
Greffage « à partir de » Synthèse et propriétés en solution aqueuse de PDMAM-g-PBLG.

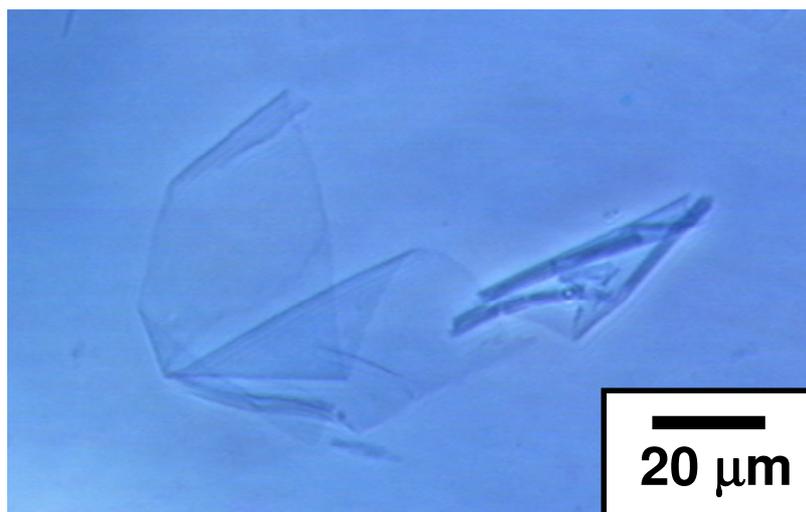


Figure 3-1. Agrégation de PDMAM-g-PBLG en solution aqueuse (0.5 % wt).

I - Introduction

Les membranes et vésicules de copolymères sont des superstructures intéressantes. Les vésicules ont des applications potentielles dans l'encapsulation de molécules ou de substances actives. Des vésicules à l'échelle du micromètre permettraient de les véhiculer et de les relarguer de façon contrôlée.

Les propriétés de structuration en solution de copolymères amphiphiles contenant un bloc non-soluble structuré en hélice- α ont été discutées dans la partie bibliographique. Les hélices- α non-solubles s'alignent parallèlement et s'agrègent. Cette agrégation peut-être limitée à deux dimensions lorsque les hélices- α sont reliées à un bloc soluble, ce dernier contraint l'association des hélices à un domaine monocouche bidimensionnel, permettant la formation de superstructures de types vésiculaires^{[1][2][4]}, de petits agrégats bidimensionnels^[3] ou de larges membranes.^{[1][2]}

Les systèmes présentés dans la littérature sont de type diblocs amphiphiles et les études sont réalisées dans l'eau. Le bloc homopolypeptide hydrophobe se structurant en hélice- α est de type poly(L-Valine)^[1], poly(L-Leucine)^{[2][3]}, poly(acide L-Glutamique)^[4] ou poly(L-Lysine)^[4]. Un bloc structuré en hélice- α hydrophile^[1], ou un bloc polyélectrolyte^{[2][3][4]} stabilisent l'agrégation en deux dimensions des hélices- α hydrophobes.

Ce comportement d'agrégation à deux dimensions n'est pas sans rappeler celui de copolymères contenant un bloc non-soluble cristallin. En solution, la présence d'un bloc soluble contraint la cristallisation à deux dimensions, et une interface plane peut-être obtenue.^{[5][6][7]} Il ressort que pour un dibloc plus riche en bloc cristallin, il se formera une interface plane.^{[5][6][7]} Tandis que si le dibloc est plutôt riche en bloc soluble, alors des structures micellaires sont observées.^{[6][8]}

Les copolymères contenant un bloc structuré en hélice- α montrent un comportement différent. La formation de superstructure de type membrane est rapportée avec moins de 20 %^[1] de monomère hydrophobe dont le bloc est structuré en hélice- α . La formation de vésicules est rapportée avec 25 %^[2] de monomère hydrophobe dont le bloc est structuré en hélice- α .

Dans ce chapitre, le système étudié est un copolymère hybride greffé de type PDMAM-g-PBLG. La taille des greffons PBLG a été fixée à environ quinze monomères par greffon, afin de stabiliser leur structuration en hélice- α ^[12] tout en travaillant avec des greffons courts. Pour un DP inférieur à 10, le PBLG se structure majoritairement en séquence- β .^[12] Le squelette utilisé est le même qu'au chapitre précédent. Il s'agit d'un copolymère de DMAM contenant quelques monomères possédant un groupe latéral aminé, APMA, permettant la synthèse de greffons PBLG par polymérisation de NCA correspondant. Ce squelette a un taux de fonctions amines de 4.7 %. Des greffons PBLG de cette taille permettent d'avoir un rapport de masse entre le PBLG et le PDMAM légèrement en faveur du PBLG (58 % en masse).

La synthèse ainsi que l'observation de l'association dans l'eau de ce copolymère amphiphile sont présentées dans ce chapitre.

II - Synthèse de PDMAM-g-PBLG

La synthèse de copolymères PDMAM-g-PBLG est réalisée par la méthode de greffage « à partir », selon le même principe que pour la synthèse de PDMAM-g-PLL. Dans un premier temps, un squelette PDMAM fonctionnalisé avec une quantité déterminée de fonctions amine primaire est préparé. Dans un second temps, la polymérisation de NCA BLG est initiée à partir de ce macroinitiateur PDMAM.

Le squelette PDMAM utilisé pour cette étude est le même que celui présenté dans le chapitre précédent. Il possède 4.7 % en mole de monomères aminés. La viscosité intrinsèque donne un $M_w \sim 50000 \text{ g.mol}^{-1}$. Comme dans la synthèse présentée dans le chapitre précédent, les fonctions amines latérales du squelette sont obtenues sous forme $-\text{NH}_3^+$ après le processus de purification du squelette P(DMAM-co-APMA) (dialyse contre eau millipore/lyophilisation.)

La polymérisation de monomère NCA BLG à partir de ce squelette est faite dans le DMF à 25°C. Dans cette synthèse, le NCA BLG a été préparé au laboratoire, à partir de l'acide α -aminé correspondant. La méthode de préparation et la polymérisation des NCA BLG sur le squelette sont détaillées dans cette partie.

Etant donné que les fonctions amines latérales du squelette P(DMAM-co-APMA) sont sous la forme $-\text{NH}_3^+$, la polymérisation des NCA sur cet amorceur multifonctionnel est très ralenti. En revanche, elle présente un contrôle amélioré par rapport à la polymérisation classique de NCA (cf. Chapitre 1, sous-partie III.1.5). Ce gain de contrôle est important dans le cas de la synthèse de copolymères hybrides selon le schéma « synthèse du macroamorceur puis polymérisation de NCA à partir du macroamorceur », car il interdit le mécanisme par « monomère activé », qui conduirait à un copolymère pollué par de l'homopolypeptide (cf. Chapitre 1, sous-partie III.1.2.b).

II.1 - Préparation de NCA-BLG

Contrairement aux autres synthèses présentées dans ce travail de thèse, les NCA BLG de cette étude ont été synthétisés au laboratoire à partir de l'acide α -aminé correspondant, le γ -benzyl-L-glutamate.

Différentes méthodes ont été décrites pour la cyclisation d'un acide α -aminé en NCA. La méthode classique emploie un équivalent de phosgène (COCl_2) par acide α -aminé à cycliser.^[11] Ce composé est un gaz très toxique, il est souvent avantageusement remplacé par le triphosgène, solide cristallin facilement manipulable.^[11] Une schématisation de la phosgénation d'acide α -aminé est donnée Figure 3-2. Chaque molécule de triphosgène peut théoriquement cycliser trois acides α -aminés.

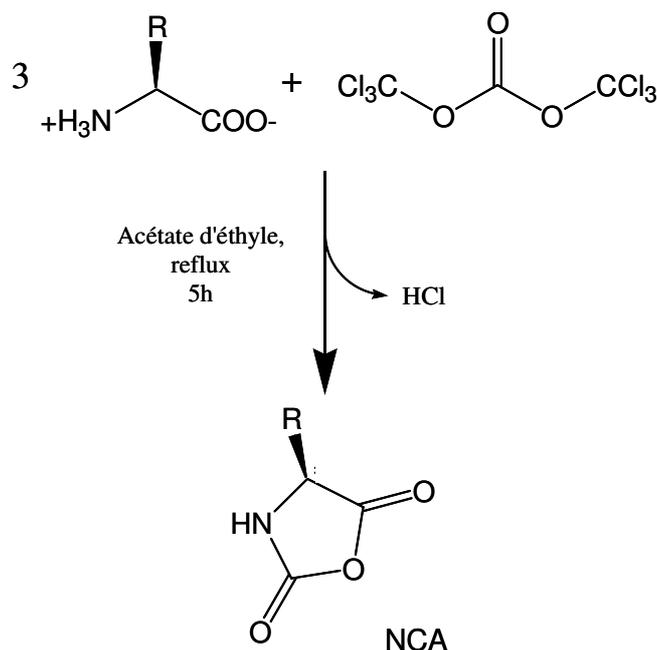


Figure 3-2. Synthèse de NCA à partir d'acides α -aminés

Pour l'étape de cyclisation, le choix du solvant est important. Les NCA sont très sensibles à l'eau, qui est un amorceur de la polymérisation à température ambiante ou supérieure, et ce dans n'importe quel solvant organique. Lors de la cyclisation, il vaut donc

mieux utiliser un solvant non miscible à l'eau, et bien le sécher. La cyclisation du γ -benzyl-L-glutamate est réalisée dans l'acétate d'éthyle.

Deux méthodes de cyclisation sont possibles. La première préconise d'ajouter un excès de triphosgène, afin de cycliser les sels d'acide α -aminé persistants, l'excès de triphosgène devant être retiré avec précaution lors des étapes de cristallisation/recristallisation des NCA.^[9] La deuxième méthode est celle utilisée dans cette étude. Pour éviter que le triphosgène ne soit présent dans le produit final, une quantité très légèrement inférieure au rapport 3/1 (acide α -aminé/triphosgène) est utilisée lors de la cyclisation.

15 g de γ -benzyl-L-glutamate ($6.33 \cdot 10^{-2}$ mol) et 80 mL d'acétate d'éthyle sont introduits dans un ballon tricol de 200 mL, équipé d'une colonne réfrigérante et d'une ampoule de coulée. Le γ -benzyl-L-glutamate est très peu soluble dans l'acétate d'éthyle. Le mélange, trouble, est agité vigoureusement. 6.2 g de triphosgène ($2.09 \cdot 10^{-2}$ mol) sont mis en solution dans 30 mL d'acétate d'éthyle et introduits dans l'ampoule de coulée. Le mélange dans le ballon est porté à reflux, sous courant d'azote et la solution de triphosgène est ajoutée mL par mL afin que la température du milieu réactionnel s'homogénéise rapidement. La réaction est menée pendant cinq heures avant d'être refroidie à 0°C dans un bain de glace.

La majorité de la vapeur s'élevant dans la colonne réfrigérante est recondensée et retombe sous forme liquide dans le milieu réactionnel. Néanmoins, il est intéressant de se débarrasser le plus possible de l'acide chlorhydrique qui se forme lors de la réaction de cyclisation car il est difficile de l'isoler lors des étapes ultérieures de purifications. Le fait de faire passer un flux d'azote dans le ballon tricol permet qu'une partie des gaz ne se condensent pas dans la colonne et s'échappent. Afin de neutraliser l'acide chlorhydrique, très toxique, les vapeurs passent par un premier bulleur contenant de l'acétate d'éthyle, avant d'être neutralisées en bullant dans une solution aqueuse saturée de soude. Le premier bulleur permet d'isoler le milieu réactionnel des traces d'eau pouvant provenir de la solution de soude.

Les étapes de purification et de cristallisation des NCA sont très importantes. En effet, des impuretés contenues dans le produit final peuvent limiter fortement la polymérisation des NCA, en particuliers lors de la synthèse de polypeptides de grande masse molaire. Il convient de retirer toutes traces de sel d'acide α -aminé n'ayant pas réagi. Une méthode très efficace consiste à réaliser un lavage par une solution aqueuse légèrement basique.^[10] Afin que l'eau n'amorce pas la polymérisation des NCA, les solutions d'acétate d'éthyle et aqueuse sont

mélangées à 0°C dans une ampoule à décanter. Cette étape est réalisée rapidement, sans agitation énergique et immédiatement suivie d'un séchage intensif de la phase organique sur MgSO₄. Cette méthode n'est pas adaptée à la purification de tous les NCA, elle est par exemple impossible lorsqu'aucun solvant organique non miscible à l'eau n'est trouvé pour le NCA.

Dans une ampoule à décanter, 100 mL d'une solution à 0°C de NaHCO₃ à 0.5 % est ajouté à la phase organique refroidit à 0°C également. Les deux solutions sont mélangées doucement. La phase aqueuse est jetée et la phase organique est séchée sur MgSO₄. Enfin, les NCA sont isolés par cristallisation. Dans le cas de NCA BLG, deux cristallisations successives sont réalisées. La cristallisation est réalisée à 0°C par ajout d'un volume d'hexane.

8g de NCA BLG sont récupérés, ce qui correspond à un rendement global de l'ordre de 50 %. Les NCA BLG sont stockés sous atmosphère inerte à -20°C.

II.2 - Synthèse de PDMAM-g-PBLG.

II.2.1 - Mode opératoire.

La synthèse de PDMAM-g-PBLG est menée en ballon dans du DMF distillé sur CaH₂ à 25°C. 3g ($1.37 \cdot 10^{-2}$ mol) de NCA BLG sont dissous dans 30 mL de DMF. 1.5g de P(DMAM-co-APMA) solubilisés dans 20 mL de DMF est ajouté dans le ballon. La réaction de polymérisation est menée pendant 5 jours. Compte tenu des quantités de P(DMAM-co-APMA) et NCA BLG utilisées, le DP visé des greffons est évalué à 20.

La solution de DMF est diluée dans cinq volumes d'eau et dialysée contre l'eau. La dialyse est menée pendant quatre jours, l'eau est changée trois fois par jour. La solution aqueuse du copolymère est lyophilisée et le copolymère récupéré est stocké à -20°C.

II.2.2 - Caractérisation du copolymère PDMAM-g-PBLG.

II.2.2.a) RMN 1H

La RMN 1H du copolymère obtenu permet de déterminer le degré de polymérisation moyen des greffons PBLG, suivant l'hypothèse que l'amorçage de la polymérisation des NCA BLG a été uniforme sur les 4.7 % de monomères aminés du squelette. La Figure 3-3 donne le spectre RMN 1H de PDMAM-g-PBLG obtenu dans le DMF D7.

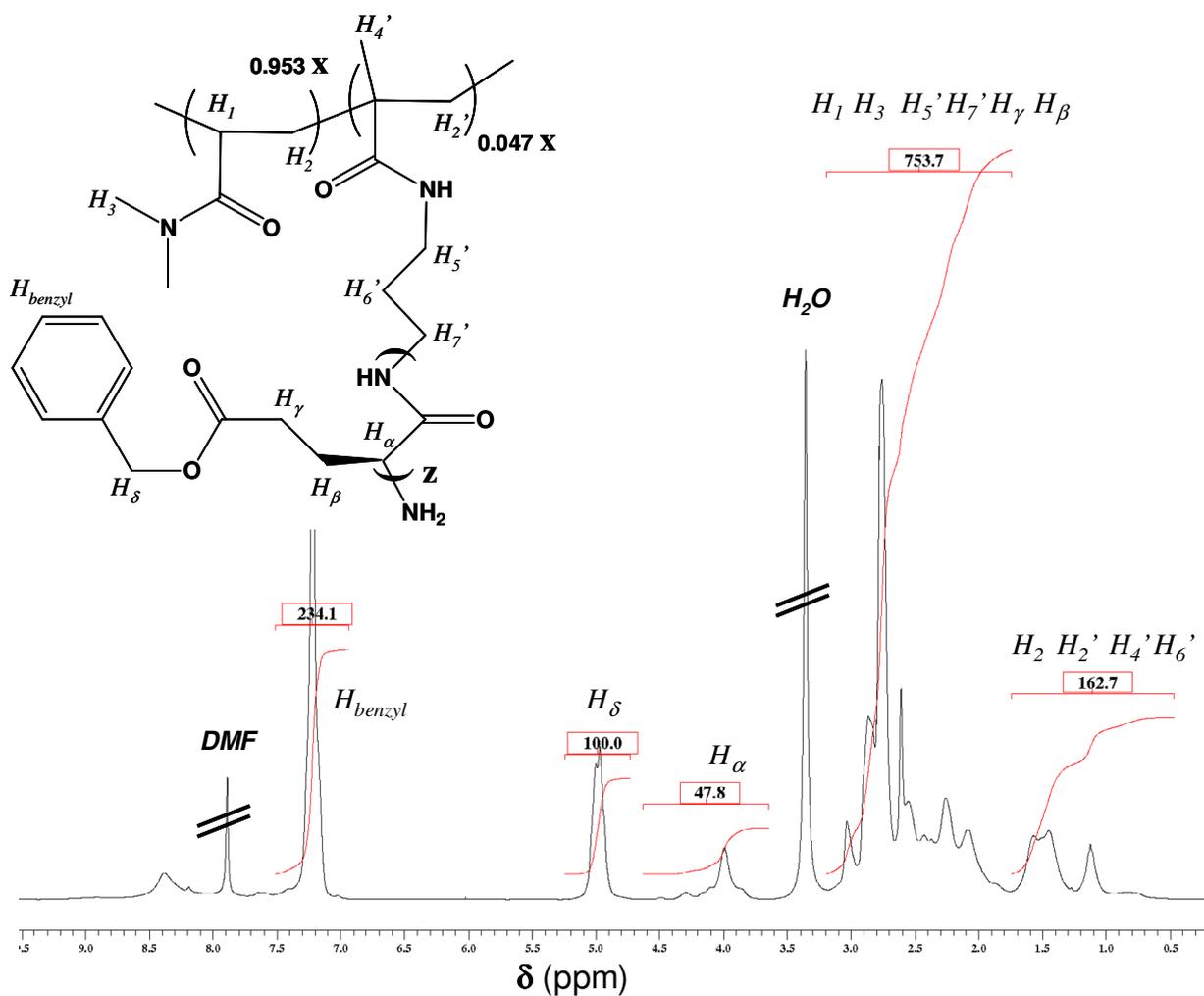


Figure 3-3. RMN 1H de PDMAM-g-PBLG dans DMF D7.

Une comparaison des intégrations du DMAM et du BLG donne un $DP = 13.5$. Comparé au DP visé de 20 monomères, près de 30 % du NCA BLG n'a pas polymérisé. Pour expliquer cette valeur, il faut tenir compte de l'amorçage et de la polymérisation qui sont contrôlés par $-NH_3^+$, ralentissant considérablement la cinétique de polymérisation des NCA, comme discuté Chapitre I, paragraphe III.1.5. Agut *et al.* ont étudié la polymérisation de NCA BLG amorcée par une Jeffamine (copolymère statistique de PEO et PPO) fonctionnalisée par amine primaire.^[17] Dans cette étude, le rapport NH_3^+/NH_2 des amorceurs a été varié. A 100 % de d'amine sous la forme $-NH_3^+$, ils observent que la conversion est de 45 % après trois jours de polymérisation de NCA BLG, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus ici. En revanche, à 0 ou 10 % d'amorceur sous forme NH_3^+ , la conversion est presque de 100 %.

II.2.2.b) SEC

L'éluant de la SEC est le DMF LiBr à 0.1M. Les mesures sont réalisées à 40°C (cf Article II, partie expérimentale pour les détails techniques sur l'appareillage et les colonnes utilisées).

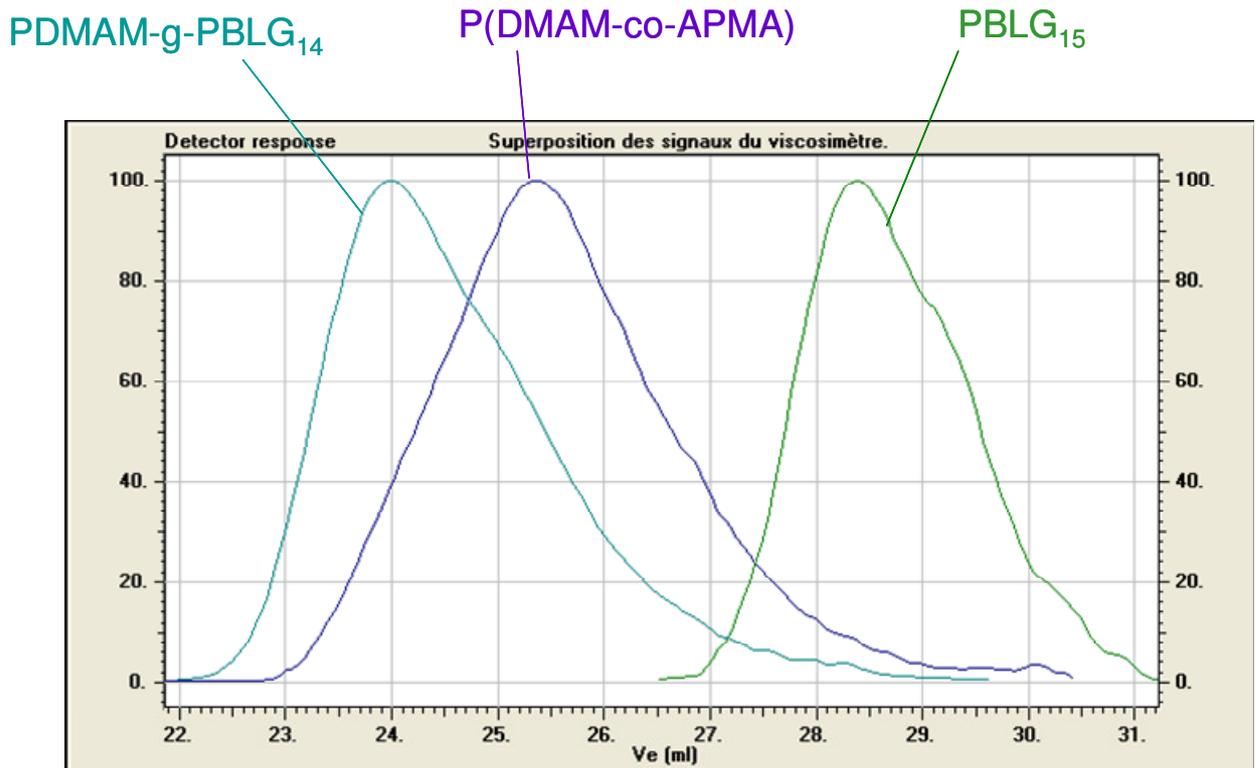


Figure 3-4. Signal viscosimétrique en pleine échelle de PBLG₁₅, du squelette P(DMAM-co-APMA) et du copolymère greffé PDMAM-g-PBLG₁₄.

Des solutions de PDMAM-g-PBLG₁₄, P(DMAM-co-APMA) et PBLG₁₅ à 0.5 % en masse dans le DMF/LiBr (0.1 M) ont été préparées afin d'observer la distribution des chaînes par SEC. Le PBLG₁₅ a été préparé selon la méthode décrite au Chapitre 4 paragraphe VIII. La Figure 3-4 donne la superposition des signaux observés par le viscosimètre. Il y a un net décalage du pic de PDMAM-g-PBLG par rapport au squelette P(DMAM-co-APMA) vers les faibles volumes d'élution. Cela correspond à une augmentation de la masse molaire du copolymère. La translation nette du signal du copolymère, confirme que le greffage se fait sur toutes les chaînes.

III - Comportement de PDMAM-g-PBLG en solution aqueuse.

Le copolymère est soluble dans l'eau, pour des concentrations massiques inférieures à environ 7 %, au-delà, le copolymère se solubilise partiellement.

Pour des concentrations supérieures à 1 % en masse, les solutions sont transparentes et légèrement bleutées. Ces solutions sont stables sur une période de temps de plusieurs mois.

Pour des concentrations inférieures à 1 % en masse, il y a apparition d'un léger précipité blanc dans le fond de la solution après quelques jours à température ambiante. La taille de ce précipité augmente au fil des semaines. Le volume du précipité n'évolue plus après cette période d'un mois environ. Lorsque les solutions sont agitées, elles se troublent rapidement. Après 24h, un précipité blanc est obtenu, de volume équivalent à celui obtenu après un mois sans agitation. La Figure 3-5 montre deux photos correspondantes à une solution de PDMAM-g-PBLG à 0.5 % en masse, avant et après une agitation de 24h à 20 tours par minutes.

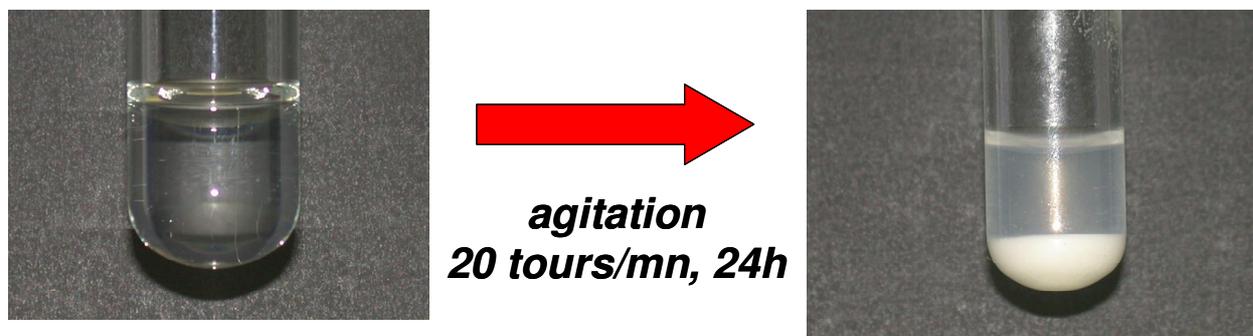


Figure 3-5. Solution aqueuse de PDMAM-g-PBLG à 0.5 % en masse agitée pendant 24h.

Les agrégats formés dans le cas de solutions diluées ont été observés par microscopie optique et confocale, ainsi que par microscopie électronique après cryofracture.

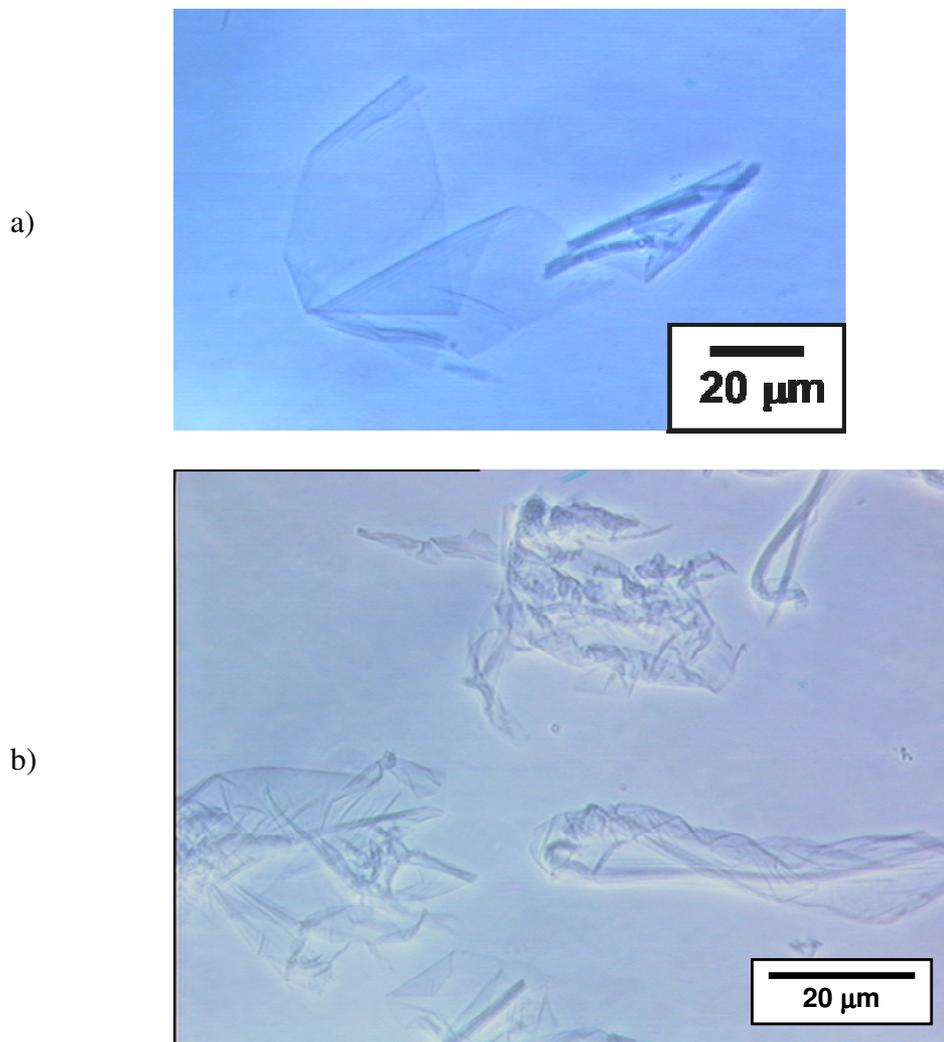
III.1 - Observations en microscopie optique et confocale.

Des solutions de PDMAM-g-PBLG dans l'eau ont été préparées dans des tubes à essais fermés. Les solutions sont agitées à l'agitateur rotatif.

Les photos présentées ici ont été obtenues entre lame et lamelle, à partir d'une goutte de la solution déposée sur la lame. La microscopie optique a été effectuée en contraste de phase,

la microscopie confocale, en transmission (l'emploi de marqueur fluorescent n'a pas apporté d'information supplémentaire pour l'instant).

A l'échelle de la dizaine de micromètres, des superstructures macroscopiques sont observés. Elles sont de deux types : de larges membranes régulières (représentées Figure 3-6) ou des formations similaires de formes sphériques qui ressemblent à des vésicules géantes (représentées Figure 3-7). Les superstructures de forme sphériques sont plutôt observées lorsque l'agitation des solutions correspondantes était vigoureuse (60 tours par minute). En revanche, les superstructures de type membrane sont observées dans toutes les conditions, même quand les solutions n'ont pas été agitées (dans ce cas, elles sont présentes après quelques jours à température ambiante).



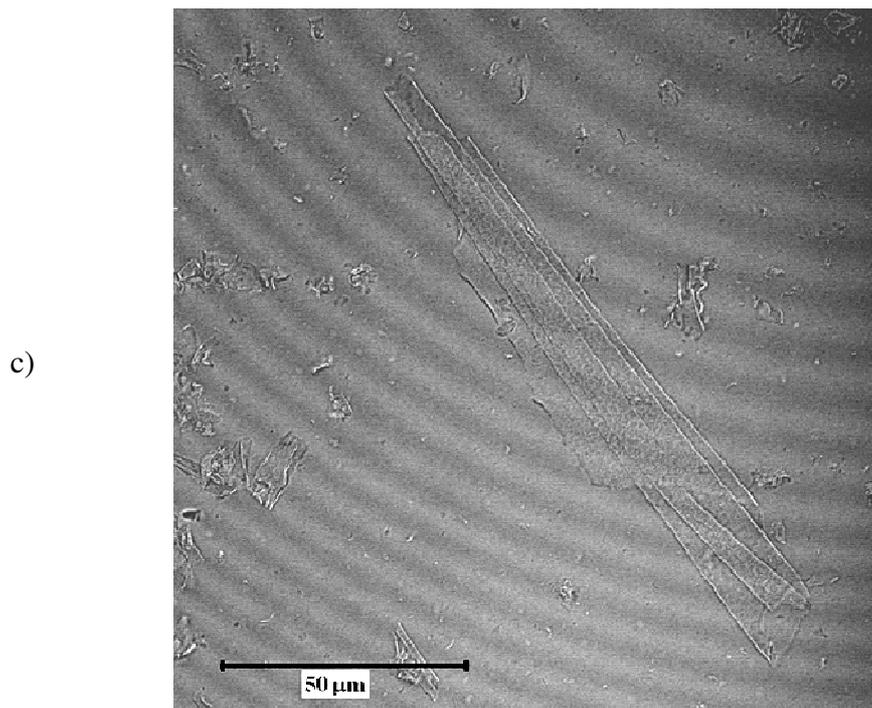
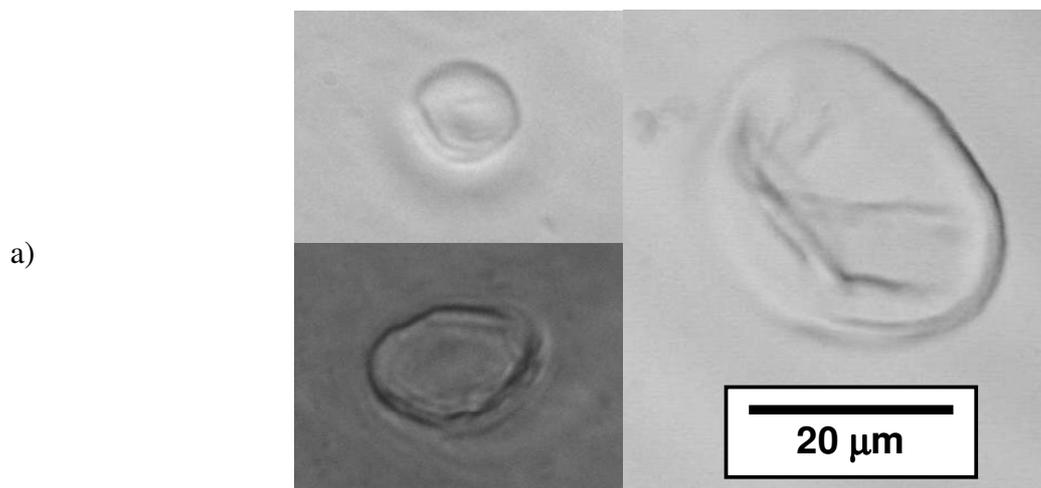


Figure 3-6. Agrégats de PDMAM-g-PBLG dans l'eau. a - 0.5 % en masse, observation par microscopie optique en contraste de phase. b- 0.1 % en masse, observation par microscopie optique en contraste de phase. c - 0.5 % en masse, observation en microscopie confocale.



b)

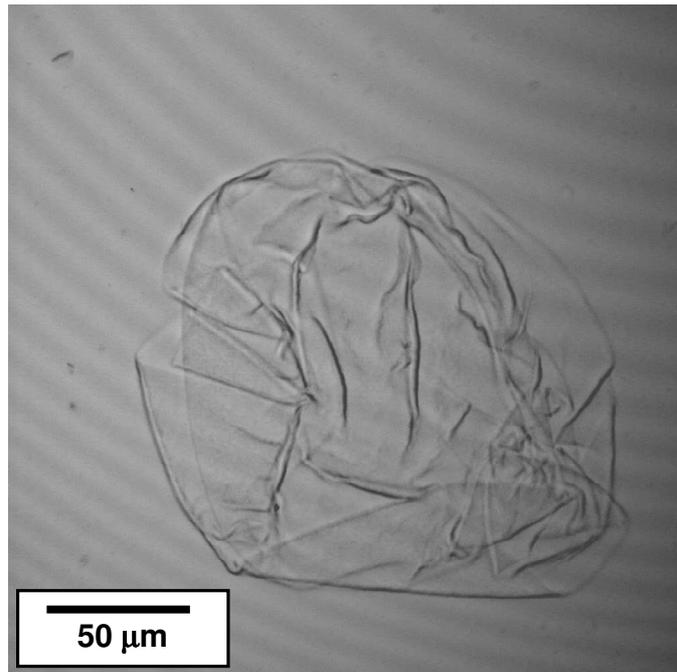


Figure 3-7. Agrégats de PDMAM-g-PBLG dans l'eau. a - 0.5 % en masse, observation par microscopie optique en contraste de phase. b- 0.1 % en masse, observation en microscopie confocale.

La Figure 3-6-c met également en évidence la présence d'agrégats plus petits, de l'ordre de grandeur du micromètre et inférieur. Des observations TEM après cryofracture permettent de travailler à des échelles de l'ordre de la centaine de nanomètres, afin de pouvoir observer ces agrégats.

III.2 - Observation en cryofracture/TEM

Une solution à 0.5 % en masse de PDMAM-g-PBLG a été préparée dans le mélange eau/glycérol (7/3 en masse). Des clichés obtenus en TEM après cryofracture sont présentées Figure 3-8 et Figure 3-9.

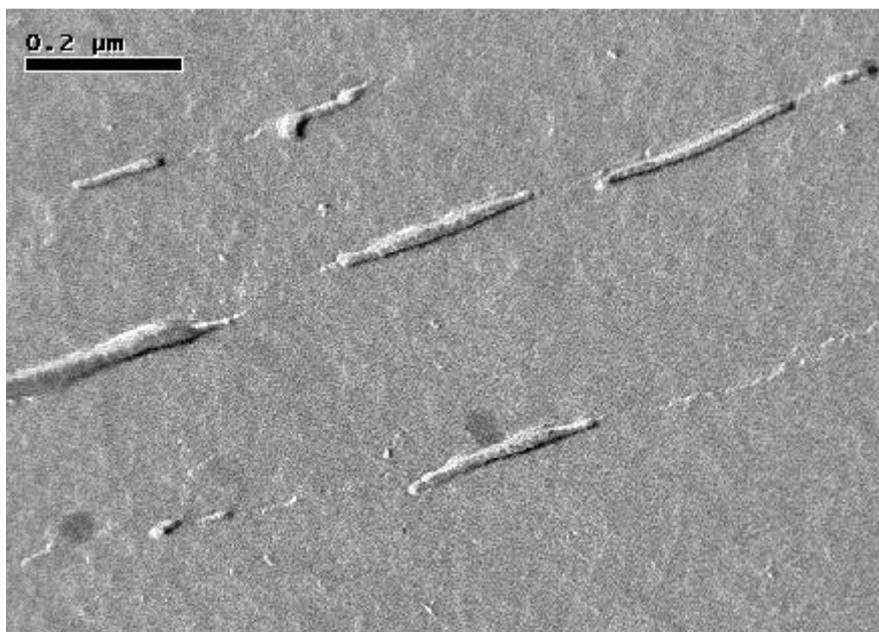


Figure 3-8. Cryofracture/observations TEM de PDMAM-g-PBLG à 0.5 % en masse dans eau/glycérol (7/3).

La Figure 3-8 met en évidence la formation d'agrégats de type fibrillaire, d'un diamètre de l'ordre de la dizaine de nanomètres pour des longueurs de l'ordre de plusieurs centaines de nanomètres. Le fait que sur cette photo ces structures soient parallèles est sans doute dû à l'alignement de ces petites fibrilles dans le sens de l'écoulement, étant donné leurs profils hydrodynamique particuliers. Deming *et al.* rapportent la formation de fibrilles pour des copolymères diblocs poly(L-Leucine)-b-PLL contenant 33 % de L-Leucine. Dans ce système, le bloc PLL est de type polyélectrolyte.

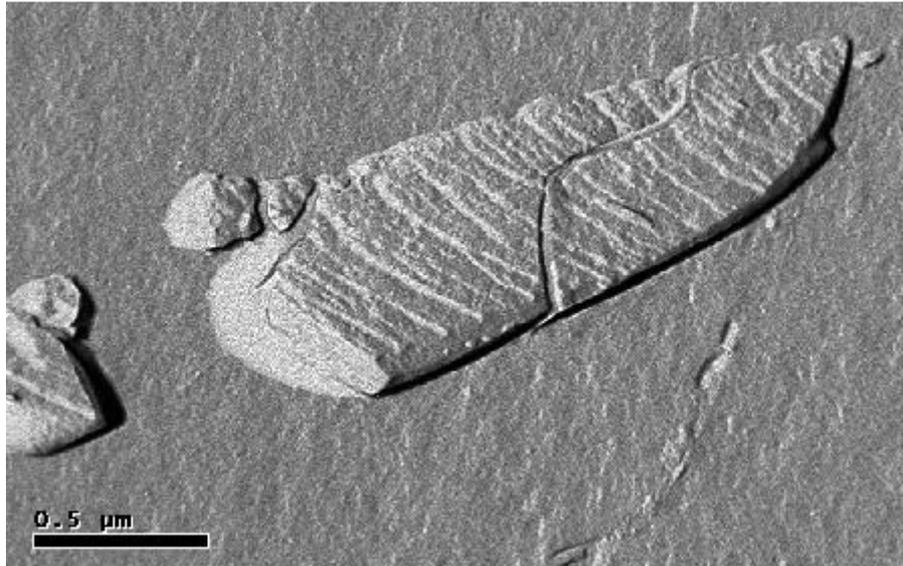


Figure 3-9. Cryofracture/observations TEM de PDMAM-g-PBLG à 0.5 % en masse dans eau/glycérol (7/3).

La Figure 3-9 montre un agrégat aplati de l'ordre de grandeur du micromètre. Des agrégats d'aspects similaires ont été observés pour des copolymères poly(L-Leucine)₃₀₀-b-poly(ALG)₁₀₀ formant des structures planes appelées « platelets ».^[3] Les auteurs mettent en évidence un arrangement bidimensionnel et monocouche des blocs poly(L-Leucine) structurés en hélice- α .

III.3 - Structure secondaire des greffons PBLG (FTIR)

La FTIR permet de déterminer la structure secondaire des polypeptides. Le suivi des bandes amides-I et amides-II permet de déterminer la conformation des fonctions amides du squelette peptidique. L'attribution des contributions hélice- α (enroulement gauche ou droit), feuillet- β (parallèles et antiparallèles) ou pelote est bien documentée.^{[12][13][14][15][16]}

Les spectres en absorbance du squelette P(DMAM-co-APMA) seul, de PDMAM-g-PBLG à 0.5 %wt en solution dans D₂O avant et après formation d'agrégats sont donnés Figure 3-10.

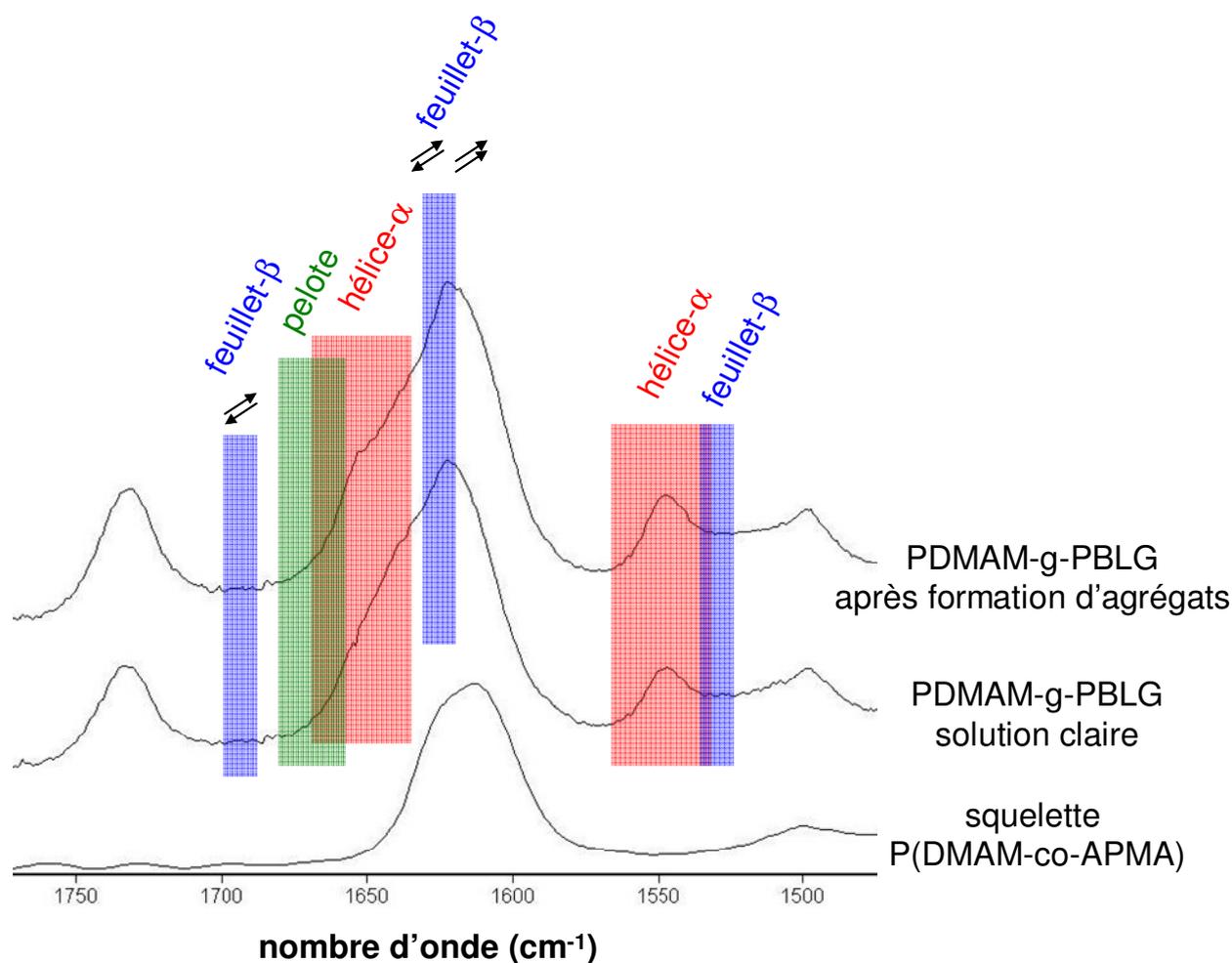


Figure 3-10. Spectres FTIR en absorbance du squelette P(DMAM-co-APMA) et d'une solution de PDMAM-g-PBLG dans D2O avant et après formation d'agrégats.

La FTIR met en évidence que la majorité du PBLG est structuré en hélice- α (1547 cm^{-1}), avec également une petite proportion assemblée en feuillet- β (1624 cm^{-1}). Il est difficile de voir clairement la contribution de l'hélice- α sur la bande amide-I ($\sim 1655\text{ cm}^{-1}$). En effet, la contribution du squelette, ainsi que celle de la conformation pelote sont épaulées avec celle de la vibration C=O de l'hélice- α . En revanche, la bande amide II montre clairement la formation d'hélice- α à 1547 cm^{-1} . Sur les deux spectres de PDMAM-g-PBLG, une contribution autour de 1624 cm^{-1} , typique d'assemblage en feuillet- β , est visible. Néanmoins, la proportion de PBLG structurée en feuillet- β est faible, car les contributions à 1693 et 1525 cm^{-1} ne sont pas visibles. La proportion d'hélice- α augmente après formation des agrégats comme le montre l'augmentation relative de la contribution autour 1655 cm^{-1} . Il est difficile

de voir quelle contribution, parmi pelote, feuillet- β ou les deux, a diminué en intensité par compensation. Cette variation peut-être attribuée à un arrangement compacte en hélice- α , qui favorise la formation d'hélices et limite le mouvement de celles-ci.

Pour ce copolymère, la taille moyenne des hélices- α devrait être de l'ordre de 2 nm en longueur, en comptant une translation de 0.15 nm par monomère.

IV - Conclusion

La synthèse d'un copolymère hybride de type PDMAM-g-PBLG, avec 4.7 % de greffons par rapport au nombre de monomère du squelette a été effectuée. Les greffons PBLG ont un degré de polymérisation moyen de l'ordre de 14, la FTIR montre qu'ils adoptent majoritairement une conformation en hélice- α , avec également une faible proportion assemblée en feuillet- β . Ces constatations sont cohérentes avec les données présentes dans la littérature.^[12]

Ces copolymères sont amphiphiles, le squelette PDMAM est hydrophile, les greffons PBLG sont hydrophobes. En solution aqueuse, ce copolymère forme plusieurs types d'agrégats, selon l'échelle à laquelle est regardée la solution :

- la cryofracture met en évidence la formation d'agrégats de type fibrillaire, d'un diamètre de l'ordre de la dizaine de nanomètres pour des longueurs de l'ordre de plusieurs centaines de nanomètres.

- la cryofracture met également en évidence la formation la formation d'agrégats aplatis de l'ordre de grandeur de quelques micromètres.

- les microscopies optique et confocale mettent en évidence la formation d'agrégats à l'échelle de la dizaine à la centaine de micromètres. Ces agrégats sont de larges membranes régulières ainsi que des formations similaires de formes sphériques.

Le comportement d'agrégation présenté provient de l'influence des greffons PBLG structurés en hélice- α . Nous n'avons pas réussi à mesurer l'épaisseur des agrégats. Néanmoins, si on se base sur les études qui mettent en évidence des superstructures obtenues par agrégation d'hélice- α , on peut supposer que les membranes présentées ci-dessus sont formées par l'arrangement compact parallèle des greffons PBLG. Nous supposons que la cristallisation des greffons PBLG est limitée à une ou deux dimensions à cause de la présence du squelette PDMAM hydrophile qui forme des boucles et des queues sur la surface des agrégats.

V - Références et Notes

- [1] Bellomo E. G., Wyrsta M. D., Pakstis L., Pochan D. J., Deming T. J., *Nature Materials*, **2004**, 3, 244.
- [2] Holowka E. P., Pochan D. J., Deming T. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 12423.
- [3] Constancis A., Meyrueix R., Bryson N., Huille S., Grosselin J.-M., Gulik-Krzywicki T., Soula G., *J. of Colloid and Interface Sci.*, **1999**, 217, 357.
- [4] Rodriguez-Hernandez J., Lecommandoux S., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 2026.
- [5] Whitmore M. D., Noolandi J., *Macromolecules*, **1988**, 21, 1482.
- [6] Vilgris T., Halperin A., *Macromolecules*, **1991**, 24, 2090.
- [7] Gast A. P., Vinson P. K., Cogan-Farinas K. A., *Macromolecules*, **1993**, 26, 1774.
- [8] Massey J. A., Temple K., Cao L., Rharbi Y., Raez J., Winnik M. A., Manners I., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 11577.
- [9] Dorman L. C., Shiang W. R., Meyers P. A., *Synth. Comm.*, **1992**, 22, 3257.
- [10] Poché D. S., Moore M. J., Bowles J. L., *Synth. Comm.*, **1999**, 29, 843.
- [11] Daly W. H., Poche D. S., *Tet. Lett.*, **1988**, 29, 5859.
- [12] Papadopoulos P., Floudas G., Klok H.-A., Schnell I., Pakula T., *Biomacromolecules*, **2004**, 5, 81.
- [13] Blout E. R., Loze C. D., Bloom S. M., Fasman G. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, 82, 3787.
- [14] Vass E., Holly S., Majer Zs., Samu J., Laczko I., Hollosi M., *J. Of Molecular Structure*, **1997**, 408, 47.
- [15] Simonetti M., Di Bello C., *Biopolymers*, **2001**, 62, 95.
- [16] Lee N. H., Frank C. W., *Langmuir*, **2003**, 19, 1295.
- [17] Agut W., Brûlet A., Taton D., Lecommandoux S., *Langmuir*, **2007**, 23, 11526.