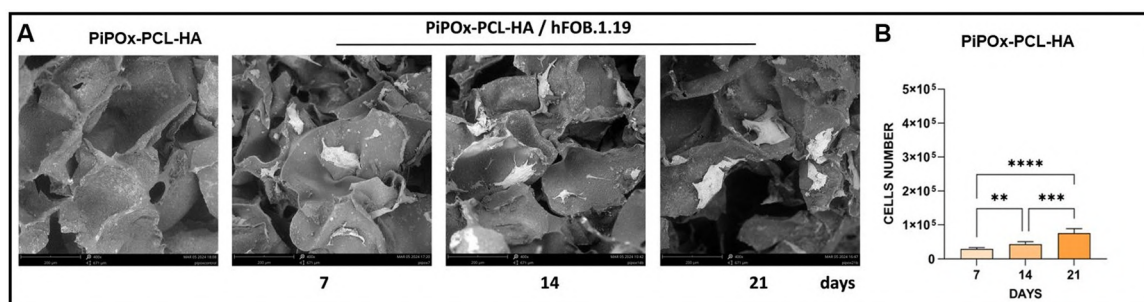


Fig. 15 Colonization of porous PiPOx-PCL-HA hydrogels by human hFOB 1.19 osteoblasts after 7, 14, and 21 days of culture. (A) Representative images of FOB 1.19 cells visualized by SEM. (B) Proliferation of hFOB 1.19 osteoblasts after 7, 14, and 21 days of incubation with PiPOx-PCL-HA. The results are presented as the mean values $\pm$ SDs. Statistical analysis was performed using the Brown-Forsythe and Welch ANOVA tests following Dunnett's T3 multiple comparisons test; $**p = 0.0021$, $***p = 0.0002$, $****p < 0.0001$.

110 μm to 490 μm , determined by the porogen particle size used during synthesis. Due to their carefully chosen composition, these porous networks could absorb significant amounts of water, showing equilibrium swelling degrees of approximately 2130% for PiPOx-PLA and 2222% for PiPOx-PCL. The methodology used enabled the production of durable hydrogels with good mechanical properties, characterized by an elastic modulus of 60 kPa for the PiPOx-PLA network and 70 kPa for the PiPOx-PCL network. Our findings indicate that studied hydrogels can serve as artificial matrices, effectively mimicking scaffolds to support cell growth.

Author contributions

M. Basko: conceptualization, writing – original draft preparation, supervising, funding acquisition; B. Kost: writing, methodology; B. Kopka: investigation, characterization, results visualization; A. Pawlak: mechanical properties characterization; I. Bąk-Sypień: porosity analysis; M. Brzeziński: SEM analysis; A. Tomaszewska: biological studies; A. Krupa: biological studies supervising, writing; P. Józwiak: SEM analysis. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data availability

The data supporting this article have been included as part of the ESI.†

Conflicts of interest

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgements

Financial support from the National Science Centre, Poland, Grant No. 2020/37/B/ST5/03302 is gratefully acknowledged. The purchase of Avance Neo 400 NMR spectrometer and TGA Discovery 5500 apparatus, used to obtain results included in this publication, was supported by funds from the EU Regional Operational Program of the Lodz Region, RPLD.01.01.00-10-0008/18.

References

- Y. Gu, J. Zhao and J. A. Johnson, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2020, **59**, 5022–5049.
- C. S. Patrickios, *Macromol. Symp.*, 2010, **291–292**, 1–11.

- 3 D. W. Bruce, D. O'Hare and R. I. Walton, *Porous Materials*, Springer, New York, NY, 2010.
- 4 M. V. Dinu and E. S. Dragan, in *Hydrogels. Gels Horizons: From Science to Smart Materials*, ed. V. K. Thakur, 2018, pp. 51–85.
- 5 N. Abbasi, S. Hamlet, R. M. Love and N. T. Nguyen, *J. Sci. Adv. Mater. Devices*, 2020, **5**, 1–9.
- 6 G. Erdodi and J. P. Kennedy, *Prog. Polym. Sci.*, 2006, **31**, 1–18.
- 7 S. J. Buwalda, K. W. M. Boere, P. J. Dijkstra, J. Feijen, T. Vermonden and W. E. Hennink, *J. Controlled Release*, 2014, **190**, 254–273.
- 8 C. S. Patrickios and K. Matyjaszewski, *Polym. Int.*, 2021, **70**, 10–13.
- 9 N. Bayliss and B. V. K. J. Schmidt, *Prog. Polym. Sci.*, 2023, **147**, 101753.
- 10 T. R. Dargaville, J. R. Park and R. Hoogenboom, *Macromol. Biosci.*, 2018, **18**, 1–15.
- 11 V. G. Muir and J. A. Burdick, *Chem. Rev.*, 2021, **121**, 10908–10949.
- 12 Z. Kroneková, M. Mikulec, N. Petrenčíková, E. Paulovičová, L. Paulovičová, V. Jančinová, R. Nosál', P. S. Reddy, G. D. Shimoga, D. Chorvát and J. Kronek, *Macromol. Biosci.*, 2016, **16**, 1200–1211.
- 13 E. Paulovičová, Z. Kroneková, L. Paulovičová, M. Majerčíková and J. Kronek, *Materials*, 2021, **14**, 1371.
- 14 F. A. Jerca, V. V. Jerca and R. Hoogenboom, *Biomacromolecules*, 2021, **22**, 5020–5032.
- 15 M. Cegłowski, V. V. Jerca, F. A. Jerca and R. Hoogenboom, *Pharmaceutics*, 2020, **12**(6), 506.
- 16 B. Kopka, B. Kost and M. Basko, *Polym. Chem.*, 2022, **13**, 4736–4746.
- 17 C. Weber, T. Neuwirth, K. Kempe, B. Ozkahraman, E. Tamahkar, H. Mert, C. R. Becer and U. S. Schubert, *Macromolecules*, 2012, **45**, 20–27.
- 18 V. V. Jerca, F. A. Nicolescu, A. Baran, D. F. Anghel, D. S. Vasilescu and D. M. Vuluga, *React. Funct. Polym.*, 2010, **70**, 827–835.
- 19 M. C. Spiridon, F. A. Jerca, V. V. Jerca, D. S. Vasilescu and D. M. Vuluga, *Eur. Polym. J.*, 2013, **49**, 452–463.
- 20 F. A. Jerca, C. Muntean, K. Remaut, V. V. Jerca, K. Raemdonck and R. Hoogenboom, *J. Controlled Release*, 2023, **364**, 687–699.
- 21 R. Merckx, J. Becelaere, E. Schoolaert, O. Frateur, M. N. Leiske, D. Peeters, F. A. Jerca, V. V. Jerca, K. De Clerck and R. Hoogenboom, *Chem. Mater.*, 2023, **35**, 7079–7093.
- 22 Z. Kroneková, M. Majerčíková, E. Paulovičová, A. Minarčíková, M. Danko, J. Markus, S. Letasiova and J. Kronek, *Biomacromolecules*, 2024, **25**, 3288–3301.
- 23 F. A. Jerca, A. M. Anghelache, E. Ghibu, S. Cecoltan, I. C. Stancu, R. Trusca, E. Vasile, M. Teodorescu, D. M. Vuluga, R. Hoogenboom and V. V. Jerca, *Chem. Mater.*, 2018, **30**, 7938–7949.
- 24 X. Xu, F. A. Jerca, K. Van Hecke, V. V. Jerca and R. Hoogenboom, *Mater. Horiz.*, 2020, **7**, 566–573.
- 25 X. Xu, F. A. Jerca, V. V. Jerca and R. Hoogenboom, *Macromolecules*, 2020, **53**, 6566–6575.
- 26 X. Xu, F. A. Jerca, V. V. Jerca and R. Hoogenboom, *Adv. Funct. Mater.*, 2019, **29**, 1–10.
- 27 B. Kopka, B. Kost, K. Rajkowska, A. Pawlak, A. Kunicka-Styczyńska, T. Biela and M. Basko, *Soft Matter*, 2021, **17**, 10683–10695.
- 28 M. J. Joralemon, S. McRae and T. Emrick, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 1377–1393.
- 29 B. Kopka, B. Kost, A. Pawlak, A. Tomaszewska, A. Krupa and M. Basko, *Soft Matter*, 2023, **19**, 6987–6999.
- 30 M. Biernat, A. Szwed-Georgiou, K. Rudnicka, P. Płociński, J. Pagacz, P. Tymowicz-Grzyb, A. Woźniak, M. Włodarczyk, M. M. Urbaniak, A. Krupa, P. Rusek-Wala, N. Karska and S. Rodziewicz-Motowidło, *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, **23**(22), 14315.
- 31 A. Kurzyk, A. Szwed-Georgiou, J. Pagacz, A. Antosik, P. Tymowicz-Grzyb, A. Gerle, P. Szterner, M. Włodarczyk, P. Płociński, M. M. Urbaniak, K. Rudnicka and M. Biernat, *Sci. Rep.*, 2023, **13**, 1–17.
- 32 G. Duan, A. R. Bagheri, S. Jiang, J. Golenser, S. Agarwal and A. Greiner, *Biomacromolecules*, 2017, **18**, 3215–3221.
- 33 R. B. Diego, J. L. G. Ribelles and M. S. Sánchez, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2007, **104**, 1475–1481.
- 34 M. Maciejewska, *Materials*, 2024, **17**, 2860.
- 35 C. D. Spicer, *Polym. Chem.*, 2020, **11**, 184–219.
- 36 F. Damiri, S. Salave, J. Vitore, Y. Bachra, R. Jadhav, N. Kommineni, F. Karouach, A. C. Paiva-Santos, R. S. Varma and M. Berrada, *Properties and valuable applications of superabsorbent polymers: a comprehensive review*, Springer Berlin Heidelberg, 2023.
- 37 M. J. Majcher and T. Hoare, in *Functional Biopolymers*, ed. M. A. Jafar Mazumder, H. Sheardown and A. Al-Ahmed, Springer International Publishing, Cham, 2019, pp. 429–490.
- 38 V. Karageorgiou and D. Kaplan, *Biomaterials*, 2005, **26**, 5474–5491.
- 39 S. Brunauer, P. H. Emmett and E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.*, 1938, **60**, 309–319.
- 40 S. Lowell, J. E. Shields, M. A. Thomas and M. Thommes, *Characterization of Porous Solids and Powders: Surface Area, Pore Size and Density*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2004, vol. 16.
- 41 W. A. Laftah, S. Hashim and A. N. Ibrahim, *Polym. - Plast. Technol. Eng.*, 2011, **50**, 1475–1486.
- 42 Y. Ma, X. Wang, T. Su, F. Lu, Q. Chang and J. Gao, *Gels*, 2022, **8**(10), 606.
- 43 C. D. Markert, X. Guo, A. Skardal, Z. Wang, S. Bharadwaj, Y. Zhang, K. Bonin and M. Guthold, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 2013, **27**, 115–127.
- 44 C. Durucan and P. W. Brown, *Adv. Eng. Mater.*, 2001, **3**, 227–231.
- 45 A. Haider, S. Haider, S. S. Han and I. K. Kang, *RSC Adv.*, 2017, **7**, 7442–7458.

Supporting information

Biocompatible, porous hydrogels composed of aliphatic polyesters and poly(2-isopropenyl-2-oxazoline). Their application as scaffolds for bone tissue regeneration.

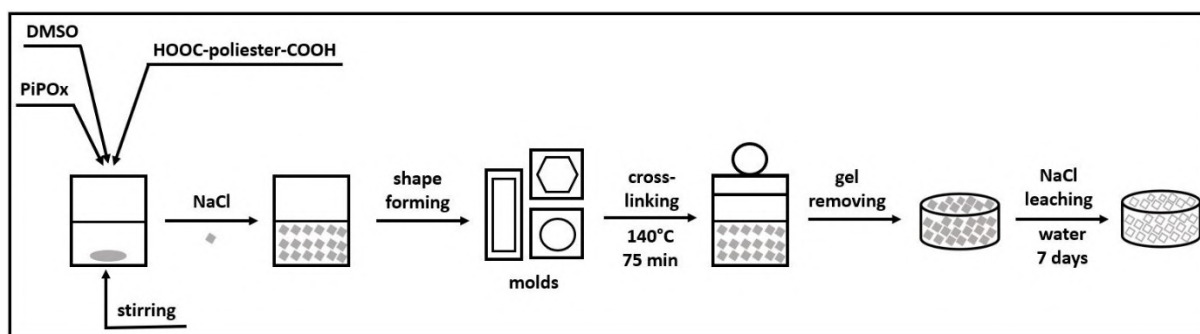
Bartosz Kopka, Bartłomiej Kost, Andrzej Pawlak, Irena Bąk-Sypień, Marek Brzeziński, Agata Tomaszewska, Agnieszka Krupa, Piotr Józwiak, Malgorzata Basko*

Movie 1.	1
Scheme S1. Preparation of porous PiPOx-polyester networks using the NaCl leaching technique.	2
Figure S1. NaCl crystals used as a porogen in the preparation of porous PiPOx-polyester networks: A) 50-150 μm (SEM picture), B) 270-560 μm (SEM picture), C) 3.2-6.2 mm (digital picture).	2
Table S1. Fabrication of porous PiPOx-polyester networks in the presence of NaCl crystals.	2
Figure S2. SEM images of PiPOx-polyester networks: non-porous (bulky) and porous obtained in the presence of porogen: "A" and "B". Digital pictures of PiPOx-polyester networks prepared in the presence of porogen C.	3
Figure S3. ATR FT-IR spectra of porous networks (dry state) obtained from PiPOx using HOOC-PLA ₃₀₀₀ -COOH and HOOC-PCL ₃₀₀₀ -COOH as crosslinker.	4
Figure S4. ¹³ C-CP/MAS spectra of porous networks (dry state) obtained from HOOC-PLA ₃₀₀₀ -COOH and HOOC-PCL ₃₀₀₀ -COOH as PiPOx crosslinker.	4
Figure S5. Swelling of porous PiPOx-PCL and PiPOx-PLA networks in water, A) networks obtained with salt A, B) networks obtained with salt B and hydroxyapatite.	5
Figure S6. TGA analysis of PiPOx-PLA and PiPOx-PCL porous networks with hydroxyapatite particles.	5
Figure S7. Krypton adsorption isotherms for porous PiPOx-PCL networks prepared with salt "A" and "B".	6

Movie 1.



Movie 1.mp4



Scheme S1. Preparation of porous PiPOx-polyester networks using the NaCl leaching technique.

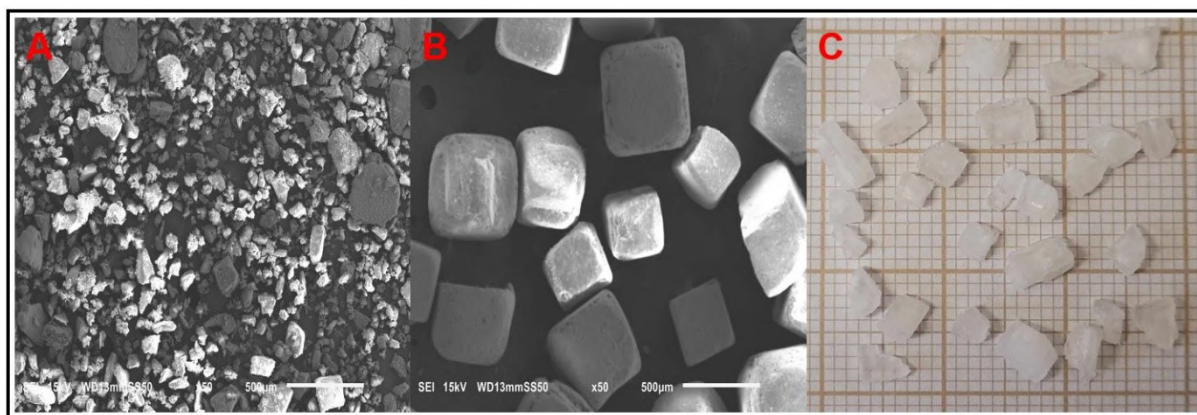


Figure S1. NaCl crystals used as a porogen in the preparation of porous PiPOx-polyester networks: A) 50-150 μm (SEM picture), B) 270-560 μm (SEM picture), C) 3.2-6.2 mm (digital picture).

Table S1. Fabrication of porous PiPOx-polyester networks in the presence of NaCl crystals.

Conditions: $T=140\text{ }^{\circ}\text{C}$, time= 75 min.

Network code	Polyester ^a (mg)	PiPOx ^b (mg)	DMSO (mL)	NaCl			Shape
				A [g]	B [g]	C [g]	
PiPOx-PLA	44	83	1.0	3	3	3	disc
	132	249	3.0	----	11	----	cylinder
PiPOx-PCL	44	83	1.0	3	3	3	disc
	132	249	3.0	----	11	----	cylinder

^a polyester: $M_n=3\,000\text{ g/mol}$, ^b PiPOx: $M_n=150\,000\text{ g/mol}$,

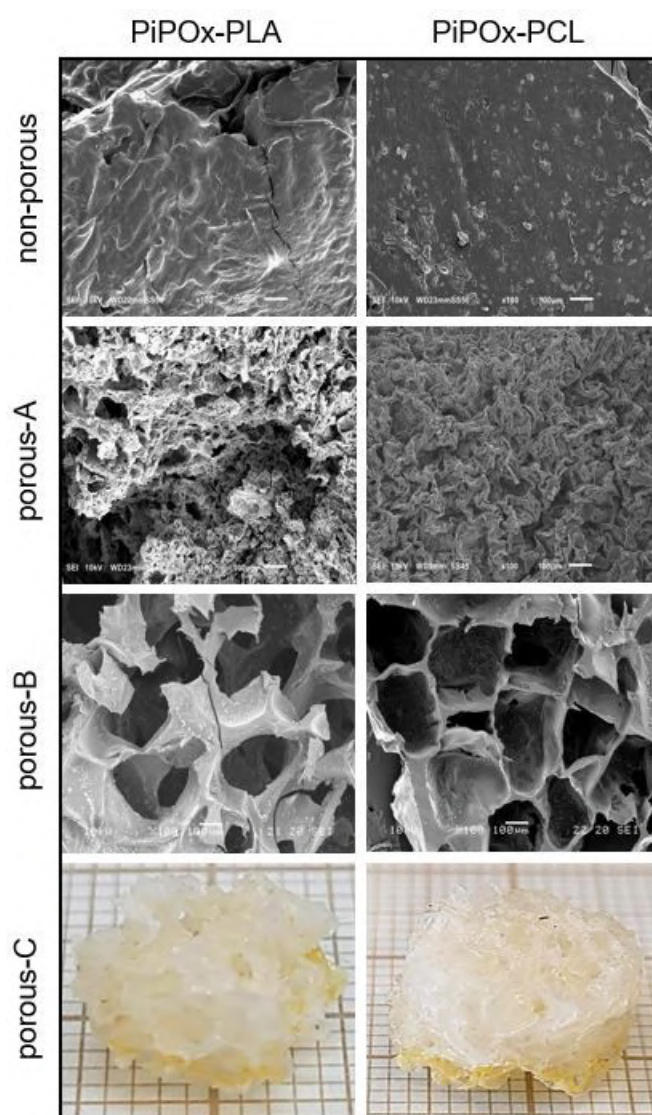


Figure S2. SEM images of PiPOx-polyester networks: non-porous (bulky) and porous obtained in the presence of porogen: “A” and “B”. Digital pictures of PiPOx-polyester networks prepared in the presence of porogen C.

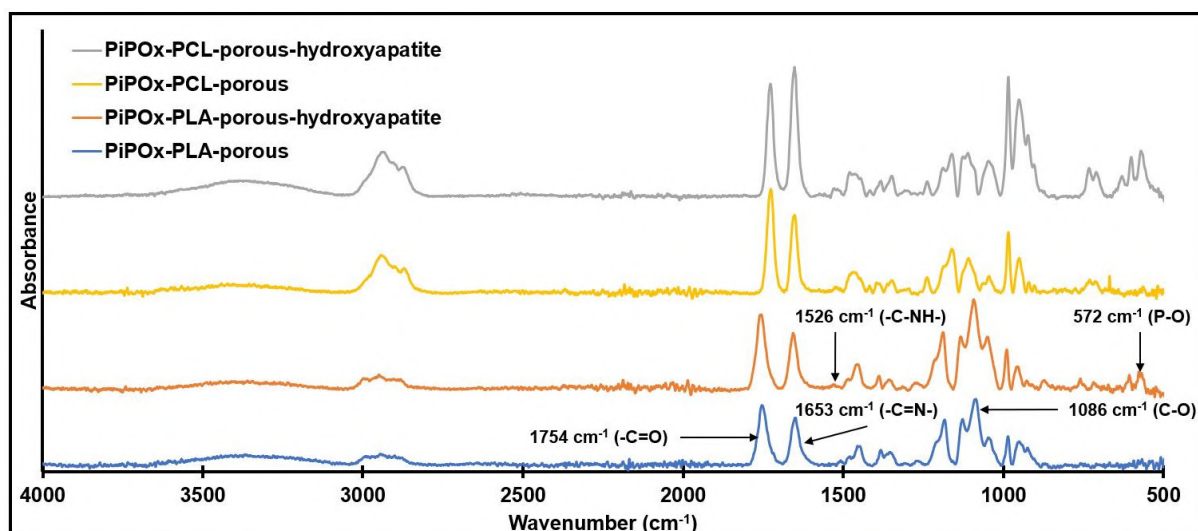


Figure S3. ATR FT-IR spectra of porous networks (dry state) obtained from PiPOx using HOOC-PLA₃₀₀₀-COOH and HOOC-PCL₃₀₀₀-COOH as crosslinker.

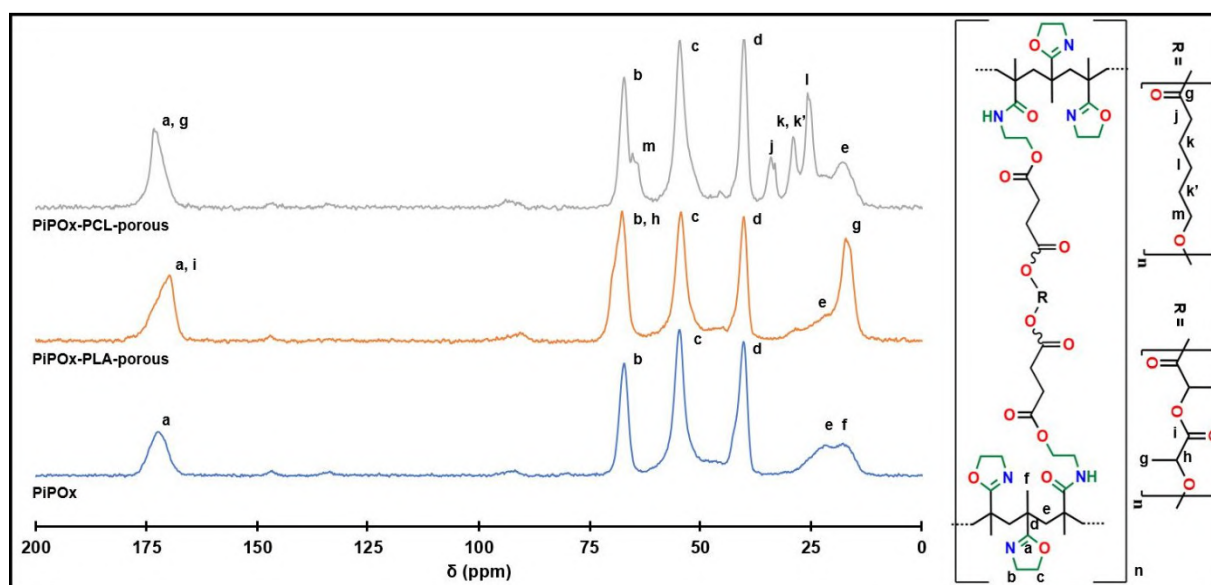


Figure S4. ¹³C-CP/MAS spectra of porous networks (dry state) obtained from HOOC-PLA₃₀₀₀-COOH and HOOC-PCL₃₀₀₀-COOH as PiPOx crosslinker.

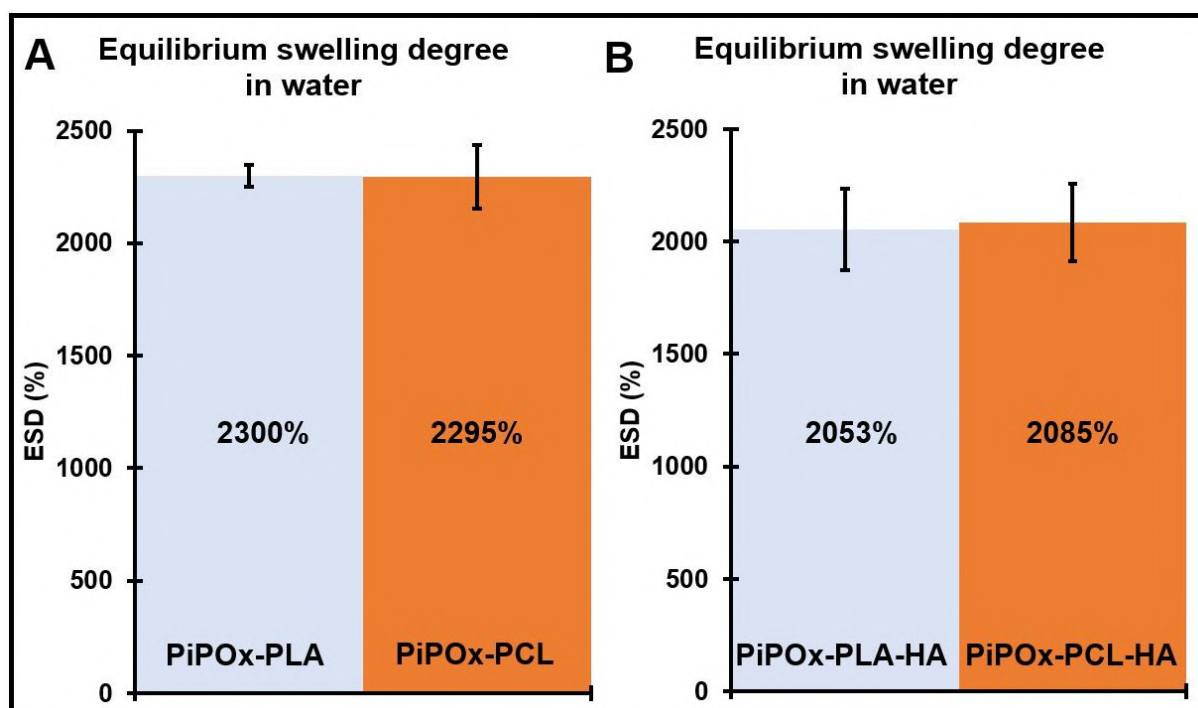


Figure S5. Swelling of porous PiPOx-PCL and PiPOx-PLA networks in water, A) networks obtained with salt A, B) networks obtained with salt B and hydroxyapatite.

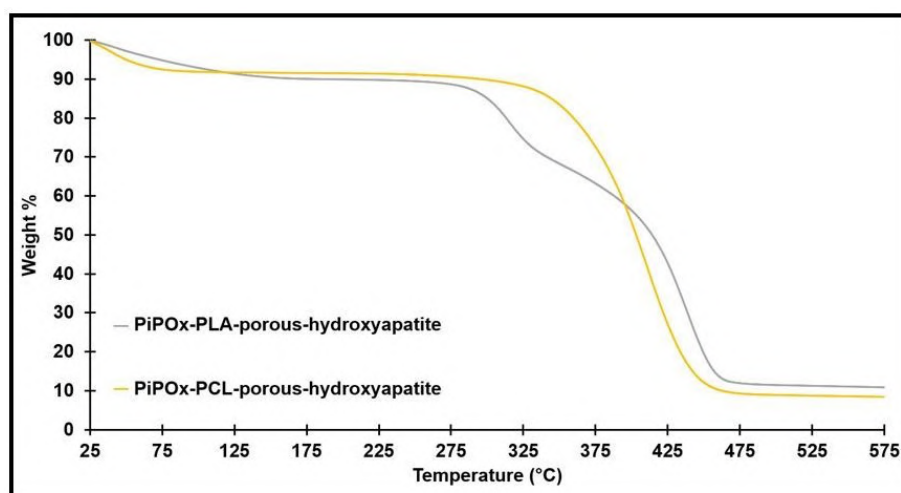


Figure S6. TGA analysis of PiPOx-PLA and PiPOx-PCL porous networks with hydroxyapatite particles.

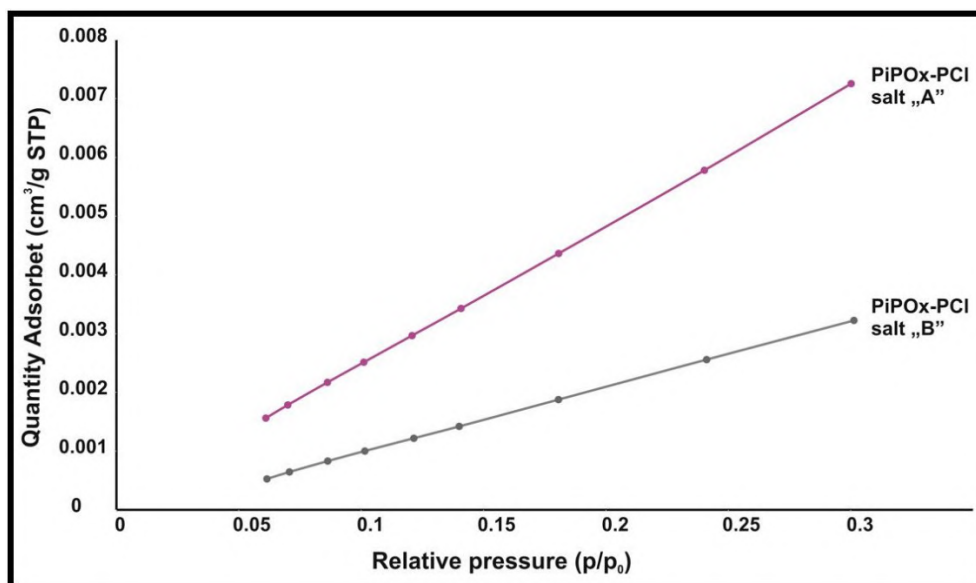


Figure S7. Krypton adsorption isotherms for porous PiPOx-PCL networks prepared with salt "A" and "B".

Publikacja 4:

Kopka B., Kost B., Basko M., Poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) as a reactive polymer for materials development, **Polymer Chemistry**, 2022, 13, 4736-4746.

MINIREVIEW

[View Article Online](#)
[View Journal](#) | [View Issue](#)

Cite this: *Polym. Chem.*, 2022, **13**, 4736

Poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) as a reactive polymer for materials development

Bartosz Kopka, Bartłomiej Kost* and Małgorzata Basko *

Poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) has attracted growing interest as a reactive polymer that can be used as a starting material for the construction of more complex structures containing macromolecular components as well as specific molecules or desired functional groups. The unique advantages of this polymer result from the presence of multiple reactive sites located in the side chains. Taking advantage of the highly effective ring-opening of the oxazoline pendant rings, the required modification can be achieved by a simple addition reaction. Additionally, poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) belongs to a class of biocompatible, water-soluble polymers, which makes it a valuable component of many innovative materials that can be obtained by post-polymerization modification methods. The presented mini-review briefly describes the synthetic routes leading to the preparation of a polymer with a carbon skeleton with preservation of the side oxazoline rings. Furthermore, chosen examples of post-polymerization modification allowing for the preparation of advanced materials are highlighted.

Received 23rd May 2022,
Accepted 21st July 2022

DOI: 10.1039/d2py00660j

rsc.li/polymers

1. Introduction

Polymers that contain reactive side-chain groups are very important in polymer chemistry because by modifying them, more complex structures can be easily obtained. By coupling reactions, macromolecules with accurate compositions or functional group placements can be prepared with structural control. Thus, post-polymerization modification methods that enable the transformation of the starting reactive precursors into structurally new polymers targeted to specific, high-value applications are widely used for complex material synthesis.^{1–3} The most well-known robust, efficient, and orthogonal reactions include the Cu-catalysed azide/alkyne cycloaddition, thiol-ene, oxime, Diels–Alder, and pyridyl disulfide reactions, as well as Michael addition and activated ester coupling.^{4–9} However, it should be noted that the auxiliary use of catalysts (in some cases toxic) during the modification process is necessary. In this regard, more eco-friendly methods based on improved syntheses using simple and highly efficient chemical reactions with reduced toxicity are in demand.^{10,11}

The purpose of this mini-review is to demonstrate the potential of poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) (PiPOx) as a hydrophilic, reactive polymer with side groups; this polymer further promotes effective post-polymerization modifications without introducing poisonous catalysts or byproducts into the system.

The polymer, which exhibits an interesting structure and properties, can be obtained by a polymerization that proceeds *via* the vinylic moiety of 2-isopropenyl-2-oxazoline (iPOx), which is a heterocyclic monomer from the 2-oxazolines group. In general, poly(2-oxazolines) have an established role in polymer chemistry due to the development of synthetic methods based on a living cationic ring-opening polymerization, which enable the synthesis of well-defined biocompatible polymers.^{12–14} As demonstrated, the variety of 2-oxazoline monomers allowed for diverse pendant groups to be introduced into the main chain and altered polymer properties by controlling the architecture of macromolecules.¹⁵ Thus, by simply varying the lengths of the *n*-alkyl side chains from methyl to nonyl, a significant change in the properties of the resulting poly(2-oxazoline)s from hydrophilic (methyl or ethyl) to hydrophobic can be achieved. The 2-isopropenyl derivative is a specific monomer that is utilized to synthesize a hydrophilic polymer with preserved reactive oxazoline side rings. Due to this feature, the necessary reactions between the 2-oxazoline pendant groups and the selected reactants can be performed under relatively simple conditions, without the need for highly specialized equipment. Even though several research groups have recently conducted research with the use of PiPOx, to the best of our knowledge, no comprehensive reviews have been published that demonstrated the diversity of the obtained transformations. In this regard, we wrote a mini-review to illustrate the advantages of this reactive polymer in the construction of materials with distinctive properties, which can be tuned by simple post-polymerization modification reactions.

Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences,
Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź, Poland. E-mail: baskomeg@cbmm.lodz.pl,
kost@cbmm.lodz.pl

First, a short characterization of the monomer is given, followed by the presentation of synthetic methods that allow for the formation of polymers with the desired structure of the main chain and preserved oxazoline rings. Subsequently, the post-functionalization of PiPOx by covalent chemistry to construct complex macromolecules with a defined structure is illustrated. The discussion demonstrates the ability of the oxazoline ring to react with various (low- and high-molecular-weight) reagents and prepare materials with tailored properties.

2. The 2-isopropenyl-2-oxazoline monomer

2-isopropenyl-2-oxazoline possesses two polymerizable sites: an iso-propenyl (vinyl) group and an oxazoline ring that belongs to the bifunctional monomer class. The monomer is commercially available; however, vinyloxazolines can also be prepared from the reaction of amino alcohols with acrylic esters.¹⁶ Synthesis by direct condensation of isobutyronitrile with 2-amino-ethanol has been also reported.^{17,18} In addition, it is worth noting that a very efficient synthesis from 2-ethyl-2-oxazoline *via* the formaldehyde reaction has been described previously.¹⁹

This type of five-membered heterocyclic compound can undergo various ring-opening reactions proceeding *via* an addition-type mechanism, as presented in Fig. 1.^{16,19}

Most oxazoline ring-opening reactions leading to adduct formation can be accomplished with the addition of catalysts at an elevated temperature. However, under suitable conditions, the addition reaction can occur with a good yield without the use of any catalysts. For example, for the case of carboxylic acids and thiols, the efficient addition to oxazoline rings is achieved at high temperature in polar, aprotic solvents (*e.g.*, *N,N*-di-methylformamide (DMF)).²⁰ According to the mechanism proposed in the early work of Fry *et al.*, in this system, at the first stage, a proton reacts as an electrophile with the electron pair of the 2-oxazoline nitrogen to produce

an oxazolinium ion.²⁰ In the second step, the oxazolinium ion reacts with a nucleophile, yielding an adduct with an ester-amide structure, as shown in Fig. 2.

The main advantage of this reaction is that the final adduct can be formed without the formation of any byproducts and without the need for catalyst use. Moreover, appropriate conditions ensuring high ring conversion can be obtained using a simple reactive setup, which makes the method very attractive for modification of high-molecular-weight compounds (homopolymers and copolymers) containing reactive oxazoline side groups.

3. Methods of preparation of poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) with pendant oxazoline rings in the side chain

To obtain reactive polymers with a carbon main chain and oxazoline pendant rings, iPOx polymerization proceeding with the

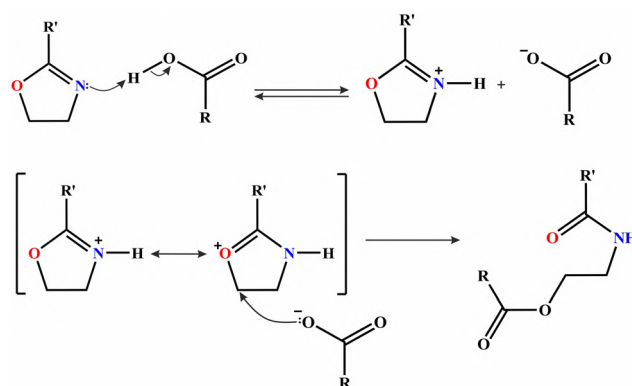


Fig. 2 The mechanism for adduct formation with the ester-amide structure obtained by ring-opening oxazoline with a carboxylic acid.

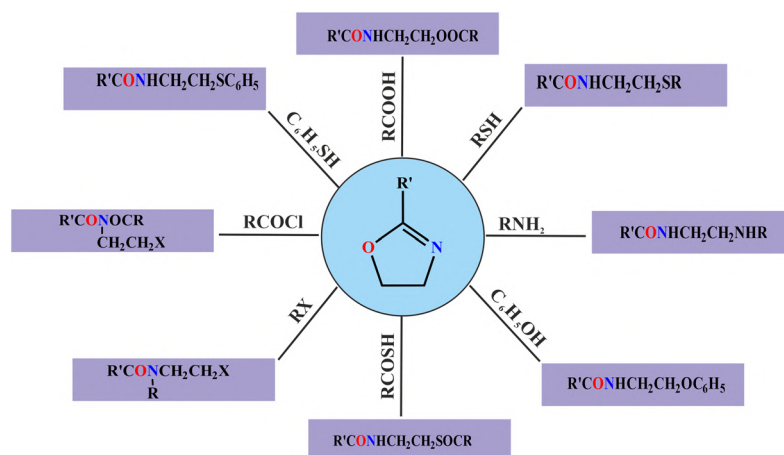


Fig. 1 Reactivity of the oxazoline ring.¹⁹

participation of vinyl groups was applied. The presence of the double bond functionality in a monomer molecule allows for the use of synthetic strategies based on different modes of polymer growth, as shown in Fig. 3.

In general, it should be remembered that whereas anionic polymerization leads to products with a narrow molar mass distribution, and, thus, with better overall control, free radical polymerization is technically more facile and suitable for large-scale production. In addition, radical polymerization allows for the use of reagents without extensive purification and proceeds under conditions enabling the preservation of reactive oxazoline side rings in the formed polymer, which is sometimes difficult to achieve in ionic polymerization. Ultimately, the final selection of the applied polymerization method depends on the required molar mass of PiPOx and the individual needs.

The first report concerning the radical polymerization of 2-isopropenyl-2-oxazoline was presented by Matsuda *et al.* in 1972.²¹ As reported, homopolymers and copolymers of iPOx with methacrylic acid were obtained for polymerization carried out in bulk in the presence of 1 mol% AIBN at 60 °C. The authors provided the NMR spectrum of the homopolymer, and the products were carefully characterized by infrared spectroscopy (IR). However, information about the molar masses as well as the dispersity of the obtained products was not included in the article. Subsequently, many research groups have been conducting the radical polymerization of iPOx under modified conditions with various free-radical initiators, aiming to prepare reactive polymers for further post-polymerization modification.^{22–25} Depending on the conditions used, linear polymers/copolymers with moderate molar masses (ranging from 9000 g mol^{−1} to 37 000 g mol^{−1}) and rather broad dispersity (1.8–2.1) were obtained.

The highly cross-linked particles were also obtained by the conventional nonaqueous dispersion polymerization (heptane, 24 h, 70 °C, argon atmosphere) of iPOx and methyl methacrylate conducted in the presence of a cross-linker (1,4-butanediol dimethacrylate) and a stabilizer (polystyrene-*b*-poly(ethene-*alt*-propene)-*b*-polystyrene).²⁶ The obtained particles with different oxazoline contents and cross-linking degrees were

prepared, and their morphology, average diameter, and size distribution were studied by SEM and DLS techniques. The particles with diameters ranging from 650 to 750 nm exhibited a spherical morphology and narrow size distributions.

The radical copolymerization of iPOx with *N*-vinylpyrrolidone in an aqueous phase, using potassium persulfate as a radical initiator, was applied to obtain a polymer matrix for the preparation of nanocomposite silver nanoparticles.²⁷ The main aim of this work was to develop a synthetic method that used a green methodology. Polymerizations conducted under different conditions with various stoichiometric ratios of monomers led to copolymers that were insoluble in water or common organic solvents. The copolymer with adequate swelling behaviour was formed from the reactive mixture containing 10% iPOx. The incorporation of silver nanoparticles inside this copolymer by an ecofriendly green route was achieved using a garden rhubarb stem extract that acted as a bioreductant of Ag⁺ ions.

Reversible addition–fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization was also employed for iPOx homo and copolymerization.²⁸ Different classes of chain transfer agents, including dithiobenzoate, trithiocarbonate, and dithiocarbamate, were applied to gain insight into the RAFT polymerization conditions. It was found that the utilization of dithiocarbamate as well as trithiocarbonate results in broad molar mass distributions, while polymerization with 2-cyanopropyl dithiobenzoate yields polymers with a high yield and narrow molar mass distribution (PDI = 1.38). In the kinetic plots, the molar mass of polymer increased linearly with the conversion of the monomer; however, the semilogarithmic curve revealed that the polymerization slows down above 30% monomer conversion, as shown in Fig. 4. This fact is associated with the creation of intermediate products during the RAFT process, which are too stable to still reinitiate the polymerization.²⁸

Reversible addition–fragmentation chain-transfer polymerization was also chosen to synthesize statistical and block copolymers of iPOx and 2-vinyl-4,4-dimethyl-5-oxazoline (2-cyanopropyl dithiobenzoate, 60 °C, dioxane). As demonstrated in both cases, well-defined copolymers with narrow molar mass distributions (dispersities (*D*) ≤ 1.3) and equal

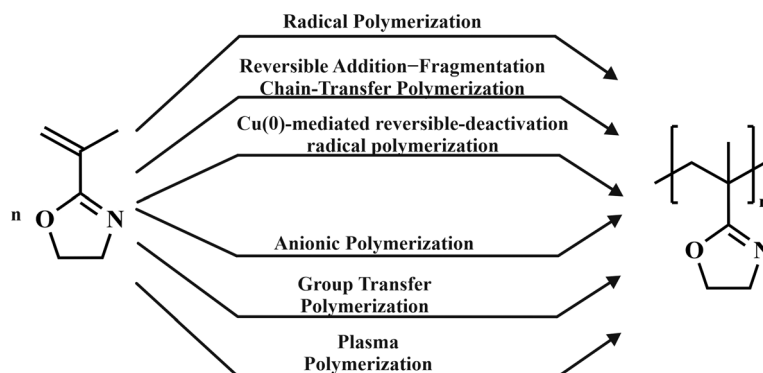


Fig. 3 The applied polymerization systems for the synthesis of PiPOx.

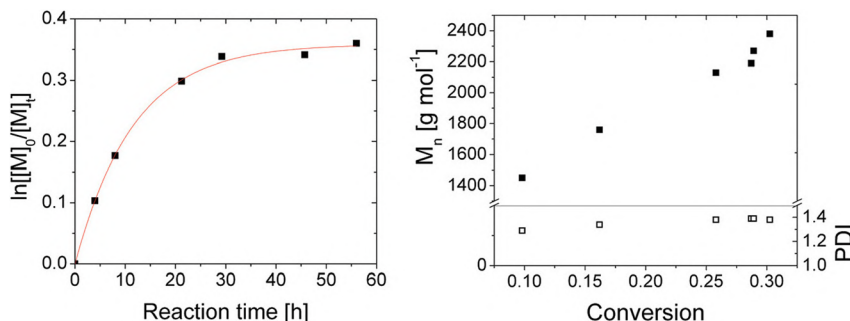


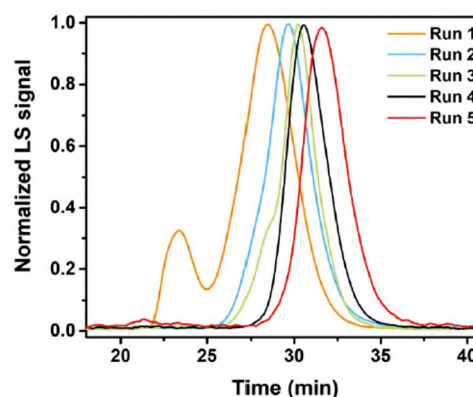
Fig. 4 The kinetic plot for the controlled radical RAFT polymerization of iPOx. Reproduced from ref. 28 with permission from American Chemical Society, copyright 2011.

numbers of repeating units for both monomers were obtained.²⁹

The aqueous Cu(0)-mediated reversible-deactivation radical polymerization of iPOx *via* double bonds was reported by Mosnáček *et al.*³⁰ In this approach, the 2-chloropropionitrile/CuCl(CuCl₂)/tris(2-pyridylmethyl)amine system was successfully employed to polymerize iPOx in a H₂O/NaCl medium. After fine-tuning of the catalytic system composition, a quantitative monomer conversion was reached, yielding polymers with low dispersity and MWs of up to approximately 20 000 g mol⁻¹. The presented synthetic strategy is attractive due to the applied aqueous polymerization medium, which can enable the copolymerization of iPOx with polar monomers.

The anionic polymerization of 2-isopropenyl-2-oxazoline with butyllithium was reported by Tomalia in 1980.³¹ Homopolymers with molar masses in the range 1500–2500 g mol⁻¹ were obtained in 85–95% yield as white, friable powders. More broader studies on iPOx anionic polymerization were presented later by Kang and coworkers.³² Various initiating systems (including butyllithium, diphenylmethylpotassium, triphenylmethylpotassium, *sec*-butyllithium/1,1-diphenylethylene/lithium chloride and diphenylmethylpotassium/diethylzinc) were employed to estimate the appropriate conditions for the preparation of homopolymers. All experiments in this work were carried out using high-vacuum and glass-blowing techniques. It was found that using butyllithium at -78 °C results in a low molar mass polymer with high dispersity (2.38) due to the termination or chain transfer reaction. To decrease the contribution of side reactions, weaker nucleophiles such as diphenylmethylpotassium and triphenylmethylpotassium were used; however, these changes did not significantly improve the molar mass and dispersity of the obtained homopolymers. Well-defined PiPOx with a molar mass in the range of 9.6 to 100 kg mol⁻¹ and low dispersity (≤ 1.17) were only obtained *via* anionic polymerization using diphenylmethylpotassium/diethylzinc in THF at 0 °C. The presented results show that diethylzinc is an efficient ligand to reduce the side reaction and enables control of the anionic polymerization of iPOx.³² However, recent research presented by Hoogenboom *et al.* reveals that after proper optimization of the polymerization conditions, *n*-BuLi can also be used as an

efficient initiator of iPOx anionic polymerization.^{33,34} The undertaken systematic studies were focused on the influence of the applied temperature and monomer concentration on the polymerization efficiency and polymer molar mass. The obtained results show that the well-defined PiPOx with a very narrow dispersity (1.12) can be successfully synthesized after decreasing the monomer concentration from 3 M to 1.6 M and increasing the temperature from -78 °C to -20 °C (Fig. 5). In addition, it was found that the applied conditions for a small batch polymerization (0.5 g) are not suitable for the polymerization of a larger amount of monomer and homopolymers with a lower molecular mass than expected, and a slightly higher dispersity is obtained. The observed effect is correlated with



Run	C _{iPOx} (mol/L)	^a M/I	T (°C)	^b Yield (%)	M _{n,theo} (kDa)	^c M _{n,exp} (kDa)	^d Đ
1-small batch	3	150	-78	50	16.8	40.8	1.73
2-small batch	1.6	150	-78	67	16.8	25.1	1.43
3-small batch	1.6	150	-40	92	16.8	24.1	1.22
4-small batch	1.6	150	-20	95	16.8	17.5	1.12
5-large batch	1.6	150	-20	95	16.8	15.4	1.34
6-large batch	1.6	150	-40	93	16.8	17.1	1.22

Fig. 5 Optimization of iPOx anionic polymerization conditions using BuLi as an initiator. Reproduced from ref. 34 with permission from American Chemical Society, copyright 2016.

the hindered heat flow in a large batch, and after decreasing the temperature of polymerization to $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, the polymer with the desired characteristic was obtained on the scale of 6 g.³⁴

An efficient synthesis of well-defined poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) with a high molar mass and very narrow molar mass distribution *via* rare earth metal-mediated group transfer polymerization was demonstrated by Rieger.³⁵ The polymerization conducted at room temperature in the presence of bis(cyclopentadienyl)methyl ytterbium (Cp_2YbMe) as a catalyst follows a living character, showing a linear increase in molar mass with monomer conversion (Fig. 6).

Additionally, bis(cyclopentadienyl)(4,6-dimethylpyridin-2-yl)methyl lanthanide complexes (toluene, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$) were reported to be efficient initiators of rare earth metal-mediated group transfer polymerization of iPOx.³⁶ Surface-initiated group transfer polymerization leads to the formation of side chains along the backbone brushes.

The UV-induced photopolymerization of iPOx on hydrogen-terminated silicon surfaces was demonstrated by Zhang.³⁷ As a result of the grafting of the hydrophilic PiPOx brushes onto the silicon substrate, the surface wettability is efficiently modified, which was confirmed by static water contact angle measurements (while the bare Si substrate gives a static water contact angle of 96° , for the hydrophilic PiPOx brushes, the value of the water contact angle is determined to be equal to 34°). PiPOx brushes were also prepared on molybdenum disulfide, glassy carbon, and nanocrystalline diamond surfaces using the same technique.^{38–41} Self-initiated photografting and photopolymerization onto amino-functionalized silicon sub-

strates enables the modification of surfaces to control protein adsorption and cell adhesion.⁴²

Methods based on low-pressure plasma polymerization of 2-isopropenyl-2-oxazoline were applied to prepare thin coatings.^{43,44} Depositions were performed in pulsed mode, exploiting the carbon-carbon double bond of the monomer to maximize the retention of oxazoline rings in the coatings. In another work, it was observed that films deposited from isopropenyloxazoline are less sensitive to the deposition conditions than those deposited from methyl-2-oxazoline.⁴⁵ This kind of polymerization is considered a cost-effective and environmentally friendly process, which makes minimal use of monomers, does not require the use of solvents or initiators, and eliminates liquid organic wastes.

The example of iPOx polymerization by frustrated Lewis pairs based on $\text{Al}(\text{C}_6\text{F}_5)_3$ and N-heterocyclic carbenes has been reported by Chen *et al.*⁴⁶ According to the proposed mechanism, in this type of polymerization, the Lewis acid and Lewis base work cooperatively to activate the monomer and participate in polymer chain formation. As shown, the polymerization of oxazoline conducted in toluene at room temperature affords products with a M_n in the range of $15\,000$ – $74\,000\text{ g mol}^{-1}$ and with a rather high dispersity ($D = 2.9$ – 3.2).

The vinyl polymerization of 2-isopropenyl-2-oxazoline *via* an activated monomer mechanism was reported by Miyamoto.⁴⁷ The polymerization was carried out in dichloromethane in the presence of trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate as a catalyst. The proposed mechanism postulated the formation of a complex between 2-isopropenyl-2-oxazoline and trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate at the first step, followed by the formation of a propagating species having a ketene silyl aminal structure, as presented in Fig. 7. At room temperature with 5 mol% of this catalyst, limited conversion was observed (28%) at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$; with 10 mol% of catalyst, quantitative conversion was reached, and polymers with $M_n = 5000\text{ g mol}^{-1}$ ($D = 1.19$) were obtained.

As reported in the presented literature, PiPOx, as a reactive polymer with a desired molar mass, can be easily obtained in a controlled manner by applying various synthetic methods.

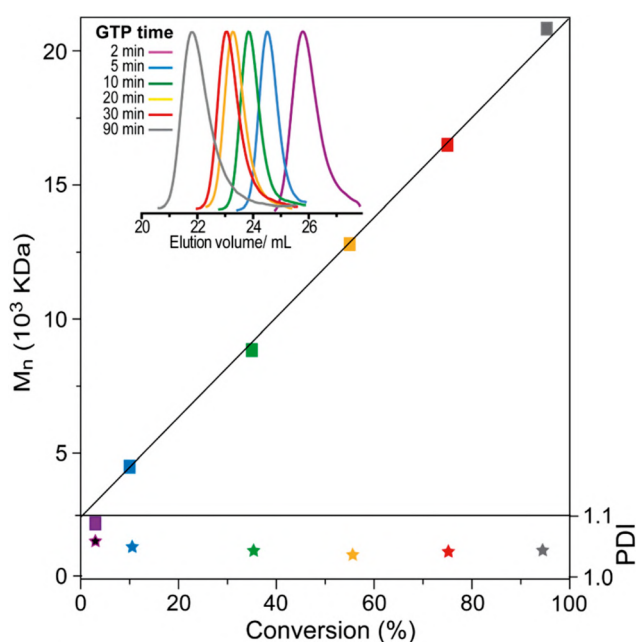


Fig. 6 Control group transfer polymerization of iPOx. Reproduced from ref. 35 with permission from American Chemical Society, copyright 2013.

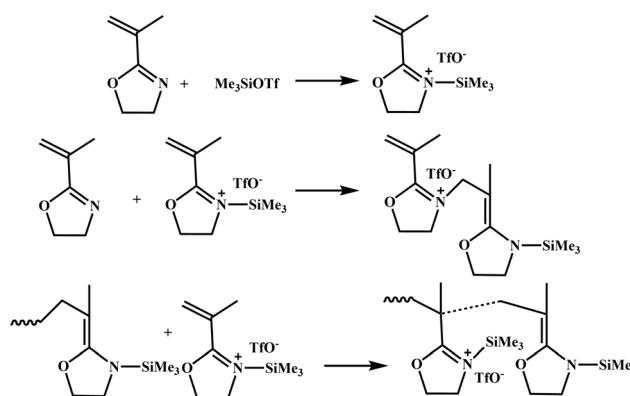


Fig. 7 The vinyl polymerization of 2-isopropenyl-2-oxazoline *via* an activated monomer mechanism.

What is also interesting is that iPOx homopolymers were found to show kinetic hydrate inhibitor performance, although they are not as powerful as some other classes that are used by the oil and gas industry to prevent plugging of flow lines by gas hydrates.⁴⁹ Moreover, PiPOx is also soluble in a wide range of organic solvents (including methanol, ethanol, chloroform, DMSO, or DMF), which considerably facilitate post-polymerization procedures. Due to its high glass transition temperature ($T_g > 170$ °C), PiPOx can be considered an important tool for modifying the physical properties of other polymers. This feature is particularly essential, for example, for materials that

This reactive polymer is thermally stable and resistant to moisture and oxygen, so it does not require any special storage conditions. As presented further, the versatile introduction of desirable moieties and functions into the PiPOx chain resulting in the production of materials with tailor-made properties can be achieved under simple reaction conditions without the need for highly specialized equipment.

Considering all the mentioned advantages of PiPOx, with particular emphasis on its reactivity, hydrophilicity and biocompatibility, the potential of this polymer is expected to be fully exploited in various application areas.

5. Post-polymerization modification of poly(2-isopropenyl-2-oxazoline)

To demonstrate the possibility of PiPOx chain modification through pendant oxazoline rings, preliminary studies were carried out in relatively simple systems using selected low-molecular-weight compounds containing carboxyl, thiol, or amine functional groups. The structures of the monofunctional compounds used for PiPOx post-polymerization modification are presented in Fig. 8.

In the procedure described by Weber *et al.*, the reaction of benzoic acid, 4-azidobenzoic acid and thiophenol with PiPOx was conducted in DMF at 60 °C for 24 h.²⁸ By utilizing ¹H NMR spectroscopy, it was found that the addition reaction with thiophenol proceeds quantitatively, whereas the observed conversion reaches 74% and 88% for benzoic acid and 4-azidobenzoic acid, respectively. The addition reaction of PiPOx with thiols and carboxylic acids has also been studied in aqueous solutions.⁵¹ On the basis of IR and ¹H NMR spectra analysis, it was established that the addition reactions with acetic acid and benzoic acid proceed selectively with 65 and 42% conver-

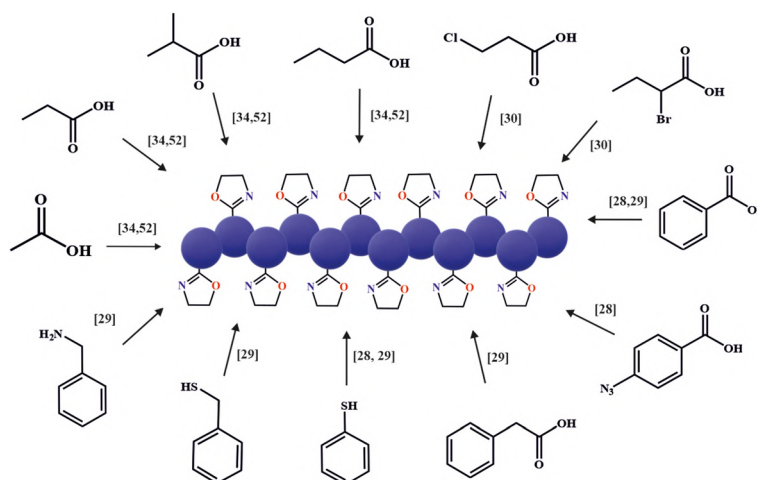


Fig. 8 Representation of monofunctional compounds used for PiPOx post-polymerization modification.

sion to give the corresponding modified polymers without hydrolysis of the pendant oxazoline groups. Systematic studies concerning PiPOx functionalization with compounds showing different nucleophilic functionalities (including thiophenol, benzyl mercaptan, benzylamine, phenylacetic acid, and benzoic acid) were presented by Kempe.²⁹ Under the applied conditions (DMF, 80 °C), only 18% conversion is observed for benzyl mercaptan, and no reaction of PiPOx with benzylamine is observed. However, the results support the previous observations of a high reactivity for aromatic acids and thiophenol.

Different chemical compounds containing carboxylic groups have often been applied for the tailored modification of PiPOx due to their good reaction efficiency. For example, acetic, propionic, butyric, or isobutyric acid has been used for partial opening of the pendant 2-oxazoline side groups, enabling the synthesis of random copolymers with a large structural diversity.³⁴ As a result, thermosensitive polymers that exhibit a lower critical solution temperature were obtained by the gradual introduction of hydrophobic side chains into the hydrophilic PiPOx chain. As shown in Fig. 9, depending on the final copolymer composition and the hydrophobic nature of the side chain functional groups, the cloud points for the resulting PiPOx copolymers are controlled over a wide temperature range, from 4.5 °C to 97.8 °C. The potential utility of copolymers with narrow temperature transitions as temperature sensors was proposed.

The PiPOx modification using dual, triple, and quadruple combinations of these four carboxylic acids has been also demonstrated.⁵² By mixing the acid functionalities in the copolymers, the cloud point temperatures are modulated between room temperature and body temperature. It is confirmed that the hydrophilic/hydrophobic balance of the resulting copolymers can be regulated by varying the acid moiety from methyl to butyl. In this system, the cloud point temperature of the pre-

pared copolymers was finely tuned in the range that is relevant for potential biomedical applications.

The reaction of 2-bromoisobutyric or 2-chloropropionic acid with pendant 2-oxazoline rings from the polymer chain was performed to prepare different PiPOx-based ATRP macroinitiators.³⁰ A well-defined functional polymer with a unimodal SEC trace dispersity of 1.26 and a 20% degree of substitution was obtained (NMP, 60 °C, 5 h) using 2-chloropropionic as the modification agent. For the case of 2-bromoisobutyric acid, the degree of substitution was equal to 42%; however, the SEC traces showed a multimodal molar mass distribution, which was ascribed to the side reactions of the 2-oxazoline rings. In the next step, PiPOx chains fitted with ATRP initiation sites were used for the grafting of methyl methacrylate or styrene. The obtained results show that the macromonomer with 2-chloropropionate groups enables the synthesis of highly defined graft copolymers if the monomer conversion is kept low to avoid cross-linking reactions.

Taking advantage of the highly effective ring-opening addition of carboxyl groups to the oxazoline ring, carboxylic acids with a more complex structure were also used for the post-polymerization modification of PiPOx (structures shown in Fig. 10). For instance, 4-(4-hydroxy-3,5-dimethylphenylazo) benzoic acid, which exhibits fluorescence activity, was used as a reagent for the preparation of copolymers bearing azo moieties.⁵³ The reaction of 4-(4-hydroxy-3,5-dimethylphenylazo) benzoic acid was also effectively exploited for grafting the fluorescent azobenzene dye onto the 2-isopropenyl-2-oxazoline-methylmethacrylate cross-linked particles.²⁶ It was found that the grafting degree of oxazoline-functional particles with dye is dependent on the crosslinking degree. Nevertheless, it was observed that the oxazoline rings located inside the particles are also involved in the reaction with the acid groups, which confirms the high efficiency of this type of addition reaction.

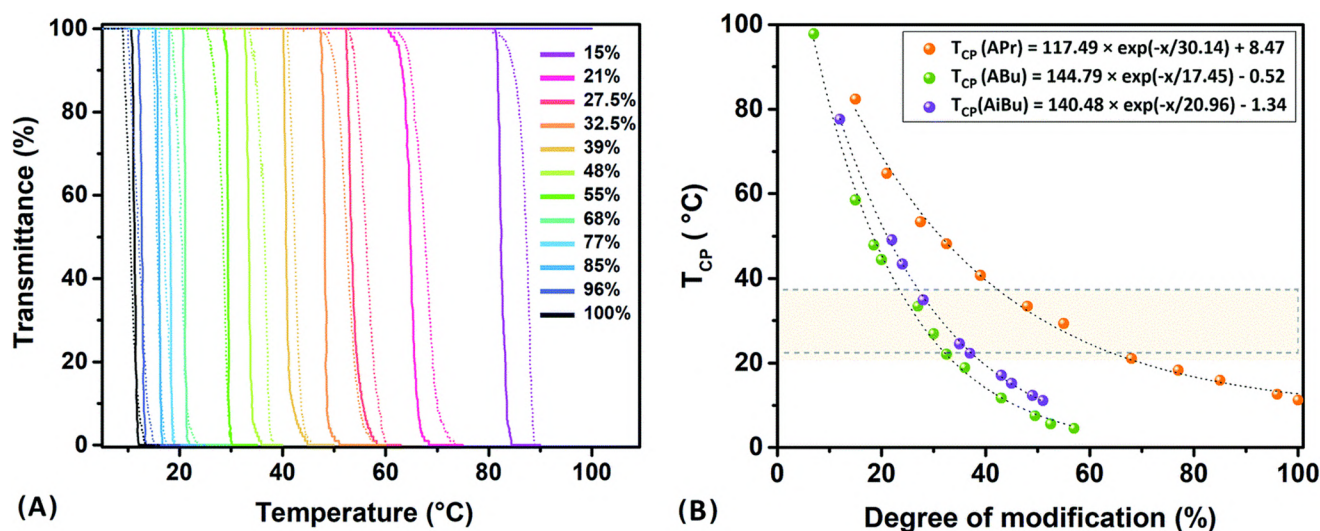


Fig. 9 Transmittance versus temperature profiles for the second heating (solid lines) and cooling (dashed lines) cycles of PiPOx–propionic acid copolymers in distilled water (A). The effect of the acid content on the cloud point temperatures (T_{CPs}) for the PiPOx–acid series (B). Reproduced from ref. 34 with permission from the Royal Society of Chemistry, copyright 2018.

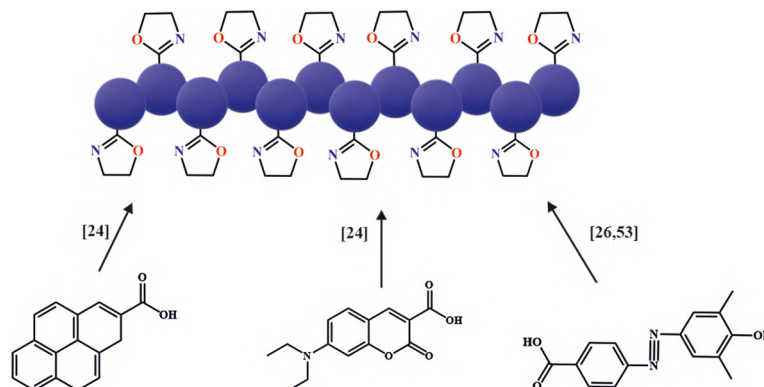


Fig. 10 Representation of fluorescent compounds used for PiPOx post-polymerization modification.

In another study, 1-pyrenecarboxylic acid and 7-(diethylamino)coumarin-3-carboxylic acid, as fluorescent probes containing a carboxylic group, were successfully introduced into the polymer chain as side groups.²⁴ PiPOx labelled with 7-(diethylamino)coumarin-3-carboxylic acid was further used to visualize the colocalization of the polymer within cell organelles.

The reaction of oxazoline pendant rings in the polymer backbone with a methyl triflate was aimed at the preparation of polycationic macroinitiator.²³ In the next step, the synthesis of molecular brushes was achieved by the grafting-from method *via* the living cationic ring-opening polymerization of 2-oxazoline monomers. The presented approach has the advantage that a robust and very effective macroinitiator is prepared with comparable reactivity to, *e.g.*, moisture-sensitive triflates or tosylates. As outlined by the authors, the accessibility of the initiation sites along the main chain of the macro-monomer for the 2-oxazoline monomers (2-methyl-, 2-ethyl-, and 2-isopropyl-2-oxazoline) is considerably improved due to the charging of each unit along the PiPOx chain to a polyelectrolyte and the induced significant chain stretching. NMR and FTIR spectroscopy confirm a very high side chain grafting density and a quantitative reaction. With poly(2-ethyl- and 2-isopropyl-2-oxazoline) side chains, the molecular brushes display sharp, reversible lower critical solution temperatures in aqueous solutions.

Along with monofunctional compounds, difunctional reagents have also been utilized to prepare PiPOx cross-linked structures with covalent nodes. Their chemical structures are given in Fig. 11. The effectiveness of this synthetic approach was initially demonstrated with simple dicarboxylic acids, including succinic, glutaric, adipic, pimelic, suberic, azelaic, sebacic, and dodecanedioic acid.⁵⁴ The methodology used enables one to obtain hydrogel networks with a controlled number of ester-amide crosslinks formed in the post-polymerization modification reactions while maintaining a balance between hydrophilicity and the structural integrity of the material. For the case of hydrogels with the highest water absorption, further evaluation was carried out in terms of thermoresponsiveness and susceptibility to degradation under physiological conditions. The noncytotoxic character of the

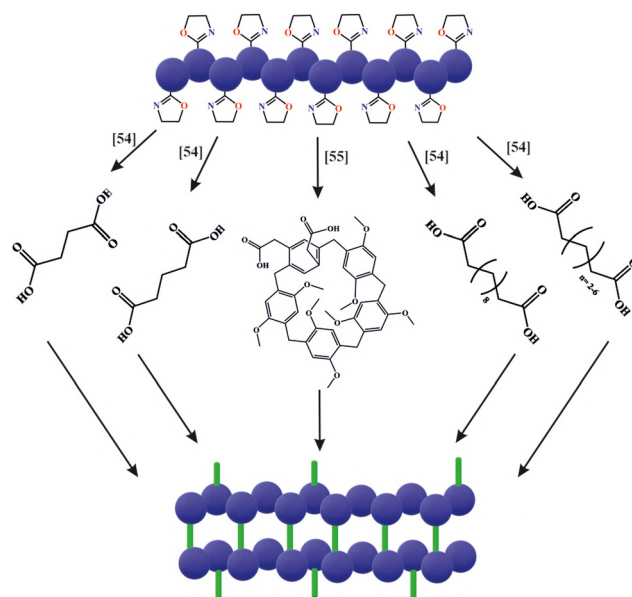


Fig. 11 Representation of dicarboxylic compounds used for PiPOx network construction.

PiPOx hydrogels as well as the protein repellent properties were also demonstrated for selected hydrogels. Additionally, mineralization studies revealed that such scaffolds do not promote calcification phenomena. In light of the presented results, the use of the obtained hydrogels as potential ophthalmic materials or drug carriers was proposed.

Although the PiPOx hydrogels cross-linked with aliphatic dicarboxylic acids showed controlled water uptake, their mechanical properties were found to be rather moderate. Therefore, in another work, networks containing rigid nodes from macrocycles have been proposed to adjust the final properties of the material.⁵⁵ As demonstrated, a specifically constructed dicarboxylic acid pillar[5]arene, used as crosslinker, enables the introduction of covalently bounded bulky macrocycles into PiPOx networks, resulting in hydrogels with enhanced mechanical properties (*i.e.*, compression and tensile

modulus, energy dissipation, stress at break and storage modulus). The obtained hydrogels possessing host–guest complexation ability were tested as adsorbents for water purification. Compared to their PiPOx counterparts crosslinked with linear dicarboxylic acids (azelaic acid), hydrogels with pillar[5] arene components showed much higher adsorption performance for phenols and dyes (methylene blue and methyl red) and were easily regenerated by washing with an organic solvent for reuse.

In another instance, hydrophobic polymeric coatings were prepared by cross-linking PiPOx with the ammonium carboxylate functional group in perfluoroalkyl polymers.^{56,57} The networks were obtained from aqueous formulations after heating and loss of solvent and ammonia when the carboxylic acid moieties reacted with the oxazoline group to form amide ester cross-links. The nonstick surfaces were formed by the self-assembly of active perfluoroalkyl groups oriented to yield closely packed, exposed $-\text{CF}_3$ moieties. As demonstrated, the surface wettability can be tuned by varying the chemical composition, curing conditions, and degree of cross-linking.

Di-carboxyl terminated poly(ethylene oxide) ($M_n = 500 \text{ g mol}^{-1}$) was applied in another work as a hydrophilic macro-crosslinker for oxazoline side rings in PiPOx chains.⁵⁸ In the presence of selected biologically active compounds (cinnamic acid, benzoic acid, or eugenol), hydrogels with antibacterial properties were successfully prepared. The presented results confirm that by simultaneously applying low- and high-molecular-weight reagents containing suitable reactive groups, the introduction of desired components into a covalently cross-linked structure can be achieved in a one-pot synthesis. The

resulting hydrogels show suitable mechanical properties that enable easy handling and can potentially be used in wound healing and infection prevention dressings.

Riccardi and co-workers used, poly(acrylic acid) (pAAc) for the modification of the plasma deposited coatings.⁴³ It was found that the amount of grafted pAAc and the quality of the films depended both on the deposition and on the reaction conditions.

PiPOx dual-crosslinked hydrogels formed by both covalent bonds and physical (*i.e.*, metal–ligand coordination) interactions have been also successfully obtained.⁵⁹ In the first step, the PiPOx copolymer was obtained by reacting part of the side oxazoline rings with 2,6-dipyridin-2-ylpyridine-4-carboxylic acid. Subsequently, the covalently crosslinked network was constructed by chemical crosslinking with azelaic acid. Swelling of the hydrogels in a solution of divalent transition metal ions (Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+}) enabled the formation of dual crosslinks due to the complexation of metal ions with the terpyridine moieties. It was found that the introduction of terpyridine units in the structure significantly improves the mechanical properties of the hydrogels and induces energy dissipating properties compared to nonmodified PiPOx hydrogels. Hydrogels with ultrahigh compression strength and toughness were obtained upon complexation with Zn^{2+} ions.

The preparation of noncovalent PiPOx-based hydrogels that can be formed by a metal coordination mechanism have been also presented.⁶⁰ In the proposed synthetic strategy, 2,6-dipyridin-2-ylpyridine-4-carboxylic acid was applied for the modification of the polymer due to its high binding affinity for transition metal ions. In this system, the reversible autogelation

Table 1 Post-polymerization modification of PiPOx by using different agents

Modifying agents	Properties	Potential application	Ref.
Methyl triflate	Polycationic polymer	Macroinitiator for preparation of polymer brushes	23
1-Pyrenecarboxylic acid, 7-(<i>N,N</i> -diethylamino)coumarin-3-carboxylic acid	Fluorescent (co)polymers without toxicity or immunomodulatory properties	Functional polymeric materials accessible for bioconjugation with drugs, proteins, or saccharides	24
4-(4-Hydroxy-3,5-dimethylphenylazo)benzoic acid	Fluorescence particles	Medical diagnostic	26 and 53
Benzoic acid, 4-azidobenzoic acid, thiophenol	Reactive (azide functionalized) polymer	Preparation of graft-copolymers	28
Benzylamine, benzoic acid, thiophenol phenylacetic acid, benzyl mercaptan	Amphiphilic block copolymers with ability to assemble in narrowly disperse nanostructures in aqueous media	Biomedical materials	29
3,3'-Dithiodipropionic acid	Reduction-responsive molecularly imprinted polymers	Anticancer therapy (injection into the tumor site)	33
Acetic acid, propionic acid, butyric acid, isobutyric acid	Amphiphilic polymers with modulated cloud point temperature	Stimuli-responsive copolymers	34 and 52
3-Chloropropionic acid, 2-bromopropionic acid	Reactive polymer	ATRP macroinitiator for graft copolymers preparation	30
Succinic acid, glutaric acid, adipic acid, pimelic acid, suberic acid, azelaic acid, sebacic acid, dodecanedioic acid	Tuneable water uptake	Hydrogels for drug delivery applications	54
Dicarboxylic pillar[5]arene	High compression strength hydrogels	Water purification and solvent-mediated regeneration	55
Dicarboxyl-terminated poly(ethylene oxide), benzoic acid, cinnamic acid	Antibacterial hydrogel	Wound dressing materials	58
2,2':6',2''-Terpyridine-4'-carboxylic acid, azelaic acid	Ultrahigh compression strength or high elasticity	Hydrogels with ultra-high toughness, self-healing materials	59 and 60

process was triggered by the addition of divalent transition metal ions (e.g., Fe^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , and Zn^{2+}). The rheological studies show that the obtained hydrogels exhibit rapid self-healing properties at room temperature. As a result, mouldable and self-healing supramolecular hydrogels with a transient network structure are obtained. The developed hydrogels can be formed into any geometric shape, which enables a wide range of potential applications from dynamic self-healing coatings to soft robotics.

A summary of various PiPOx modifications, properties of the obtained materials, and their potential applications are presented in Table 1.

6. Conclusion

This mini-review highlights the potential of PiPOx as a reactive platform for the generation of functionally diverse polymers. The main reason for the unique position of PiPOx is the relatively high reactivity of the oxazoline pendant rings that enables the efficient introduction of desirable functionalities. This particular feature, combined with the hydrophilic properties of the polymer, gives PiPOx a distinct advantage over other water-soluble polymers. Moreover, PiPOx-based materials are suitable for biomedical applications due to their biocompatibility and noncytotoxic nature. This is a significant benefit because the frequency of observed immune response for classical hydrophilic polymers is increasing, which can limit the application of these polymers as biomaterials. However, despite these excellent properties, PiPOx has limitations, which mainly include its poor stability at low pH values and the need for high temperatures to ensure that the reactants undergo high conversions during the addition reactions.

Nevertheless, considering the presented literature, it can be concluded that PiPOx meets the requirements of a universal precursor that allows for efficient structural transformations and enables the creation of polymeric materials with tuned properties. By applying suitably functionalized reagents, complex macromolecules can be formed that are otherwise difficult or impossible to produce by direct polymerization. As presented, the creation of various structures can be achieved in a predictable manner, without the formation of unwanted toxic byproducts or the use of highly specialized equipment. The materials explored in the studies reviewed here range from thermoresponsive copolymers, polymer particles grafted with azo dye, cylindrical molecular brushes, hydrogels for biomedical applications to self-healing, and mouldable supramolecular hydrogels. The presented progress in the synthesis of new PiPOx-based materials is promising; however, we believe that the wider use of this polymer is possible. We hope that by presenting research mainly conducted in recent years, this mini-review will inspire the scientific community involved in the design and preparation of materials that are specifically engineered to exhibit novel or enhanced properties in the future.

Author contributions

M. Basko: writing – original draft preparation, B. Kost: writing and editing, B. Kopka: visualization. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

Financial support from the National Science Centre, Poland, Grant No. 2020/37/B/ST5/03302 is gratefully acknowledged. Bio-Med-Chem Doctoral School of the University of Lodz and Lodz Institutes of the Polish Academy of Sciences are acknowledged for the support of this study by Bartosz Kopka.

References

- 1 E. Blasco, M. B. Sims, A. S. Goldmann, B. S. Sumerlin and C. Barner-Kowollik, *Macromolecules*, 2017, **50**, 5215–5252.
- 2 *Functional Polymers by Post-Polymerization Modification: Concepts, Guidelines, and Applications*, ed. P. Theato and H.-A. Klok, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2012.
- 3 C. J. Hawker and K. L. Wooley, *Science*, 2005, **309**, 1200–1205.
- 4 T. Lühmann, M. Schmidt, M. N. Leiske, V. Spieler, T. C. Majdanski, M. Grube, M. Hartlieb, I. Nischang, S. Schubert, U. S. Schubert and L. Meinel, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2017, **3**, 304–312.
- 5 A. C. Rinkenauer, L. Tauhardt, F. Wendler, K. Kempe, M. Gottschaldt, A. Traeger and U. S. Schubert, *Macromol. Biosci.*, 2015, **15**, 414–425.
- 6 M. A. Tasdelen, *Polym. Chem.*, 2011, **2**, 2133–2145.
- 7 M. N. Leiske, M. Hartlieb, C. Paulenz, D. Pretzel, M. Hentschel, C. Englert, M. Gottschaldt and U. S. Schubert, *Adv. Funct. Mater.*, 2015, **25**, 2458–2466.
- 8 H. T. Ho, A. Bénard, G. Forcher, M. Le Bohec, V. Montembault, S. Pascual and L. Fontaine, *Org. Biomol. Chem.*, 2018, **16**, 7124–7128.
- 9 R. K. Iha, K. L. Wooley, A. M. Nyström, D. J. Burked, M. J. Kade and C. J. Hawker, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 5620–5686.
- 10 C. S. Hege and S. M. Schiller, *Green Chem.*, 2014, **16**, 1410–1416.
- 11 H. N. Cheng, R. A. Gross and P. B. Smith, *ACS Symp. Ser.*, 2015, **1192**, 1–13.
- 12 R. Hoogenboom, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 7978–7994.
- 13 B. Verbraeken, B. D. Monnery, K. Lava and R. Hoogenboom, *Eur. Polym. J.*, 2017, **88**, 451–469.
- 14 S. Kobayashi, *Prog. Polym. Sci.*, 1990, **15**, 751–823.

- 15 R. Hoogenboom, *Macromol. Chem. Phys.*, 2007, **208**, 18–25.
- 16 J. A. Frump, *Chem. Rev.*, 1971, **33**, 483–505.
- 17 H. Witte and W. Seeliger, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1972, **11**, 287–288.
- 18 F. A. Jerca, V. V. Jerca and R. Hoogenboom, *Biomacromolecules*, 2021, **22**, 5020–5032.
- 19 B. M. Culbertson, *Prog. Polym. Sci.*, 2002, **27**, 579–626.
- 20 E. M. Fry, *J. Org. Chem.*, 1950, **15**, 802–806.
- 21 T. Kagiya, T. Matsuda and K. Zushi, *J. Macromol. Sci., Chem.*, 1972, **6**, 1349–1372.
- 22 J. M. Havard, M. Yoshida, D. Pasini, N. Vladimirov, J. M. J. Frechet, D. R. Medeiros, K. Patterson, S. Yamada, C. G. Willson and J. D. Byers, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 1999, **37**, 1225–1236.
- 23 N. Zhang, S. Huber, A. Schulz, R. Luxenhofer and R. Jordan, *Macromolecules*, 2009, **42**, 2215–2221.
- 24 Z. Kroneková, M. Mikulec, N. Petrenčíková, E. Paulovičová, L. Paulovičová, V. Jančinová, R. Nosál', P. S. Reddy, G. D. Shimoga, D. Chorvát and J. Kronek, *Macromol. Biosci.*, 2016, **16**, 1200–1211.
- 25 D. M. Dibona, R. F. Fibiger, E. F. Gurnee and J. E. Shuetz, *J. Appl. Polym. Sci.*, 1986, **31**, 1509–1514.
- 26 V. V. Jerca, F. A. Nicolescu, R. Trusca, E. Vasile, A. Baran, D. F. Anghel, D. S. Vasilescu and D. M. Vuluga, *React. Funct. Polym.*, 2011, **71**, 373–379.
- 27 R. R. Palem, S. D. Ganesh, N. Saha, J. Kronek and P. Sáha, *J. Polym. Res.*, 2018, **25**, 152.
- 28 C. Weber, T. Neuwirth, K. Kempe, B. Ozkahraman, E. Tamahkar, H. Mert, C. R. Becer and U. S. Schubert, *Macromolecules*, 2012, **45**, 20–27.
- 29 M. N. Leiske, A. M. Mahmoud, N. M. Warne, J. A. C. M. Goos, S. Pascual, V. Montembault, L. Fontaine, T. P. Davis, M. R. Whittaker and K. Kempe, *Polym. Chem.*, 2020, **11**, 5681–5692.
- 30 V. Raus, A. Hološ, J. Kronek and J. Mosnáček, *Macromolecules*, 2020, **53**, 2077–2087.
- 31 D. A. Tomalia, B. P. Thill and M. J. Fazio, *Polym. J.*, 1980, **12**, 661–675.
- 32 H. Feng, M. Changez, K. Hong, J. W. Mays and N. G. Kang, *Macromolecules*, 2017, **50**, 54–62.
- 33 M. Ceglowski, V. V. Jerca, F. A. Jerca and R. Hoogenboom, *Pharmaceutics*, 2020, **12**, 506.
- 34 F. A. Jerca, V. V. Jerca, A. M. Anghelache, D. M. Vuluga and R. Hoogenboom, *Polym. Chem.*, 2018, **9**, 3473–3478.
- 35 N. Zhang, S. Salzinger, B. S. Soller and B. Rieger, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 8810–8813.
- 36 B. S. Soller, S. Salzinger, C. Jandl, A. Pöthig and B. Rieger, *Organometallics*, 2015, **34**, 2703–2706.
- 37 H. Bian, X. Dong, S. Chen, D. Dong and N. Zhang, *Chin. Chem. Lett.*, 2018, **29**, 171–174.
- 38 H. Bian, X. Zhang, D. Huang and N. Zhang, *Chin. Chem. Lett.*, 2019, **30**, 311–313.
- 39 N. Zhang, M. Steenackers, R. Luxenhofer and R. Jordan, *Macromolecules*, 2009, **42**, 5345–5351.
- 40 A. Götzhäuser, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, **12**, 4273–4274.
- 41 N. A. Hutter, M. Steenackers, A. Reitering, O. A. Williams, J. A. Garrido and R. Jordan, *Soft Matter*, 2011, **7**, 4861–4867.
- 42 N. Zhang, T. Pompe, I. Amin, R. Luxenhofer, C. Werner and R. Jordan, *Macromol. Biosci.*, 2012, **12**, 926–936.
- 43 S. Zanini, L. Zoia, R. Della Pergola and C. Riccardi, *Surf. Coat. Technol.*, 2018, **334**, 173–181.
- 44 S. Zanini, M. Lehocky, J. Lopez-Garcia and C. Riccardi, *Thin Solid Films*, 2019, **677**, 55–61.
- 45 K. M. Chan, C. Amoura, A. Whiteley, J. Rouget, H. Safizadeh Shirazi, A. Cavallaro, K. Vasilev and M. MacGregor, *Biointerphases*, 2020, **15**, 051005.
- 46 J. He, Y. Zhang and E. Y. X. Chen, *Synlett*, 2014, 1534–1538.
- 47 M. Miyamoto, P. Lange, S. y. Kanetaka and T. Saegusa, *Polym. Bull.*, 1995, **34**, 249–256.
- 48 E. Paulovičová, Z. Kroneková, L. Paulovičová, M. Majerčíková and J. Kronek, *Materials*, 2021, **14**, 1371.
- 49 F. T. Reyes, E. L. Malins, C. R. Becer and M. A. Kelland, *Energy Fuels*, 2013, **27**, 3154–3160.
- 50 H. T. H. Nguyen, P. Qi, M. Rostagno, A. Feteha and S. A. Miller, *J. Mater. Chem. A*, 2018, **6**, 9298–9331.
- 51 T. Nishikubo, A. Kameyama and H. Tokai, *Polym. J.*, 1996, **28**, 134–138.
- 52 F. A. Jerca, V. V. Jerca and R. Hoogenboom, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2019, **57**, 360–366.
- 53 V. V. Jerca, F. A. Nicolescu, A. Baran, D. F. Anghel, D. S. Vasilescu and D. M. Vuluga, *React. Funct. Polym.*, 2010, **70**, 827–835.
- 54 F. A. Jerca, A. M. Anghelache, E. Ghibu, S. Cecoltan, I. C. Stancu, R. Trusca, E. Vasile, M. Teodorescu, D. M. Vuluga, R. Hoogenboom and V. V. Jerca, *Chem. Mater.*, 2018, **30**, 7938–7949.
- 55 X. Xu, F. A. Jerca, K. Van Hecke, V. V. Jerca and R. Hoogenboom, *Mater. Horiz.*, 2020, **7**, 566–573.
- 56 D. L. Schmidt, B. M. DeKoven, C. E. Coburn, G. E. Potter, G. F. Meyers and D. A. Fischer, *Langmuir*, 1996, **12**, 518–529.
- 57 D. L. Schmidt, R. F. Brady, K. Lam, D. C. Schmidt and M. K. Chaudhury, *Langmuir*, 2004, **20**, 2830–2836.
- 58 B. Kopka, B. Kost, K. Rajkowska, A. Pawlak, A. Kunicka-Styczyńska, T. Biela and M. Basko, *Soft Matter*, 2021, **17**, 10683–10695.
- 59 X. Xu, F. A. Jerca, V. V. Jerca and R. Hoogenboom, *Adv. Funct. Mater.*, 2019, **29**, 1–10.
- 60 X. Xu, F. A. Jerca, V. V. Jerca and R. Hoogenboom, *Macromolecules*, 2020, **53**, 6566–6575.