

VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS FAKULTETAS
POLIMERŲ CHEMIJOS KATEDRA

Jana Niedritis

Magistrantūros studijų programa Chemija – 2 kursas

**POLI(URETANKARBAMIDINIŲ) KAPSULIŲ IŠ
POLI(VINILALKOHOLIO), 2,4-TOLUENDIIZOCIANATO IR ĮVAIRIŲ
DIAMINŲ SINTEZĖ IR TYRIMAS**

Magistro studijų baigiamasis darbas

Darbo vadovai: Prof. dr. S. Budrienė
Dokt. S. Mačiulytė

(Vadovo mokslinis laipsnis, mokslo pedagoginis vardas, vardas, pavardė)

Įvertinimas:

(data, įvertinimas, parašas)

Vilnius, 2016

SANTRUMPOS

BDA	1, 4 – diaminobutanas
DA	diaminas
EDA	etandiaminas
IE	imobilizavimo efektyvumas
IP	imobilizuotas preparatas
MG	maltogenazė
PAM	paviršinio aktyvumo medžiaga
PDA	1, 3 - diaminopropanas
pHMDI	poli(heksametilendiizocianatas)
PUU	poli(uretankarbamidas)
PUUK	poli(uretankarbamidinės) kapsulės
PVA	poli(vinilo alkoholis)
SPAN 85	sorbitano trioleatas
TDI	2, 4-toluendiizocianatas

TURINYS

IVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	6
1.1 Fermentai ir jų imobilizavimo būdai	6
1.2 Kapsuliavimas	9
1.2.1 Kapsuliavimo metodai	9
1.3 Poli(uretankarbamidų) ir poli(uretankarbamidinių) kapsulių sintezė	12
2. EKSPERIMENTINĖ DALIS	17
2.1 Naudotos medžiagos ir reagentai	17
2.1.1 Polimerai	17
2.1.2 Organinės medžiagos	17
2.1.3 Neorganinės medžiagos	18
2.1.4 Tirpikliai	19
2.1.5 Fermentai	19
2.2 Tirpalai	20
2.2.1. Tirpalai maltogenazei imobilizuoti ir fermento aktyvumui nustatyti	20
2.2.2. Pradinis maltogenazės tirpalas	20
2.2.3. Krakmolo tirpalas maltogenazės aktyvumui nustatyti	20
2.2.4. Tirpalai redukuojančių cukrų kiekiui nustatyti Neokuproino metodu	20
2.2.4.1. Tirpalas A	20
2.2.4.2. Tirpalas B	20
2.3. Metodai	20
2.3.1. Poli(uretankarbamidinių) kapsulių gavimas	20
2.3.2. MG imobilizavimas PUUK po jų sintezės	21
2.3.3 MG imobilizavimas PUUK sintezės metu	21
2.3.4. PUUK apvalkalo išėigos apskaičiavimas	21
2.3.5. Izocianato grupių kiekio nustatymas	21
2.3.6. Maltogenazės aktyvumo nustatymas	22
2.3.6.1. Pradinio maltogenazės tirpalo aktyvumo nustatymas	22
2.3.6.2. MG aktyvumo nustatymas ant IP	22
2.3.6.3. Redukuojančių cukrų kiekio nustatymas Neokuproino metodu	22
2.3.6.4. Maltogenazės imobilizavimo efektyvumo skaičiavimas	23
2.3.6.5. Fermento pasišalinimo skaičiavimas	23
2.3.7. Spektroskopinis PUUK tyrimas	23
2.3.8. PUUK tyrimas optiniu ir skenuojančiu elektroniniu mikroskopu	23

2.3.9. PUUK paviršiaus ploto ir porų dydžio nustatymas	23
2.3.10. PUUK elementinė analizė	23
2.3.11. PUUK terminė analizė	23
3. DARBO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	24
3.1. PUUK sintezė iš PVA, TDI ir EDA	24
3.2 PUUK sintezė iš PVA, TDI ir BDA	28
3.3 PUUK sintezė iš PVA, TDI ir PDA	32
3.4 PUUK apvalkalo sandaros tyrimas	36
3.5 MG imobilizavimo PUUK ir pasišalinimo iš jų tyrimas	41
4. IŠVADOS	48
PUBLIKACIJOS	49
SUMMARY	50
5. LITERATŪROS SĄRAŠAS	51

ĮVADAS

Kapsuliavimas – tai procesas, kurio metu įvairaus dydžio kietos, skystos, dujinės dalelės ar medžiagų mišinys yra padengiamas apsauginiu apvalkalu (membrana). Jis gali būti gamtinis, dirbtinis ar sintetinis. Jo funkcija – apsaugoti įkapsuliuotą medžiagą nuo aplinkos poveikio, prailginti jos gyvavimo trukmę, užmaskuoti organolepitines savybes. Apvalkalą sudarančios medžiagos gali būti: poliuretanai, poliesteriai, polikarbamidai, celiuliozės dariniai ir kt. Įkapsuliuojamos medžiagos: fermentai, vaistai, baltymai, peptidai ir kt.

Poli(uretanai) (PU) ir poli(uretankarbamidai) (PUU) plačiai naudojami automobilių ir pakavimo medžiagų gamyboje, tekstilės pramonėje, medicinoje, biotechnologijos ir biochemijos srityse. Poli(uretanai) susidaro poliadicijos metu reguojant di- ar polifunkciniams izocianatams su di- ar polifunkciniais hidroksijunginiais. Reakcijos terpėje esant vandens ir/arba diaminių susidaro poli(uretankarbamidai) [1, 2].

Fermentų imobilizavimas – aktuali tema šiuolaikiniame pasaulyje, nes fermentai yra brangūs, labai jautrūs aplinkos poveikiams ir juos sunku gauti, išgryninti. Vienas iš fermentų imobilizavimo būdų yra jų įkapsuliavimas – padengimas polimeriniu apvalkalu, pvz., PU ir PUU. Tai leidžia prailginti fermentų veikimo trukmę ir sumažinti jų jautrumą aplinkos poveikiams [3].

Šio darbo tikslas:

- Susintetinti ir ištirti poli(uretankarbamidines) kapsules iš poli(vinilo alkoholio), 2,4-toluendiizocianato bei įvairių diaminių.

Darbo uždaviniai:

- Susintetinti poli(uretankarbamidines) kapsules (PUUK) iš poli(vinilo alkoholio), 2,4-toluendiizocianato ir diaminių (DA): etandiamino, 1,3-diaminopropano, 1,4-diaminobutano;
 - Ištirti reakcijos sąlygų įtaką PUUK sintezei, keičiant PVA ir DA molinį santykį bei DA įdėjimo laiką nuo reakcijos pradžios;
 - Imobilizuoti maltogenazę ir ištirti jos pasišalinimą iš poli(uretankarbamidinių) kapsulių.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Fermentai ir jų imobilizavimo būdai

Fermentai yra biologiniai katalizatoriai, kurie pagreitina biochemines reakcijas gyvuose organizmuose. Jie gali būti išgaunami iš ląstelių ir vėliau panaudojami komerciniuose procesuose, pavyzdžiui, biotechnologijose, gaminant saldikius, skalbimo priemones ir kt. Žodis „fermentas“ kilęs iš graikų kalbos, pirmą kartą buvo paminėtas 1878 metais, kai Vilhelmas Kiune aprašė mielių gebėjimą iš cukraus gaminti alkoholį [4].

Kaip katalizatoriai fermentai turi visiems nebiologiniams katalizatoriams būdingas savybes:

- ✓ Reakcijos metu nepakinta;
- ✓ Efektingi, esant mažoms koncentracijoms;
- ✓ Katalizatoriai neveikia reakcijos pusiausvyros, jie katalizuoja tiesiogines ir grįžtamas reakcijas.

Tačiau fermentai labai skiriasi nuo nebiologinių katalizatorių:

- ✓ Fermentai yra saviti, jie katalizuoja substrato virtimą produktu, reakcijos metu nesusidaro pašalinių produktų. Aukščiausias savitumo lygis – galima atskirti net optinius izomerus, Pvz., L-aminorūgščių oksidazės oksiduoja tik L-aminorūgštis, o D-aminorūgščių oksidazės – D-aminorūgštis;
- ✓ Fermentai žymiai aktyvesni, o fermentinės reakcijos greitis keliomis eilėmis didesnis, negu veikiant cheminiais katalizatoriais;
- ✓ Fermentų veiklą galima reguliuoti, ir priklausomai nuo poreikių, aktyvumą galima padidinti arba sumažinti. Fermentinis aktyvumas gali būti reguliuojamas juos kovalentiškai modifikuojant, prijungiant įvairius baltymus, aktyviklius, slopiklius;
- ✓ Fermentinės reakcijos vyksta švelniose sąlygose – kambario temperatūroje, atmosferos slėgyje ir esant neutraliai reakcijos pH terpei. Cheminiai katalizatoriai – atvirkščiai: naudojami aukštoje temperatūroje ir slėgyje, esant didelėms rūgščių arba šarmų koncentracijoms [5].

Fermentų panaudojimas yra ribojimas: dėl tam tikro galiojimo laiko, mažo atsparumo temperatūrai, pH, tirpikliams, rūgštims, šarmams, druskoms ir oksidaciniams procesams, dėl didelės gryninimo kainos. Be to, vandenyje tirpius fermentus sunku regeneruoti iš vandeninių tirpalų, todėl dažnai jų negalima pakartotinai naudoti. Norit išvengti šių problemų, biologiniai katalizatoriai yra imobilizuojami [5-7]. Pagrindinės imobilizuojamų fermentų sistemų sudedamosios dalys yra fermentas, matrica ir jų jungimo būdas. Fermentai prie nešiklių gali būti prijungiami įvairiai, pradedant nuo grįžtamosios fizikinės adsorbcijos, joninių ryšių, baigiant kovalentiniais ryšiais, susiuvimu. Svarbu atsiminti, kad, imobilizuojant fermentą, jis gali keisti savo fizikines ir chemines

savybes, priklausomai nuo pasirinkto imobilizavimo būdo. Egzistuoja keturi metodai fermentams imobilizuoti [8]:

- ✓ Fizikinis adsorbcijos metodas;
- ✓ Įterpimo metodas;
- ✓ Skersinių ryšių arba susiuvimo metodas;
- ✓ Kovalentinių ryšių metodas;

Fizikinis adsorbcijos metodas gali būti apibrėžiamas kaip vienas iš paprastų grįžtamojo imobilizavimo metodų. Šis metodas pasižymi tuo, kad fermentas adsorbuojasi ir prisitvirtina ant nešiklio. Adsorbcija gali vykti dėl įvairių sąveikų, pavyzdžiui, *Van Der Waals'o*, hidrofobinės sąveikos, vandenilinių ryšių, o joniniai ryšiai su fermentu gali susidaryti tik esant druskų tipo ryšiams.

Fizikinės adsorbcijos metu nešiklis arba elektrodas įmerkiamas į fermento tirpalą ir paliekamas kuriam laikui, o nesiadsorbavęs fermento kiekis pašalinamas jį išplaunant. Tačiau šios santykinai silpnos sąveikos turi vieną trūkumą: vyksta fermento pasišalinimas iš matricos. Kai fermento imobilizavimo metu tarp jo ir matricos susidaro joninė sąveika, ji remiasi baltymo ligandų tarpusavio santykių principu, naudojamu chromatografijos metuose, kuris pirmą kartą buvo panaudotas jonų mainuose.

Kai fermentas praranda savo aktyvumą, nešiklis švelniomis sąlygomis regeneruojamas ir vėl vykdomas fermento imobilizavimas. Tai atliekama dėl ekonominių priežasčių, nes nešiklio kaina – vienas iš lemiančių faktorių imobilizuojant fermentą.

Straipsnyje [9] autoriai aprašo lipazės įkapsuliavimą chitozono sferose. Naudojant „švirkšto“ metodą, gaunamos įvairių dydžių chitozono sferos. Klampus chitozono tirpalas išspaudžiamas iš švirkšto į maišomą natrio šarmo tirpalą etanolyje. Suformuotos chitozono sferos panardinamos į lipazės tirpalą ir vyksta statinė fermento adsorbcija.

Įterpimo metodas – fermentų imobilizavimo būdas, kurio metu fermentas įterpiamas į pluošto vidų, kristalinę gardelę arba polimerinę membraną. Pro supančias fermentą medžiagas praeina substratas ir produktai. Tokių imobilizuotų preparatų palyginus geros mechaninės savybės, o įterptas fermentas nesąveikauja su polimeru, todėl išvengiama denatūracija. Šis metodas leidžia sukurti tobulas sąlygas fermentui, pavyzdžiui, tinkamą pH. Imobilizuojant šiuo būdu, naudojamos įvairios medžiagos: polimerai, zoliai-geliai ir polimeras/zolis-gelis kompozicijos arba kitos neorganinės medžiagos. Dažniausiai naudojami polimerai: alginatas, kolagenas, poliakrilamidas, želatina, silikoninis kaučiukas, poliuretanai. Šiuo metodo trūkumai [8, 10, 11]:

- ✓ įkapsuliuotos medžiagos deaktyvacija imobilizavimo metu,
- ✓ fermento pasišalinimas iš matricos dėl jo ir nešiklio porų dydžių neatitikimo.

Susiuvimas vyksta, kai formuojasi tarpmolekuliniai skersiniai ryšiai tarp fermento molekulių, naudojant daugiafunkcinius reagentus. Dažniausiai naudojamas glutaraldehidas, nes yra pigus ir aktyvus. Gaunami susiūti baltymai, vykstant aldolinei kondensacijai tarp laisvų lizino aminogrupių ir glutaraldehido grupių. Šis procesas negrįžtamas.

Vienas iš plačiausiai naudojamų fermentų imobilizavimo metodų – kovalentinių ryšių susidarymas tarp fermento ir nešiklio. Metodo privalumas tas, kad fermentas nepereina į tirpalą net naudojant ilgą laiką. Reakcijoje su nešikliu gali dalyvauti įvairios funkcinės grupės, įeinančios į fermento aminorūgščių grandžių sudėtį: karboksi- (glutamo ir asparto rūgštys), amino- (lizinas), fenolio hidroksi- (tirozinas), imidazolo (histidinas), merkapt- (cisteinas), hidroksi- (serinas, hidroksiprolinas ir kt.), amido- (asparaginas, glutaminas), metilmerkapt- (metioninas), kai kuriais atvejais – peptidinės grupės. Daugeliu atvejų sunku nustatyti, su kuria fermento funkcinė grupe reaguoja nešiklio funkcinė grupė. Reakcijos eiga priklauso nuo reaguojančių molekulių išsidėstymo erdvėje. Kovalentiškai prijungto fermento aktyvumas priklauso nuo nešiklio formos, sandaros ir dydžio. Taip pat labai svarbus faktorius – imobilizuoto fermento stabilumas. Parinkus nešiklį ir imobilizavimo metodą, galima sumažinti nepageidaujamą nešiklio įtaką fermentui ir tuo pačiu padidinti santykinį imobilizuoto fermento aktyvumą. Tai tinka fermentams, katalizuojantiems stambiamolekulių junginių reakcijas. Nors, imobilizuojant cheminiu būdu, paprastai netenkama dalies pradinio fermento aktyvumo, tačiau likusi dalis išlieka pakankamai stabili ir gali būti naudojama ilgą laiką. Po fermento surišimo su nešikliu dažnai padidėja jo termostabilumas ir temperatūrinis optimumas, taip pat *Michaelis-Menten* konstanta K_m , kadangi galimybė substratui patekti prie aktyvių centrų sumažėja. Pastebėta, kad fermentas yra aktyvus, kai amino rūgšties aktyvusis centras nedalyvauja reakcijoje [8, 10-15].

Fermentų imobilizavimo, susidarant naujiems kovalentiniams ryšiams tarp nešiklio ir fermento, būdų yra žinoma nemažai, tačiau literatūroje bene dažniausiai sutinkamas fermentų imobilizavimas, naudojant difunkcinį reagentą – glutaraldehidą (GA) [16].

Straipsnyje [17] aprašytas lipazės imobilizavimas ant aminogrupėmis funkcionalizuotų anglies nanovamzdelių. Pirmiausia aminogrupėmis funkcionalizuotų nanovamzdelių paviršius aktyvuojamas glutaraldehido tirpalu, o po to lipazė imobilizuojama ant nanovamzdelių, susidarant kovalentiniams ryšiams tarp aldehydinių grupių ir fermento aminogrupių.

Straipsnyje [18] aprašomas ksilanazės imobilizavimas ant aliuminio oksido granulių. Granulės buvo aktyvuotos, panardinus jas į 1 % glutaraldehido tirpalą. Aktyvuotos granulės buvo inkubuotos 30 min su gryna ksilanaze, kambario temperatūroje.

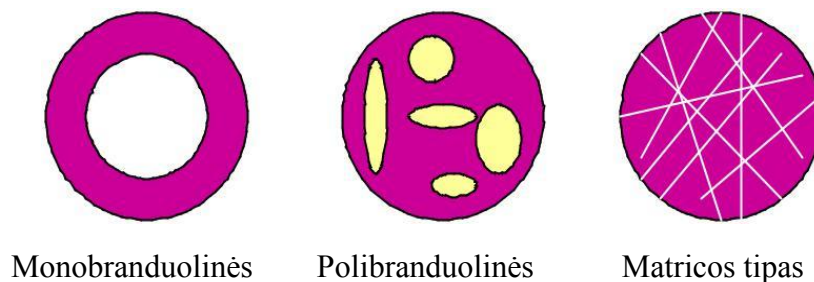
1.2 Kapsuliavimas

Kapsuliavimas – tai procesas, kurio metu kietos, skystos arba dujinės medžiagos padengiamos polimeriniu apvalkalu (membrana). Apvalkalas apsaugo kapsulės viduje esančią aktyvią medžiagą (branduolį, šerdį) nuo aplinkos poveikio. Šis metodas naudojamas įvairiose srityse: chemijos ir farmacijos pramonėje, kosmetologijoje ir spaudoje [19-22]. Pirmą kartą mikrokapsulės buvo susintetintos 1950 metais ir panaudotos kopijavimo popieriui, kuriame nėra anglies, gaminti. Dažų kapsulės buvo pagamintos iš želatinos ir gumiarabiko kompleksinės koacervacijos metodu [23].

Pagrindinės kapsuliavimo priežastys [24, 25]:

- ✓ Nesuderinamų komponentų atskyrimas;
- ✓ Įkapsuliuotos medžiagos stabilumo padidinimas (apsauga nuo oksidacijos ir deaktyvacijos procesų);
- ✓ Kvapo ir skonio maskavimas;
- ✓ Aktyvių junginių atpalaidavimo kontrolė;
- ✓ Aplinkos apsauga nuo kenksmingų medžiagų.

Kapsulės klasifikuojamos, remiantis jų dydžiu ir morfologija. Mikrokapsulių dydis yra mikronų eilės. Kai dalelių skersmuo yra nanometrų dydžio, kapsulės vadinamos nanokapsulėmis. Mikrokapsules pagal sandarą galima suskirstyti į tris pagrindinius tipus: monobranduolinės, polibranduolinės ir matricos tipo (1 pav.).



1 pav. Skirtingi mikrokapsulių tipai

Monobranduolinės mikrokapsulės turi vieną ertmę kapsulės viduje. Polibranduolinių mikrokapsulių viduje yra keletas skirtingo dydžio ertmių. Matricos tipo mikrodalelėse aktyvios medžiagos pasiskirsčiusios visoje kapsulėje. Mikrodalelių vidinė struktūra labai priklauso nuo pasirinktų apvalkalo medžiagų ir kapsuliavimo metodo [24, 25].

1.2.1 Kapsuliavimo metodai

Kapsulės yra gaunamos įvairiais būdais. Plačiausiai naudojama: emulsinis metodas, tarpfazinė polikondensacija, suspensinis susiuvimo metodas, išgarinant tirpiklį/ekstrahuojant tirpikliu, koacervacija/fazių atskyrimas.

✓ Emulsinis metodas:

Emulsija – tai dispersinė sistema, sudaryta iš ne mažiau kaip dviejų nesimaišančių skysčių. Dispersinė fazė sudaro lašelių formos daleles, kurios apsuptos dispersine terpe. Emulsija, kurioje hidrofobinė medžiaga emulguota hidrofilinėje terpėje, vadinama tiesiogine, ir žymima aliejus/vanduo (a/v). Emulsija, kurioje hidrofilinė medžiaga emulguota angliavandenilyje, vadinama atvirkštine emulsija ir žymima vanduo/aliejus (v/a) [26].

Miniemulsijos – atskira emulsijų klasė. Jos yra stabilios, o dispersinėje terpėje pasiskirsčiusių lašelių dydis svyruoja nuo 50 iki 500 nm. Ir šiuo atveju nepoliniai lašeliai gali būti disperguojami poliniame skystyje (a/v) arba priešingai – poliniai lašeliai nepoliniame skystyje (v/a) [27]. Pastaroji sistema buvo panaudota įkapsuliuoti vaistinius preparatus, kurie tirpūs vandenyje. Tačiau, kai dispersinė terpė yra aliejus, sunku išvalyti galutinį produktą. Skirtingai nuo sistemos v/a, sistemoje v/a/v tirpiklio garavimas vyksta sparčiau [28].

Pagal šį metodą hidrofobinis monomeras alkilakrilatas lašinamas į vandeninę polimerizacijos terpę, kurioje yra įkapsuliuojama medžiaga ir emulsiklis. Pirmame polimerizacijos etape susidaro polimerinės molekulės, kurios iškrenta į nuosėdas vandeninėje terpėje. Laikui bėgant, polimerinės dalelės palaipsniui auga ir tuo pačiu metu „pagauna“ įkapsuliuojamą medžiagą, taip susiformuoja mikrokapsulės. Autorių teigimu, šis būdas labai tinka mikrokapsulių apvalkalui iš hidrofobinių medžiagų gauti [29].

Straipsnyje [28] aprašyti etilceliuliozės mikrokapsulių sintezės būdai, naudojant a/v ir v/a/v emulsijas. Pirmuoju atveju organinę fazę sudaro vaisto flukonazolo ir etilceliuliozės tirpalas dichlormetane, o vandeninę – paviršinio aktyvumo medžiagos Tween 80 tirpalas. Nepertraukiamai maišant susiformuoja a/v emulsija. Maišoma kambario temperatūroje, kol išgaruoja organinis tirpiklis, o susidariusios mikrosferos nufiltruojamos. Antruoju atveju flukonazolo tirpalas dichlormetane disperguojamas vandeniniame emulsiklio, etilceliuliozės ir Span 80 tirpale. Gauta v/a emulsija pilama į vandeninį Tween 80 tirpalą. Maišant gaunama v/a/v emulsija. Ir šiuo atveju maišoma, kol išgaruoja organinis tirpiklis. Susidariusios mikrosferos nufiltruojamos, plaunamos šaltu distiliuotu vandeniu ir paliekamos džūti.

Straipsnyje [30] autoriai aprašo amfilinių polietilenglikolio (PEG) ir polilaktido (PLA) blokinių kopolimerų, pavyzdžiui, diblokinio PLA-*blok*-PEG ir triblokinio PEG-*blok*-PLA-*blok*-PEG kopolimero sintezę ir panaudojimą kapsulių sintezei. Šie polimerai dažniausiai naudojami įkapsuliuojant mažos molekulinės masės vaistinius preparatus: paklitakselį, papaveriną, sulindaką ir

tetrakainą. PEG-*blok*-PLA kopolimeras pasižymi paviršiniu aktyvumu, gali sudaryti nanomiceles ir tuo pačiu metu apgaubti vaistinį preparatą. Ši savybė labai supaprastina dalelių susidarymą, nes galima naudoti mažiau arba visai nenaudoti PAM ir organinių tirpiklių. PEG blokas kopolimere slopina ląstelių ir baltymų adsorbciją, todėl padidėja PEG-*blok*-PLA micelių gyvavimo trukmė. PEG-*blok*-PLA kopolimerai yra tinkamesni kapsuliavimui, negu PLA, bet įkapsuliuoti galima tik mažus hidrofobinius vaistinius preparatus.

✓ Tarpfazinė polikondensacija

Dvifazinė sistema kruopščiai sumaišoma, kol susidaro maži vienos fazės lašeliai kitoje fazėje. Įkapsuliuojama medžiaga turi būti parinkta taip, kad būtų ištirpinta arba disperguota lašeliuose. Būtina naudoti nedidelį kiekį tinkamo stabilizatoriaus, norint išvengti lašelių koalescencijos arba dalelių koaguliacijos polikondensacijos procese ir kapsulių susidarymo metu. Tarpfazinės polikondensacijos metu gali susidaryti tiek monobranduolinės, tiek matricos tipo mikrokapsulės. Jeigu polimeras tirpus lašeliuose, susidaro matricos tipo mikrokapsulės, o jeigu netirpus – iškrenta į nuosėdas aplink lašelį ir susidaro monobranduolinės mikrokapsulės. Poliamidiniai, polikarbamidiniai, poliuretaniniai ir poliesteriniai kapsulių apvalkalai gaunami tarpfazinės polikondensacijos metu. Šio proceso metu gali būti susintetintos mikrometro arba nanometro dydžio dalelės [24, 31].

✓ Suspensinis susiuvimo metodas

Tai – puikus metodas gauti mikrokapsules iš baltymų ir polisacharidų. Mikrokapsulių formavimas pagal šį metodą susideda iš stadijų: polimero ištirpinimas vandenyje, įkapsuliuojamos medžiagos, ištirpintos organiniame tirpiklyje, dispergavimas vandeninėje terpėje, panaudojant tinkamą stabilizatorių. Susiuvimo procesas vyksta arba termiškai ($> 500\text{ C}^\circ$), arba naudojant susiuvimo agentą (formaldehidą, tereftaloilodichloridą). Šis metodas yra universalus, į kapsules galima įterpti skystas arba kietas medžiagas [24, 32].

✓ Išgarinant tirpiklį / ekstrahuojant tirpikliu

Šis metodas labai panašus į suspensinį susiuvimo metodą, bet šiuo atveju paprastai naudojamas hidrofobinis poliesteris. Polimeras yra ištirpinamas lakiame organiniame tirpiklyje (dichlormetane arba chloroforme), kuriame taip pat ištirpinta arba disperguota įkapsuliuojama medžiaga. Gautas tirpalas sulašinamas į vandeninį tirpalą, kuriame yra ištirpintas stabilizatorius (polivinilalkoholis arba polivinilpirolidonas). Sumaišius susidaro maži polimeriniai lašeliai su viduje įterpta įkapsuliuojama medžiaga. Po tam tikro laiko lašeliai sukietėja ir susidaro polimerinės mikrokapsulės. Tai įvyksta dėl tirpiklio pasišalinimo iš polimerinių lašelių. Tirpiklis pasišalina jam išgaravus arba ekstrahuojant kitu tirpikliu. Naudojant ekstrakcijos metodą, kapsulių akytumas yra didesnis, negu naudojant išgarinimą [24, 33].

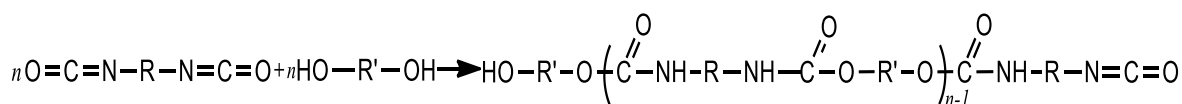
✓ Koacervacija / fazių atskyrimas

Fazių atskyrimo (koacervacijos) procesai skirstomi į paprastus ir kompleksinius. Paprastoje koacervacijoje naudojamas vienas polimeras, pavyzdžiui, želatina vandeninėje arba etilceliuliozė organinėje terpėje. Kompleksinėje koacervacijoje dalyvauja dvi priešingai įkrautos medžiagos, tokios kaip želatina ir gumiarabikas, kurios abi tirpios vandenyje. Mikrokapsulės, naudojant koacervacijos metodą, susidaro, į vandeninį polimero tirpalą, kuriame disperguota hidrofobinė kapsuliuojama medžiaga, palapsniui įvedant koacervacijos agentą, kad susidarytų dalinai desolvatuotos polimerinės molekulės [24, 34-36].

Straipsnyje [37] aprašyta, kaip gaminamos mikrokapsulės su įkapsuliuotu naltreksono hidrochloridu. Polilaktidas ištirpinamas metileno chloride. Vandeninė fazė su skirtingais naltreksono hidrochlorido kiekiais paruošiama atskirai. Paskui vandeninė fazė emulguojama organinėje fazėje su ištirpintu polilaktidu. Į susidariusią emulsiją pridedama poli(vinilalkoholio) vandeninio tirpalo ir maišoma. Susidaro $v_1/a/v_2$ emulsija. Reakcija vykdoma kambario temperatūroje, kol išgaruoja metileno chloridas. Susidariusios kapsulės filtruojamos, praplaunamos distiliuotu vandeniu ir paliekamos džiūti ore kambario temperatūroje. Į kai kurias v_1/a kompozicijas pridedama PAM: Tween 20, Tween 80, Tween 85, Span 20 arba Span 80, o į kai kurių kompozicijų išorinę fazę įdedama 10 % natrio chlorido. Tyrimai parodė, kad emulsiklis ir jo tipas neturi didelės įtakos kapsulių paviršiaus morfologijai. Kapsulių, kurių sudėtyje nebuvo nei druskos, nei emulsiklių, vidutinis dalelių dydis siekė 280 μm , o, naudojant natrio chloridą, dalelių dydis sumažėjo iki 208 μm . Pridėjus NaCl į išorinę vandens fazę, padidėja osmosinis slėgis, dėl to vyksta vandens migracija iš v_1 į v_2 ir kapsulės susitraukia. Pridėjus Tween 80 į pirmą emulsiją (v_1/a), mikrosferų dydis sumažėja iki 233 μm . Tai galima paaiškinti tuo, kad v_2/a sistemoje yra PAM, kuri padeda suformuoti mažesnes daleles ir tuo pačiu sumažinti galutinį kapsulių dydį. Lašelio dydis tiesiogiai proporcingas tarpfaziniam įtempiui tarp dispersinės fazės ir terpės, todėl bet koks emulsiklio kiekio padidinimas ir tarpfazinio įtempio sumažinimas sumažina vidutinį mikrosferų dydį.

1.3 Poli(uretankarbamidų) ir poli(uretankarbamidinių) kapsulių sintezė

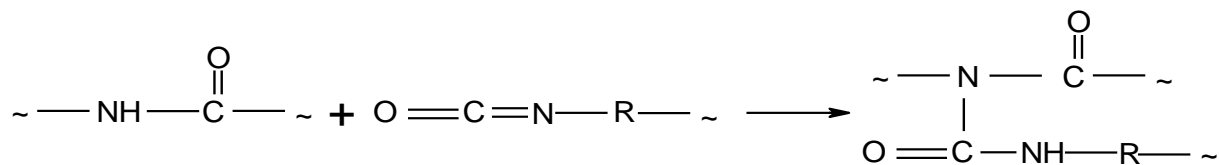
Poliuretanoi (PU) – tai grupė polimerų, kurių makromolekulėse yra uretaninių grupių. Uretano grupės susidaro reguojant hidroksi- ir izocianatogrupėms (1 schema).



1 schema. PU susidarymas

Izocianatogrupės pasižymi dideliu reakingumu ir dalyvauja daugelyje reakcijų [38-40]. Poliuretanų sintezės metu, jei yra diizocianato perteklius, esant katalizatorių (švino ar kobalto

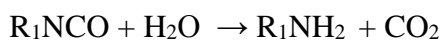
naftenatų, dideliems kiekiams DBTDL) arba esant aukštai sintezės temperatūrai, polimero grandinėse, be uretaninių grupių, gali būti aptinkamos alofanato grupės (2 schema). Dėl jų susidaro tilteliai. Alofanato grupės yra ne tokios patvarios kaip uretanininės, jos pradeda skilti 100 °C.



2 schema. Alofanato grupių susidarymas

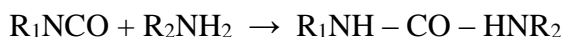
Poliuretaninių gaminių savybės priklauso nuo reakcijos sąlygų ir sintezei naudojamų monomerų. Poliuretanoi atsparūs alyvai, tirpikliams ir riebalams, tai labai praplečia jų panaudojimo galimybes. PU naudojami dangų, dažų ir klijų gamyboje, gaminant avalynę, elastinį pluoštą, medicinos prietaisus. Pasaulyje plačiai naudojami poliuretaniniai ir poli(uretankarbamidiniai) (PUU) putplasčiai, pastaruosius taip pat įprasta vadinti poliuretaniniais. Jie gaunami poliadicijos reakcijos metu iš daugiafunkcinių monomerų: di- ir daugiafunkcinių izocianatų, di- ir poliolių ir/arba poliaminų. Putplasčiai būna dviejų rūšių: elastingi (minkšti), kieti (tvirti) ir pusiau kieti. Kietumas priklauso nuo susiuvimo laipsnio.

Minkštųjų putplasčių žaliava paprastai yra tuoluendiizocianatai ir šakotieji polieteriai. Jeigu į šį mišinį papildomai pridedamas vanduo, jis sureaguoja su izocianatogrupėmis. Vanduo kaip nukleofilas atakuoja izocianatogrupės teigiamai įkrautą anglies atomą, dėl to susidaro aminogrupė ir išsiskiria CO₂ dujos:



3 schema. Izocianatogrupės reakcija su vandeniu

Anglies dioksido dujos išputina poliuretana, o susidariusios aminogrupės reaguoja su izocianatogrupėmis ir susidaro karbamido grupės [13], [41-45]:



4 schema. Karbamidinio ryšio susidarymo schema

Polikarbamidas – heterograndininis polimeras, kurio molekulėje yra periodiškai pasikartojančių –NHCONH– grupių [46].

Reaguojant dvi arba daugiau izocianatogrubių turinčiam monomerui su dvi arba daugiau aminogrubių turinčiu monomeru, susidaro linijinės, šakotos arba susiūtos struktūros polikarbamidas [47].

Buvo nustatyta, kad PU galima panaudoti biochemijos ir biotechnologijos srityse kaip puikius nešikius, imobilizuojant fermentus. Jie gali būti įvairaus pavidalo [42], [48]:

- ✓ putplasčiai,
- ✓ nanokompozitai,
- ✓ membranos,

- ✓ mikrosferos ir mikrokapsulės.

Pastaruoju metu vis didesnis dėmesys skiriamas fermentų imobilizavimui kapsuliavimo būdu.

Straipsnyje [49] aprašoma, kaip buvo pagamintos kapsulės tarpfazinės poliadicijos būdu, susidarant v/a emulsijai. Reaguojant toluendiizocianatui (TDI) su trietilenglikoliu susidaro mikrokapsulių apvaskalas. Įkapsuliuojama medžiaga – diamonio hidroksifosfatas (DHAP) yra ištirpinta vandenyje. Organinė (aliejaus) fazė – toluenas, katalizatorius DBTDL, o naudotas emulsiklis – natrio laurilsulfatas. Susidariusių dalelių dydis – apie 30 μm .

Straipsnyje [50] aprašoma, kaip buvo pagamintos PUU mikrokapsulės tarpfazinės poliadicijos būdu, susidarant a/v emulsijai. Toluendiizocianatas ir oktadekanas, ištirpinti acetone, sudaro organinę (aliejinę) fazę, o stireno-maleino rūgšties kopolimeras ir dietilentriaminas (DETA), ištirpinti vandenyje, – vandeninę fazę. Šio straipsnio autoriai taip pat nustatė kapsulių dydžio priklausomybę nuo maišymo greičio. Maišant 1000 aps/min greičiu, apie 70 % gautų kapsulių dydis buvo mažesnis, negu 10 μm . Maišymo greitį padidinus iki 2000 aps/min, dalelių dydžio pasiskirstymas buvo nuo 1 iki 20 μm . Maišant nuo 3000 iki 4000 aps/min greičiu, vidutinis kapsulių dydis buvo 5 μm .

Straipsniuose [51, 52] rašoma, kad alfa-tokoferolis plačiai naudojamas kaip stiprus antioksidatorius medicinos ir kosmetologijos pramonėje. Deja, dėl jautrumo šviesai, šilumai ir deguoniui jis greitai suyra. PU ir poli(eteruretandinės) nanokapsulės buvo sintetintos, kombinuojant tarpfazinę poliadiciją kartu su savaiminės emulsijos susidarymu. Poliuretanoi buvo gauti iš izoforondiizocianato ir 1,2-etandiolio, 1,4-butandiolio, 1,6-heksandiolio tarpfazinės poliadicijos būdu. Poli(eteruretano) kopolimerai buvo gauti pakeičiant diolius polietilenglikolio oligomerais, kurių M_w 200, 300, 400 ir 600 g/mol. Di- ir poliolių M_w turi didelę įtaką nanokapsulių savybėms. Didinant poliolių M_w , didėja vidutinis nanokapsulių dydis nuo 232 ± 3 nm iki 615 ± 39 nm. Naudojant PEG 600, dalelės linkusios labiau aglomeruotis, negu naudojant PEG 200. Taip pat pastebėta, kad kapsuliavimo išėiga didėja, ilgėjant poliolių grandinėms. Po 6 mėnesių laikymo 4 ir 25 °C temperatūroje nepastebėta poliuretano nanokapsulių agregacijos. Lyginant gautus duomenis nustatyta, kad poliuretanoi, susintetinti heksandiolio pagrindu, puikiai apsaugo alfa-tokoferolį nuo aukštos temperatūros ir UV spindulių.

Straipsnio [53] autoriai aprašo teofilino mikrokapsuliavimo procesą. Šis vaistinis preparatas buvo įkapsuliuotas PU kapsulėse, kurių apvaskalas sudarytas iš 4,4'-metilendifenilizocianato, ricinų aliejaus ir grandinėms prailginti naudoto etandiamino. PU mikrosferos buvo sintetintos dviem etapais: prepolimero paruošimas ir mikrosferų formavimas. Dalelių dydis buvo tiriamas optiniu mikroskopu, kuris parodė mikrodalelių pasiskirstymą nuo 27 iki 128 mikronų. Teofilino pasišalinimo iš mikrokapsulių tyrimas buvo atliktas naudojant UV-spektrometrą. Vaistinio

preparato pradinis pasišalinimas siekė 2-40 %, o pilnas pasišalinimas įvyko per daugiau kaip 10 parų.

Straipsnyje [54] aprašomas pesticido monokrotofoso įkapsuliavimo procesas. Ši medžiaga yra hidrofilinė ir proceso metu padengiama poliuretaniniu apvaskalu. Siekiant išvengti monokrotofoso cheminio skilimo įkapsuliavimo proceso metu, reakcijos buvo atliekamos nevandeninėje terpėje ir žemoje temperatūroje. Mikrokapsuliavimas buvo atliekamas naudojant toluendiizocianatą (TDI), stabilizatorių poli(laurilmetakrilato) makrodiolį ir DBTDL, kurie buvo ištirpinti parafino aliejuje. Atskiroje kolboje buvo paruoštas tirpalas iš 2-etil-1,3-heksandiolio, monokrotofoso ir trimetilolpropano. Paskui tirpalai sumaišomi ir vykdoma mikrokapsulių sintezė.

Straipsnyje [55] aprašomas prieštuberkuliozinių vaistų kapsuliavimas. Ši medžiaga yra hidrofilinė, tirpi vandenyje ir netirpi toluene. Ji gali būti įkapsuliuojama tarpfazinės poliadicijos būdu, naudojant emulsiją vanduo/toluenas. TDI izocianato grupės reguoja su PEG hidroksigrupėmis ir susidaro poliuretano grandinės. TDI taip pat gali reguoti su vandens molekulėmis, sudarydamas nestabilią NH-COOH grupę, kuri skyla į aminą ir anglies dioksidą. Grandinė su amino liekana reguoja su augančio polimero izocianato grupėmis ir sudaro karbamido segmentus. Buvo naudotas skirtingų molekulių masių PEG. Mikrokapsulių FTIR spektras patvirtino, kad kapsulių apvaskalas sudarytas iš poliuretanų. PU sintezės metu tarpfazinėje riboje buvo aptikti du produktai: mikrodalėlės ir antras – linijinis nusodintas poliuretanas. Didinant PEG kiekį vandeninėje fazėje, didėja antrinio produkto kiekis.

Straipsnio [56] autoriai aprašo poliuretaninių nanokapsulių sintezę tarpfazinės poliadicijos būdu, reguojant propantrioliui (PT) ir izoforondiizocianatui. Aliejinė fazė sudaryta iš IPDI, paviršiaus įtempį mažinančio heksadekano, inertinio organinio skysčio – 4-metoksibenzaldehido ir katalizatoriaus DBTDL. Vandeninė fazė pagaminta iš PT, natrio dodecilsulfato, ištirpinto buferiniame tirpale, o, siekiant padidinti jonų koncentraciją, dedama NaCl. Aprašytu būdu susintetintos nanokapsulės iš organinio skysčio šerdies ir tinklinės struktūros polimero apvaskalo.

Straipsnyje [57] aprašyti VU Polimerų Chemijos Katedroje atliktų maltogenazės įkapsuliavimo poli(uretankarbamidinėse) mikrokapsulėse tyrimų rezultatai. Mikrokapsulių apvaskalas sudarytas iš poli(vinilalkoholio) (PVA) ir 1,6-heksametilendiizocianato (HMDI). Sintezė vykdyta tarpfazinės poliadicijos metodu vanduo/aliejus (v/a) emulsijoje. Vandeninę fazę sudarė PVA, ir fermentas ištirpintas vandenyje, o organinę – Span 60, Span 80 arba Span 85 ir alavo DBTDL tirpalas toluene. PVA ir fermento tirpalas buvo emulguotas organinėje fazėje. Po emulgavimo į reakcijos mišinį pridedama HMDI. Susidariusios poli(uretankarbamidinės) mikrokapsulės filtruojamos, plaunamos dietileteriu ir distiliuotu vandeniu.

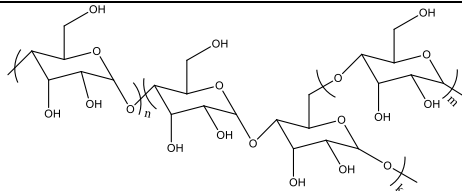
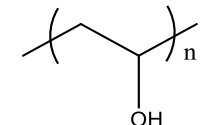
Apžvelgus literatūrą, galima prieiti prie išvados, kad poliuretaninių kapsulių sintezei naudojami di- ir polioliai, tačiau tik VU Polimerų Chemijos Katedroje darbuotojų publikacijoje [57]

panaudotas PVA. Be to, fermentų įkapsuliavimas PU ir PUU kapsulėse praktiškai nėra tirtas, išskyrus duomenis, pateiktus [57] publikacijoje. Todėl galima teigti, kad fermentų imobilizavimas PU ir PUU kapsulėse yra labai mažai tirta sritis, kuri gali būti plečiama bei suteikia dideles perspektyvas biotechnologijose.

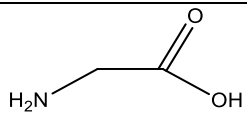
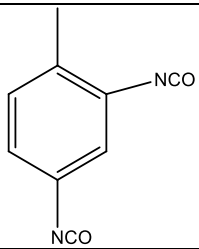
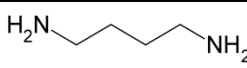
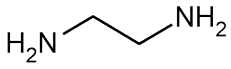
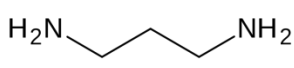
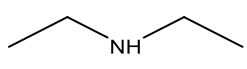
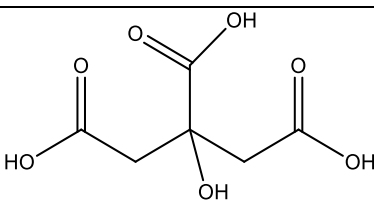
2. EKSPERIMENTINĖ DALIS

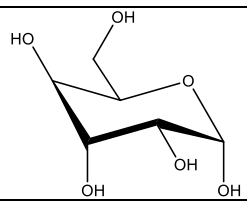
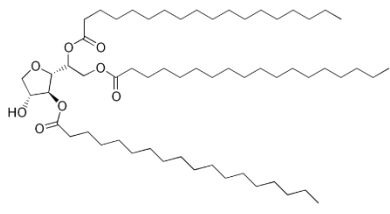
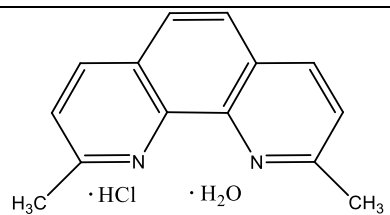
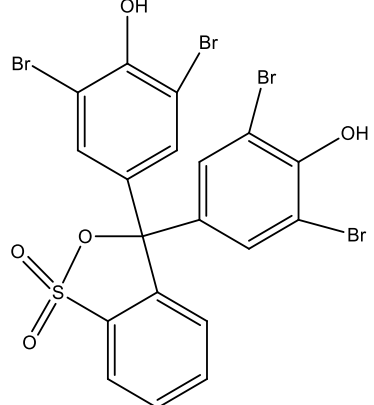
2.1 Naudotos medžiagos ir reagentai

2.1.1 Polimerai

Pavadinimas	Savybės	Formulė
Bulvių krakmolas, <i>Reachim</i>	-	
Poli(vinilo alkoholis), PVA, <i>Fluka</i>	M_w 100000, hidrolizės laipsnis 86-89 mol %	

2.1.2 Organinės medžiagos

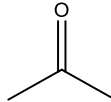
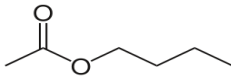
Pavadinimas	Savybės	Formulė
2-aminoacto rūgštis, glicinas, <i>Sigma</i>	M_r 75,07	
2,4-diizocianato-1-metil- benzenas, 2,4- toluendiizo-cianatas, TDI, <i>Aldrich</i>	M_r 174,16; $T_{lyd.}$ 19,5-21,5 °C; $T_{vir.}$ 251 °C; d^{20} 1,22 g/ml; n_D^{20} 1,385	
1,4 - diaminobutanas	M_r 88,15; $T_{lyd.}$ 27- 28°C; $T_{vir.}$ 159 °C;	
1,1 - diaminoetanas	M_r 60,1; $T_{lyd.}$ 11°C; $T_{vir.}$ 117-119 °C;	
1,3 - diaminopropanas	M_r 74,13; $T_{vir.}$ 140,1 °C;	
<i>N</i> -etiletanaminas, dietilaminas, <i>Reachim</i>	M_r 73,14; $T_{lyd.}$ 50 °C; $T_{vir.}$ 55 °C; d^{25} 0,707 g/ml; n_D^{20} 1,385	
2-hidroksipropan-1,2,3- trikarboksirūgštis, citrinų rūgštis, <i>Reachim</i>	M_r 192,12; $T_{lyd.}$ 153-159 °C	

1,2,4,5,6-pentahidroksiheksan-3-onas, D-gliukozė, <i>Reachim</i>	M_r 180,16	
Span 85 (sorbitano trioleatas) (<i>Sigma-Aldrich</i>)	$C_{60}H_{108}O_8$; $d^{20} = 0,95$ g/ml; M_r 957.49	
Indikatoriai		
2,9-dimetil-1,10-fenantro-lino hidrochlorido hidrata-s, neokuproinas $HCl \cdot H_2O$, <i>Sigma</i>	M_r 244,72	
3,3',5,5'-tetrabromofenol-sulfoftaleinas, bromfenolio mėlynasis, <i>Reachim</i>	M_r 669,96	

2.1.3 Neorganinės medžiagos

Pavadinimas	Savybės	Formulė
Dinatrio karbonatas, natrio karbonatas, <i>Reachim</i>	M_r 105,99	Na_2CO_3
Natrio hidroksidas, <i>Reachim</i>	M_r 40,00	$NaOH$
Vandenilio chlorido rūgštis 37%, druskos rūgštis, <i>POCh</i>	M_r 36,46; d^{20} 1,18 g/ml	HCl
Vario sulfato pentahidratas, <i>Reachim</i>	M_r 249,7	$Cu_2SO_4 \cdot 5H_2O$

2.1.4 Tirpikliai

Pavadinimas	Savybės	Formulė
Propan-2-onas. acetonas, <i>Reachem Slovakia</i>	M_r 58,08; $T_{vir.}$ 56 °C; d^{20} 0,791 g/ml; n_D^{20} 1,359	
Butilacetatas	M_r 116,16; $T_{vir.}$ 126,3 °C; d^{20} 0,8813 g/ml;	

2.1.5 Fermentai

Pavadinimas/šaltinis	Savybės
α -amilazė (EC 3.2.1.1) iš <i>Bacillus Subtilis</i> , Novozyme	d^{20} 1,150 g/ml; pH_{opt} 6,5; aktyvumas – 25000 V/ml
Maltogeninė α -amilazė (EC 3.2.1.133) iš <i>Bacillus</i> <i>Stearothermophilus</i> , Novozymes	d^{20} 1,250 g/ml; T_{opt} 60 °C; pH_{opt} 5,0-5,5; aktyvumas 4000 V/ml

2.2 Tirpalai

2.2.1. Tirpalai maltogenazei imobilizuoti ir fermento aktyvumui nustatyti

Citratinis buferis (0,1 M natrio citratas ($C_6H_7O_7Na$)/0,1 M citrinų rūgštis ($C_6H_8O_7$)), pH= 5,0 (naudota fermentui imobilizuoti bei fermentų substratų tirpalams ruošti).

2.2.2. Pradinis maltogenazės tirpalas

1 ml maltogenazės fermento praskiedžiama 3 ml citratinio buferio (pH=5,0).

2.2.3. Krakmolo tirpalas maltogenazės aktyvumui nustatyti

5 g bulvių krakmolo ištirpinama ~ 80 ml citratinio buferio (pH=5,0) ir, maišant tirpalą verdančio vandens vonelėje, išverdamas krakmolo kleisteris. Krakmolas ataušinamas, tada termostatuojamas 10 min 40 ° C. Po to įpilama 0,5 ml α amilazės tirpalo (0,1 ml α amilazės praskiedžiama 5 ml citratinio buferio). Fermentinė reakcija vykdoma 6 min 40 ° C. Paskui α amilazė inaktyvuojama, kaitinant reakcijos mišinį 20-30 min. verdančio vandens vonioje. Krakmolo tirpalas filtruojamas ir praskiedžiamas iki 100 ml citratiniu buferiu.

2.2.4. Tirpalai redukuojančių cukrų kiekiui nustatyti Neokuproino metodu

2.2.4.1. Tirpalas A

4 g Na_2CO_3 ištirpinama 60 ml vandens, 1,6 g glicino ištirpinama 10 ml vandens, 0,0450 g $CuSO_4$ ištirpinama 10 ml vandens. Visi šie 3 tirpalai sumaišomi surašymo tvarka ir skiedžiama iki 100 ml.

2.2.4.2. Tirpalas B

0,12 g neokuproino ištirpinama 100 ml vandens.

2.3. Metodai

2.3.1. Poli(uretankarbamidinių) kapsulių gavimas

Į triaklę 100 ml kolbą su mechaniniu maišikliu ir azoto prapūtimo vamzdeliu įpilama 37,5 ml butilacetato, kuriame yra ištirpinta 3 % PAM (Span 85) ir 12,5 ml 0,1 M PVA vandeninio tirpalo. Po 10 min maišymo, kai susidaro emulsija, pridedama 1,3 g toluen-2,4-diizocianato (TDI) ir diamino (DA) (EDA, BDA, PDA) (arba diaminas dedamas praėjus 30 min. nuo reakcijos pradžios). ([PVA]:[DA]=1:1 arba 1:3, arba 1:5, arba 1:6). Tiriant PUU kapsulių susidarymo priklausomybę nuo skirtingų diaminų ir jų kiekio, reakcija vykdoma 30°C temperatūroje, maišymo greitis – 400 aps/min, o reakcijos trukmė – 3 valandos. Susidariusios poli(uretankarbamidinės) kapsulės (PUUK), plaunamos eteriu, filtruojamos ir džiovinamos.

2.3.2. MG imobilizavimas PUUK po jų sintezės

1,72 g drėgnų PUUK, gautų pagal 2.3.1 metodiką, užpilama 5 ml citratinio buferio, kurio pH=5,0 bei 0,38 ml pradinio maltogenazės tirpalo (2.2.2.). Maišoma 30 min 40 °C temperatūroje. Po to reakcijos mišinys perkeliamas į šaldytuvą 24 val. Po imobilizavimo IP filtruojamas ir plaunamas 10 ml citratinio buferio, kurio pH= 5,0.

2.3.3. MG imobilizavimas PUUK sintezės metu

PUUK sintezė vykdoma analogiškai, kaip aprašyta metodikoje 2.3.1, tik į vandeninį PVA tirpalą pridedama MG tirpalo, gauto pagal (2.2.2.) metodiką. Imobilizuojamo fermento kiekis buvo įvertintas, atsižvelgiant į analogiškoms sąlygoms gautų PUUK išeigą ir MG kiekį, naudojamą atitinkamam nešiklio kiekiui, kai MG imobilizuojama po PUUK sintezės. Susidariusios kapsulės filtruojamos, praplaunamos eteriu ir citratinu buferiu (pH=5,0), nustatomas MG imobilizavimo efektyvumas ir MG pasišalinimas iš PUUK.

2.3.4. PUUK apvalkalo išeigos apskaičiavimas

Sausų PUUK arba jų apvalkalo (PUUA) išeiga q (%) (daroma prielaida, kad sausų PUUK masė yra adekvati apvalkalo masei) apskaičiuojama pagal formulę :

$$q = \frac{m_{PUUK}}{m_{PR}} \cdot 100\%;$$

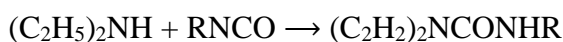
čia : m_{PUUK} – sausų (išdžiovintų vakuume) kapsulių apvalkalo masė, g;

m_{PR} – sintezei paimtų pradinių medžiagų (PVA ir TDI) masių suma, g.

2.3.5. Izocianato grupių kiekio nustatymas

Į 100 ml Erlenmejerio kolbutę suberiama 0,1-0,3 g tiriamo polimero, pripilama 10 ml 0,2 M dietilamino tirpalo acetone. Mišinys šildomas krosnyje 40 °C temperatūroje 30 min., ataušinamas iki kambario temperatūros ir titruojamas 0,1 M HCl tirpalu, indikatoriumi naudojant bromfenolio mėlymąjį.

Analizės metu vyksta reakcija pagal lygtį:



Izocianato grupių kiekis X_{NCO} (%) apskaičiuojamas pagal formulę :

$$X_{NCO} = \frac{(V_1 - V_2) \cdot M \cdot 42 \cdot 100}{m \cdot 1000};$$

čia: V_1 ir V_2 – HCl tirpalo, sunaudoto atitinkamai kontroliniam bandiniui ir tiriamajai medžiagai titruoti, tūris, ml;

M – HCl tirpalo koncentracija, mol/l;

42 – izocianato grupės molekulinė masė, g/mol;

M – bandinio masė, g.

2.3.6. Maltogenazės aktyvumo nustatymas

2.3.6.1. Pradinio maltogenazės tirpalo aktyvumo nustatymas

Į 10 ml krakmolo tirpalo (2.2.3.) įpilama 1 ml 160 kartų skiesto MG tirpalo. Inkubuojama 20 min. 40°C temperatūroje. Reakcija nutraukiama virinant 15 min. vandens vonioje. Redukuojančių cukrų kiekis nustatomas Neokuproino metodu (2.3.7.3). Maltogenazės aktyvumas vienetais mililitre (V/ml) apskaičiuojamas pagal formulę:

$$A = \frac{C \cdot Sk \cdot 1000 \cdot 11}{t};$$

čia: C – redukuojančių cukrų kiekis, mol/l;

Sk – skiedimų skaičius;

11 – bendras reagentų tūris, ml;

t – inkubavimo trukmė, min.

2.3.6.2. MG aktyvumo nustatymas ant IP

Į 10 ml krakmolo tirpalo (2.2.3.) pridedama ~0,1 g drėgnų IP ir maišoma 20 min. 40 °C temperatūroje. Po to fermentinė reakcija nutraukiama virinant 15 min. vandens vonioje. Redukuojančių cukrų kiekis nustatomas Neokuproino metodu (2.3.7.3). Maltogenazės aktyvumas vienetais grame (V/g) drėgno IP apskaičiuojamas pagal formulę, nurodytą 2.3.7.1 metodikoje, tik aktyvumas papildomai padalinamas iš IP masės, naudotos aktyvumui nustatyti (~0,1 g).

2.3.6.3. Redukuojančių cukrų kiekio nustatymas Neokuproino metodu

Į aukštus mėgintuvėlius įpilama 0,5 ml redukuojančių cukrų (skiestų 286 kartus) ir po 2 ml abiejų reagentų A ir B, paruoštų pagal 2.2.4.1 ir 2.2.4.2 metodikas. Mėgintuvėliai užkemšami kamščiais ir statomi virinti į verdančio vandens vonią 12 min., po to atvėsunami ledo vonioje. Į atvėsintus mėgintuvėlius įpilama 8 ml vandens, supurtoma ir matuojamas optinis tankis spektrofotometru, esant 450 nm bangos ilgiui. Kontrolinis bandinys ruošiamas aprašytu būdu, tik vietoj redukuojančių cukrų tirpalo pilama 0,5 ml vandens.

2.3.6.4. Maltogenazės imobilizavimo efektyvumo skaičiavimas

Imobilizavimo efektyvumas procentais yra skaičiuojamas pagal formulę :

$$\text{Imobilizavimo efektyvumas} = (A_{\text{IP bendras}} / A_{\text{PF bendras}}) \cdot 100\%$$

čia: $A_{\text{IP bendras}}$ – apskaičiuotas IP aktyvumas pagal formulę, nurodytą 2.3.6.1 ir 2.3.6.2 metodikose ir padauginta iš visos medžiagos masės, likusios po imobilizavimo;

A_{PF} bendras – apskaičiuotas pradinio fermento aktyvumas pagal formulę, nurodytą 2.3.7.1 metodikoje, padaugintas iš imobilizavimui naudoto fermento kiekio ir padalintas iš 4 (skiedimas).

2.3.6.5. Fermento pasišalinimo skaičiavimas

Fermento pasišalinimas skaičiuojamas, naudojant imobilizavimo efektyvumą, apskaičiuotą pagal 2.3.6.4 metodiką. Pradinė imobilizavimo efektyvumo vertė prilyginama 100 % ir, remiantis proporcija, apskaičiuojami imobilizavimo efektyvumo procentai nuo maksimalios reikšmės. Gauti procentai yra atimami iš 100% ir gaunama, kiek fermento pasišalina po tam tikro laiko.

2.3.7. Spektroskopinis PUUK tyrimas

ATR (visiško atspindžio nuo paviršiaus) metodu FT-IR spektrai užrašyti *Perkin Elmer* FT-IR FRONTIER spektrometru. Mėginių spektrai užrašyti 650-4000 cm^{-1} srityje, kiekvieną bandinį skenuojant 20 kartų.

2.3.8. PUUK tyrimas optiniu ir skenuojančiu elektroniniu mikroskopu

Drėgnas kapsulės buvo tiriamos optiniu mikroskopu OLYMPUS, padidinus 5 arba 20x, o sausos išdžiovintos PUUK buvo tiriamos skenuojančiu elektroniniu mikroskopu *Hitachi* SU70.

2.3.9. PUUK paviršiaus ploto ir porų dydžio nustatymas

PUUK paviršiaus plotas ir porų dydis nustatytas Micromeritics Tristar II prietaisu. Analizė pagrįsta N_2 sorbcija ant PUUK, esant $-196\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūrai. Liofilizuoti mėginiai prieš analizę buvo džiovinami $140\text{ }^\circ\text{C}$ N_2 atmosferoje 2 val. Paviršiaus plotas nustatytas *Brunauer-Emmer-Teller* (BET) metodu, o porų dydis nustatytas iš azoto adsorbcijos ir desorbcijos ant PUUK duomenų *Barrett-Joyner-Halenda* (BJH) metodu.

2.3.10. PUUK elementinė analizė

Elementinė analizė atlikta naudojant *Thermo Scientific Flash* 2000 serijos CHNS-O analizatorių.

2.3.11. PUUK terminė analizė

PUUK apvalkalo termogravimetriniai tyrimai buvo atlikti naudojant terminį analizatorių *Perkin Elmer Pyris 1*. Temperatūra buvo keliama nuo 30 iki $600\text{ }^\circ\text{C}$, $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ greičiu (N_2 dujos leistos $20\text{ ml}/\text{min}$ greičiu).

3. DARBO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Darbo metu tarpfazinės poliadicijos būdu emulsijoje vanduo/aliejus (v/a) buvo susintetintos poli(uretankarbamidinės) kapsulės (PUUK). PUUK sintezė vykdyta, naudojant 0,1 M koncentracijos poli(vinilalkoholio) (PVA) vandeninį tirpalą, kuris buvo emulguojamas butilacetate. Organinėje fazėje buvo ištirpinta paviršinio aktyvumo medžiaga Span 85 ir diizocianatas TDI. Be to, po emulgavimo į reakcijos mišinį buvo dedamas diaminas: EDA, BDA arba PDA. Buvo keičiamos pradinės reakcijos sąlygos: pradiniai PVA ir DA moliniai santykiai bei DA įdėjimo laikas nuo reakcijos pradžios. Buvo naudojami keturi PVA ir DA moliniai santykiai – 1:1, 1:3, 1:5, 1:6, o DA buvo dedamas į reakciją iš karto kartu su TDI arba praėjus 30 minučių nuo TDI įdėjimo. Maltogenazė buvo imobilizuojama kapsulių sintezės metu arba po jos. Susintetintos poli(uretankarbamidinės) kapsulės buvo tiriamos ir įvertinama, ar DA kiekis ir jo įdėjimo laikas turi įtakos kapsulių susidarymui bei MG imobilizavimo efektyvumui ir pasišalinimui.

3.1 PUUK sintezė iš PVA, TDI ir EDA

Darbo pradžioje buvo susintetintos poli(uretankarbamidinės) kapsulės, naudojant skirtingus PVA ir EDA molinius santykius: 1:1, 1:3, 1:5, 1:6. EDA buvo dedamas į reakcijos mišinį iš karto su TDI arba po 30 minučių nuo TDI įdėjimo. Tačiau kitos sąlygos buvo pastovios: PVA ir TDI molinis santykis – 1:6, PVA koncentracija – 0,1 M, H₂O:butilacetato tūrių santykis – 1:3, maišymo greitis – 400 aps/min, sintezės trukmė – 3 val, temperatūra – 30 °C.

Buvo apskaičiuotos PUUK apvalkalo išeigos (pagal metodiką 2.3.4), o cheminės analizės metodu buvo nustatytas –NCO grupių kiekis PUUK apvalkale (pagal metodiką 2.3.6). Iš pateiktų 1 lentelėje duomenų matyti, kad, didinant EDA kiekį bei įdėjus jį į reakcijos mišinį iškart arba po 30 minučių, –NCO grupių kiekis PUUK apvalkale mažėja. Nagrinėjant elementinės analizės metodu (2.3.11) gautus duomenis, galima pastebėti, kad, dedant EDA kartu su TDI, azoto kiekis mažėja. Kadangi diizocianatas sparčiau reaguoja su diaminu, negu su antrinėmis PVA hidroksigrupėmis, todėl, be šoninių prie PVA pagrindinės grandinės prisijungusių atšakų, susidaro daugiau tirpių šalutinių linijinių polikarbamidinių grandinių, kurios nesudaro kapsulių apvalkalo. Tai patvirtina ir apvalkalo išeiga, kuri beveik nesikeičia. Didinant EDA kiekį bei įdėjus jį į reakcijos mišinį po 30 minučių nuo reakcijos pradžios, iš pradžių TDI diizocianato grupės reguoja su PVA hidroksigrupėmis, o, pridėjus EDA, jis reguoja su TDI ir gali sudaryti polikarbamidinius segmentus PVA atšakose arba tirpias linijines grandines. Polikarbamidai su galinėmis –NCO grupėmis taip pat gali reaguoti su PVA –OH ir susidaryti susiūtos struktūros grandys. Dėl susidarančių polikarbamidinių grandžių N kiekis didėja, C ir H – mažėja, o apvalkalo išeiga didėja.

Buvo atlikti liofilizavimo būdu išdžiovintų PUUK apvalkalo paviršiaus ploto, bendro porų tūrio ir dydžio tyrimai (2.3.10 metodika). 2 lentelėje pateikti rezultatai rodo, kad, didinant EDA

kiekį ir jį įdėjus reakcijos pradžioje, PUUK apvalkalo paviršiaus plotas sumažėjo nuo 80,7 iki 7,0 m²/g, o bendras porų tūris sumažėjo nuo 0,27 iki 0,014 cm³/g. Įdėjus EDA po 30 min nuo reakcijos pradžios, paviršiaus plotas sumažėjo nuo 53,9 iki 5,3 m²/g, o bendras porų tūris – nuo 0,14 iki 0,014 cm³/g. Manoma, kad, didinant EDA kiekį, vyksta tinklinimo reakcijos ir iš atvirų porų susidaro uždarnos, todėl labai sumažėja paviršiaus plotas bei bendras porų tūris.

1 lentelė

PUUK apvalkalo išeigos, -NCO grupių kiekio ir elementinės analizės rezultatai, sintezei naudojant EDA

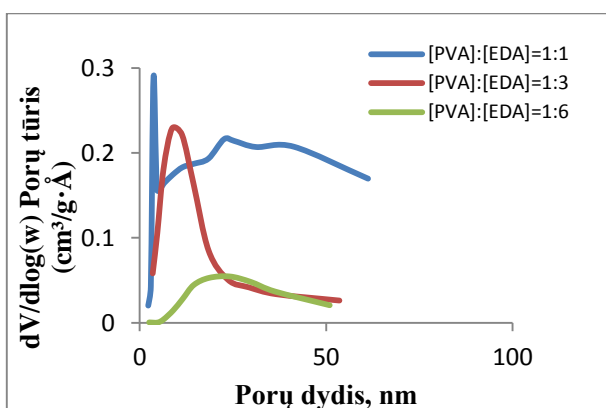
Nr.	Sintezės sąlygos		-NCO grupių kiekis PUUK apvalkale, %	PUUK apvalkalo išeiga, %	Elemento kiekis PUUK, %		
	[PVA]:[EDA]	EDA įdėjimas į reakcijos mišinį kartu su TDI			N	C	H
1	1:1	EDA įdėjimas į reakcijos mišinį kartu su TDI	2,5	12,4	18,5	57,1	6,4
2	1:3		2,4	13,0	14,2	64,7	6,6
3	1:5		2,1	13,2	12,3	65,1	7,5
4	1:6		2,0	13,4	11,5	65,6	8,2
5	1:1	EDA įdėjimas į reakcijos mišinį po 30 min. nuo TDI įdėjimo	2,2	14,9	10,5	67,4	8,4
6	1:3		2,0	26,4	12,8	63,4	6,9
7	1:5		1,3	29,6	16,1	62,8	6,6
8	1:6		0,5	34,2	17,7	57,6	7,3

2 lentelė

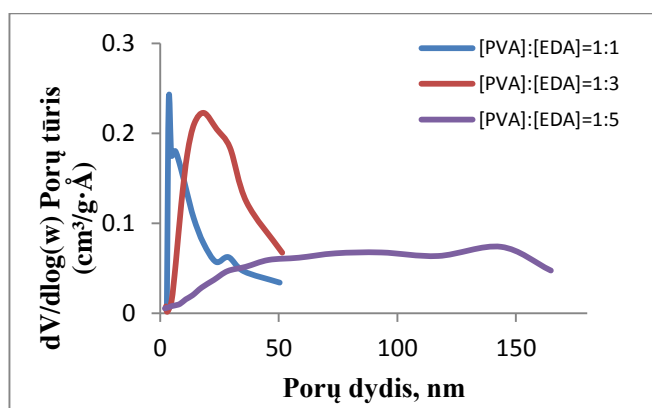
PUUK apvalkalo paviršiaus ploto, bendro porų tūrio ir dydžio tyrimų rezultatai, sintezei naudojant EDA

Nr.	Sintezės sąlygos		PUUK paviršiaus plotas, m ² /g	PUUK apvalkalo bendras porų tūris, cm ³ /g
	[PVA]:[EDA]			
1	1:1	EDA įdėjimas į reakcijos mišinį kartu su TDI	80,7	0,27
2	1:3		42,3	0,14
3	1:5		46,3	0,20
4	1:6		7,0	0,034
5	1:1	EDA įdėjimas į reakcijos mišinį po 30 min. nuo TDI įdėjimo	53,9	0,14
6	1:3		33,9	0,15
7	1:5		13,5	0,06
8	1:6		5,3	0,014

Iš 3 ir 4 pav. matoma, kad porų dydžių pasiskirstymo intervalas PUUK visais atvejais yra gana platus ir priklauso nuo naudoto EDA kiekio. Esant PVA ir EDA moliniam santykiui 1:1, dedant EDA kartu su TDI bei po 30 min nuo sintezės pradžios, dominuoja 3-5 nm dydžio poros. Esant PVA ir EDA moliniam santykiui 1:3 ir dedant EDA į reakcijos mišinį kartu su TDI, daugiausiai PUUK apvaskale yra 9 nm dydžio porų, o, dedant EDA po 30 minučių nuo sintezės pradžios, – 18 nm. Naudojant PVA ir EDA molinį santykį 1:6 ir dedant diaminą kartu su TDI, apvaskale daugiausiai yra 23-25 nm dydžio porų. Plačiausias porų pasiskirstymas matomas, kai [PVA]:[EDA] = 1:5, dedant EDA praėjus 30 minučių nuo TDI įdėjimo laiko, o siauriausias – kai santykis 1:6, dedant EDA reakcijos pradžioje.

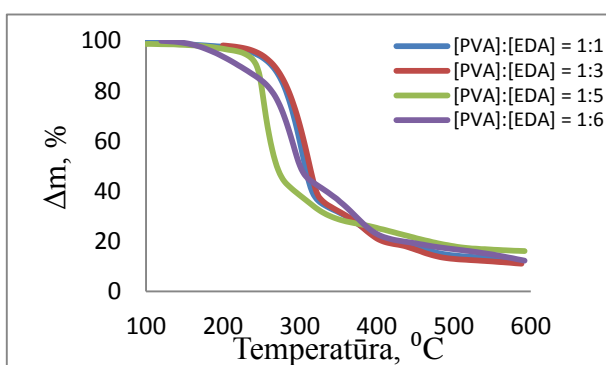


3 pav. Porų dydžių pasiskirstymas, sintezei naudojant skirtingus PVA ir EDA molinius santykius, dedant EDA reakcijos pradžioje

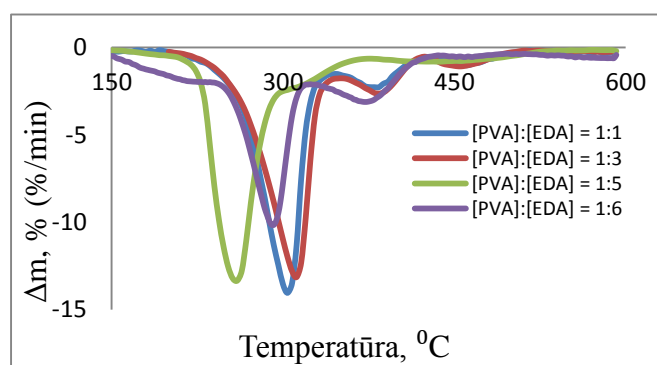


4 pav. Porų dydžių pasiskirstymas, sintezei naudojant skirtingus PVA ir EDA santykius, dedant EDA po 30 min nuo reakcijos pradžios

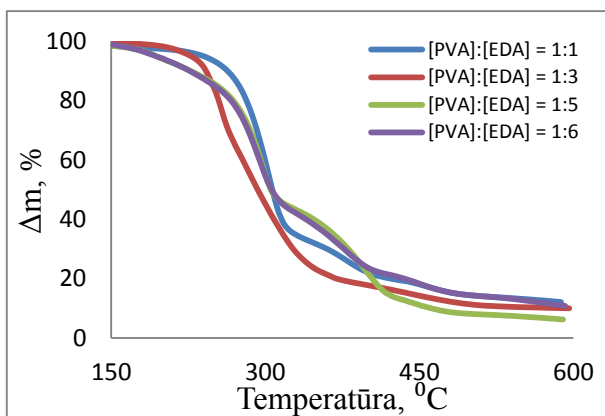
Atlikti išdžiūvusių PUUK terminio stabilumo tyrimai. TGA ir DTGA analizės kreivės pateiktos 5 - 8 paveiksluose, o apibendrinti rezultatai – 3 lentelėje.



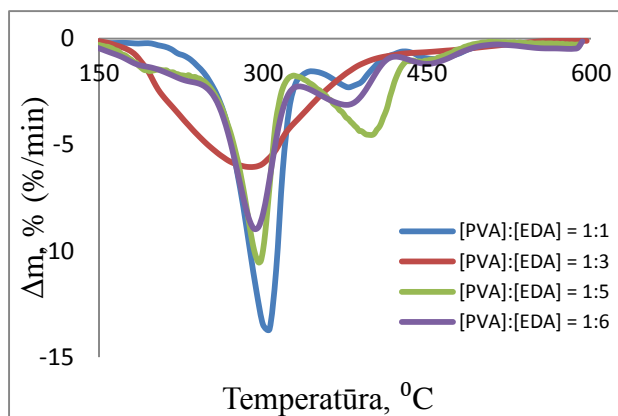
5 pav. PUUK TGA kreivės, sintezei naudojant skirtingus PVA ir EDA molinius santykius, dedant EDA reakcijos pradžioje



6 pav. PUUK DTGA kreivės, sintezei naudojant skirtingus PVA ir EDA molinius santykius, dedant EDA reakcijos pradžioje



7 pav. PUUK TGA kreivės, sintezei naudojant skirtingus PVA ir EDA molinius santykius, dedant EDA po 30 min nuo reakcijos pradžios



8 pav. PUUK DTGA kreivės, sintezei naudojant skirtingus PVA ir EDA molinius santykius, dedant EDA po 30 min nuo reakcijos pradžios

3 lentelė

PUUK terminės analizės rezultatai, sintezei naudojant EDA

[PVA]:[EDA]		Pirma skilimo stadija							Antra skilimo stadija		
		I etapas			II etapas		III etapas		T _{max} , °C	T _{pabaiga} , °C	Δm, %
		T _{pradžia} , °C	T _{max} , °C	Δm, %	T _{max} , °C	Δm, %	T _{max} , °C	Δm, %			
1: 1	EDA įdėjimas į reakcijos mišinį kartu su TDI	250,8	305,3	62,4	380,3	12,9	-	-	464,2	499,9	6,5
1: 3		257,3	313,0	71,4	386,2	7,6	-	-	452,5	486,2	18,2
1: 5		227,2	259,7	60,0	312,6	12,5	-	-	424,9	476,5	8,6
1: 6		168,1	185,9	9,6	293,3	47,5	-	-	373,1	401,4	23,6
1: 1	EDA įdėjimas į reakcijos mišinį po 30 min. nuo TDI įdėjimo	246,8	304,9	63,8	280,3	13,5	-	-	458,7	540,1	6,5
1: 3		221,6	259,5	34,1	298,4	40,8	-	-	445,1	526,5	9,3
1: 5		158,3	190,9	12,8	297,9	42,3	398,7	29,2	453,1	490,4	5,9
1: 6		148,4	180,5	17,4	293,4	40,4	379,9	19,9	455,4	493,8	7,7

Iš 3 lentelėje pateiktų rezultatų matyti kad PUUK skilimas vyksta per 2 stadijas. Pirmoje stadijoje skyla PU, PUU ir polikarbamido segmentai. Iš DTGA kreivių (6 ir 8 pav.) galima konstatuoti, kad pirmoji skilimo stadija yra sudaryta iš kelių etapų, nors TGA kreivėse (5 ir 7 pav.) sunku juos išskirti. Pirmosios skilimo stadijos pirmojo etapo pradžia 148,4-250,8 °C temperatūrų ribose, o maksimalaus skilimo greičio temperatūra yra 180,5-313°C intervale ir priklauso nuo naudoto EDA kiekio bei jo įdėjimo laiko. Antrojo etapo maksimali skilimo greičio temperatūra yra 293,3-386,2 °C, kai EDA dedamas reakcijos pradžioje, o, dedant EDA po 30 min nuo reakcijos pradžios, – 280,30-298,4°C. Pastaruoju atveju atsiranda trečias skilimo etapas, esant PVA ir EDA

moliniams santykiams 1:5 ir 1:6. Manoma, kad pirmoje stadijoje pirmiausiai skyla trumpos uretaninės grandys, po to – poli(uretankarbamidiniai) ir trumpesni polikarbamidiniai segmentai, o dar aukštesnėse temperatūrose skyla tvarkingesnės vandenilniais ryšiais stabilizuotos ilgesnės polikarbamidinės grandinės. Antroje stadijoje skyla pirmosios stadijos metu nesuskilusios grandžių atkarpos, polieno likučiai, susidarant angliai ir angliavandeniliams.

3.2 PUUK sintezė iš PVA, TDI ir BDA

Darbo metu taip pat buvo susintetintos poli(uretankarbamidinės) kapsulės, sintezei naudojant kitą DA – BDA, kai PVA ir BDA moliniai santykiai buvo: 1:1, 1:3, 1:5, 1:6. BDA į reakcijos mišinį buvo dedamas: iš karto su TDI arba po 30 minučių nuo TDI įdėjimo.

Cheminės analizės metodu buvo nustatytas –NCO grupių kiekis PUUK apvaskale, o elementinės analizės metodu – N, C ir H elementų kiekis.

4 lentelė

PUUK apvaskalo išeigos, -NCO grupių kiekio ir elementinės analizės rezultatai, sintezei naudojant BDA

Nr.	Sintezės sąlygos		-NCO grupių kiekis PUUK apvaskale, %	PUUK apvaskalo išeiga, %	Elemento kiekis PUUK, %		
	[PVA]:[BDA]	BDA įdėjimas į reakcijos mišinį kartu su TDI			N	C	H
1	1:1		BDA įdėjimas į reakcijos mišinį kartu su TDI	4,2	19,8	19,5	59,2
2	1:3	2,9		24,7	18,3	64,8	6,8
3	1:5	2,5		31,6	17,6	61,5	7,2
4	1:6	1,9		34,5	18,1	61,3	7,3
5	1:1	BDA įdėjimas į reakcijos mišinį po 30 min. nuo TDI įdėjimo	5,5	17,0	15,8	61,2	7,7
6	1:3		3,8	18,0	15,2	63,3	7,6
7	1:5		3,4	48,5	16,1	63,2	6,7
8	1:6		1,3	55,4	16,3	60,1	7,7

Iš 4 lentelės duomenų matyti, kad, didinant BDA kiekį ir įdėjus jį į reakcijos mišinį iškart ir po 30 minučių, –NCO grupių kiekis PUUK apvaskale mažėja, dėl intensyviai vykstančių reakcijų tarp amino- ir izocianatogrupių. Analizuojant elementinės analizės metodu gautus duomenis, galima pastebėti, kad, didinant BDA kiekį ir dedant jį reakcijos pradžioje, dėl susidariusių šalutinių polikarbamidinių grandinių, kurios neįeina į kapsulių apvaskalą, azoto kiekis kinta nežymiai, o apvaskalo išeiga padidėja nuo 19,8 iki 34,5 %. Didinant BDA kiekį bei įdėjus jį į reakcijos mišinį po

30 minučių nuo sintezės pradžios, dėl susidarančių polikarbamidinių segmentų N kiekis didėja, C ir H – mažėja. PUUK apvalkalo išeiga didėja nuo 17,0 iki 55,4 %. N kiekio padidėjimas nėra didelis, dėl didesnės BDA molekulinės masės.

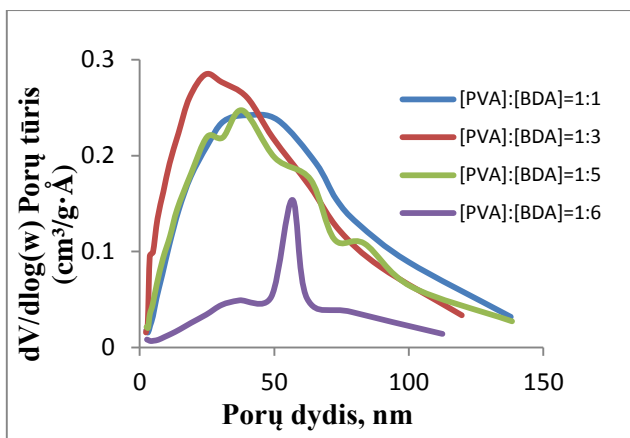
5 lentelė

PUUK apvalkalo paviršiaus ploto, bendro porų tūrio ir dydžio tyrimų rezultatai, sintezei naudojant BDA

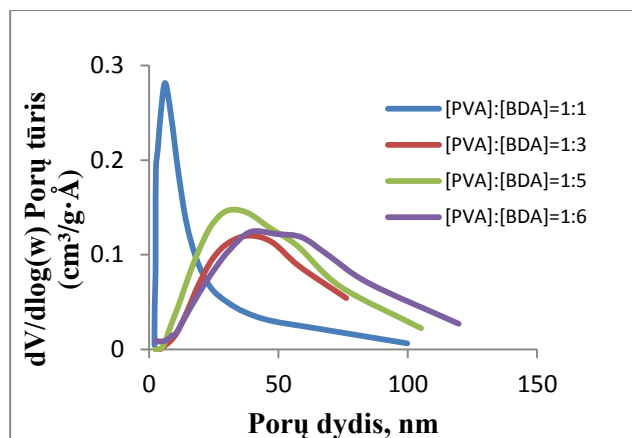
Nr.	Sintezės sąlygos		PUUK paviršiaus plotas, m ² /g	PUUK apvalkalo bendras porų tūris, cm ³ /g
	[PVA]:[BDA]	BDA įdėjimas į reakcijos mišinį kartu su TDI		
1	1:1	BDA įdėjimas į reakcijos mišinį kartu su TDI	41,0	0,18
2	1:3		66,8	0,26
3	1:5		46,5	0,19
4	1:6		9,6	0,037
4	1:1	BDA įdėjimas į reakcijos mišinį po 30 min. nuo TDI įdėjimo	67,8	0,196
5	1:3		13,1	0,068
6	1:5		16,8	0,089
7	1:6		16,4	0,075

Buvo atlikti liofilizavimo būdu išdžiovintų PUUK apvalkalo paviršiaus ploto, bendro porų tūrio ir dydžio tyrimai. Šių tyrimų rezultatai pateikti 5 lentelėje, iš jų matome, kad, didinant BDA kiekį bei įdėjus jį reakcijos pradžioje, PUUK apvalkalo paviršiaus plotas sumažėjo nuo 41,05 iki 9,61 m²/g, o bendras porų tūris sumažėjo nuo 0,18 iki 0,037 cm³/g. Įdėjus EDA po 30 min nuo reakcijos pradžios, paviršiaus plotas sumažėjo nuo 67,8 iki 16,49 m²/g, o bendras porų tūris – nuo 0,196 iki 0,075 cm³/g. Manoma, kad didinant BDA kiekį vyksta tinklinimo reakcijos ir iš atvirų porų susidaro uždaros, todėl labai sumažėja paviršiaus plotas bei bendras porų tūris.

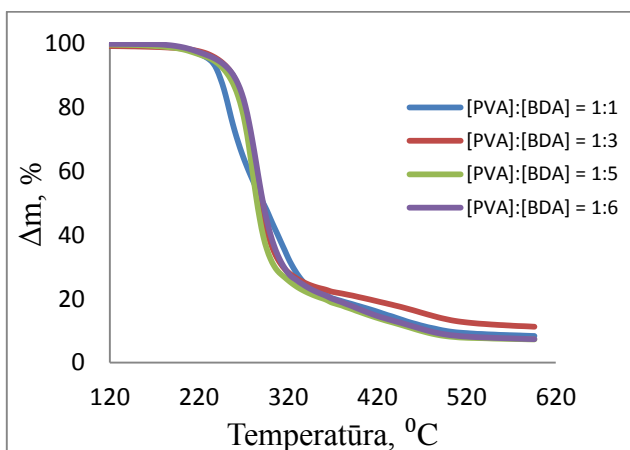
Iš 9 ir 10 pav. aiškiai matyti, kad porų dydžio pasiskirstymas intervalas platesnis, negu PUUK, kai sintezei naudotas EDA. Gautose PUUK dominuoja 8-9 nm, 20-40 nm ir 50-55 nm dydžio poros. Esant [PVA]:[BDA] = 1:5, kai BDA dedamas kartu su TDI, gaunamas didžiausias porų dydžio pasiskirstymas, o esant [PVA]:[BDA] = 1:1 santykiui ir dedant BDA po 30 minučių nuo reakcijos pradžios – mažiausias.



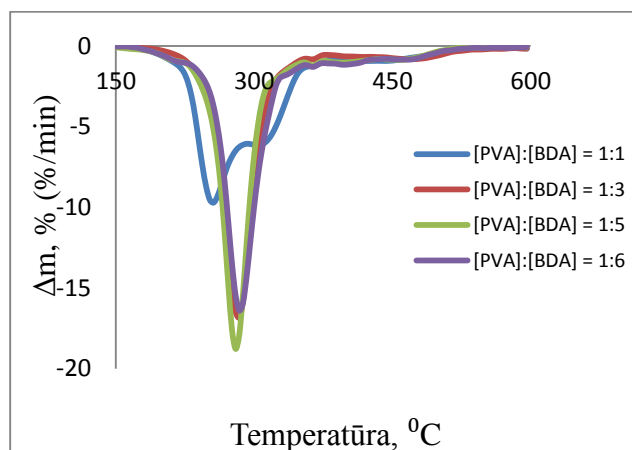
9 pav. Porų dydžio pasiskirstymas, sintezei naudojant skirtingus PVA ir BDA molinius santykius, dedant BDA reakcijos pradžioje



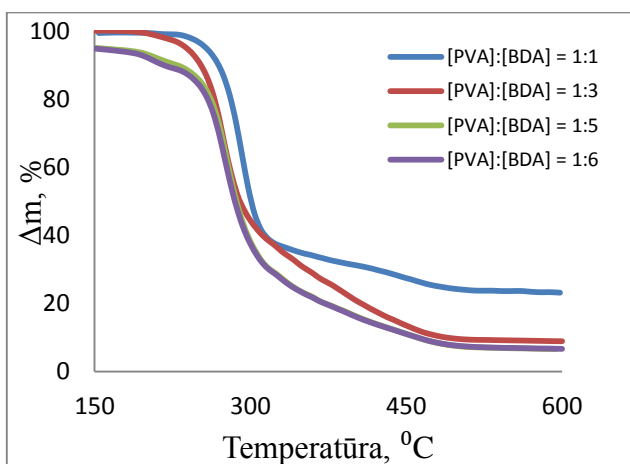
10 pav. Porų dydžio pasiskirstymas, sintezei naudojant skirtingus PVA ir BDA santykius, dedant BDA po 30 min nuo reakcijos pradžios



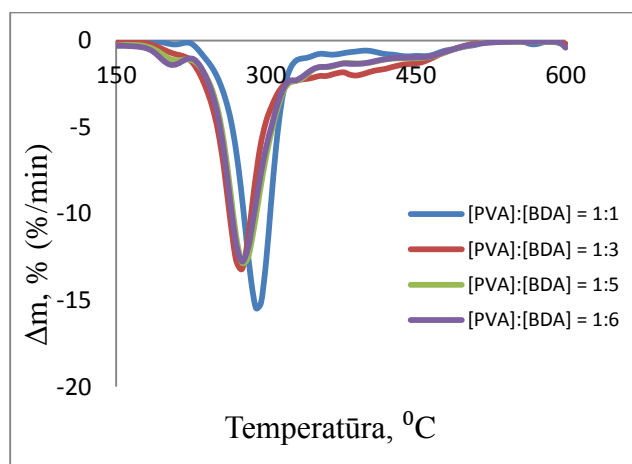
11 pav. PUUK TGA kreivės, sintezei naudojant skirtingus PVA ir BDA molinius santykius



12 pav. PUUK DTGA kreivės, sintezei naudojant skirtingus PVA ir BDA molinius santykius



13 pav. PUUK TGA kreivės, sintezei naudojant skirtingus PVA ir BDA molinius santykius, dedant BDA po 30 min nuo reakcijos pradžios



14 pav. PUUK DTGA kreivės, sintezei naudojant skirtingus PVA ir BDA molinius santykius, dedant BDA po 30 min nuo reakcijos pradžios

Atlikti išdžiūvusių PUUK terminio stabilumo tyrimai. TGA ir DTGA analizės kreivės pateiktos 11-14 paveiksluose, o apibendrinti PUUK termino skilimų rezultatai – 6 lentelėje.

6 lentelė

PUUK terminės analizės rezultatai, sintezei naudojant BDA

[PVA]:[BDA]		Pirma skilimo stadija							Antra skilimo stadija		
		I etapas			II etapas		III etapas				
		T _{pradžia} , °C	T _{max} , °C	Δm, %	T _{max} , °C	Δm, %	T _{max} , °C	Δm, %	T _{max} , °C	T _{pabaiga} , °C	Δm, %
1:1	BDA įdėjimas į reakcijos mišinį kartu su TDI	217,3	254,1	43,4	308,2	34,2	381,5	7,9	444	507,4	3,7
1:3		246,6	283,5	74,6	364,9	7,2	-	-	473,8	526,2	3,9
1:5		191,1	215,6	2,5	280,4	62,8	365,7	8,9	463,2	510,7	2,7
1:6		177,2	213,9	4,8	285,3	69,3	364,7	11,3	471,3	511,3	3,7
1:1	BDA įdėjimas į reakcijos mišinį po 30 min. nuo TDI įdėjimo	192,2	209,6	1,8	292,4	62,9	370,3	5,3	460,4	512,5	6,4
1:3		182,4	206,7	2,1	275,3	70,7	390,2	9,8	450,5	509,0	5,9
1:5		184,4	208,2	3,4	278,3	61,3	333,6	8,5	402,7	509,7	12,5
1:6		182,6	207,2	4,5	276,3	60,1	329,8	8,9	460,9	503,3	11,5

Iš 6 lentelėje pateiktų rezultatų matyti, kad PUUK skilimas vyksta per 2 stadijas. Iš DTGA kreivių (12 ir 14 pav.) galima konstatuoti, kad pirmoji skilimo stadija yra sudaryta iš trijų etapų, nors TGA kreivėse (11 ir 13 pav.) sunku juos išskirti, kaip ir PUUK, kurių sintezei naudotas EDA, atveju. Pirmiausiai skyla trumpos uretaninės grandys, o pirmojo etapo maksimali skilimo greičio temperatūra yra 206,7-283,5. Didžiausia masės netektis šiame etape yra 74,6 %, esant PVA ir BDA moliniam santykiui 1:3, dedant BDA kartu su TDI. Paskui skyla ilgesnės poliuretankarbamidinės ir trumpesnės polikarbamidinės grandinės ties 275,3-364,9 °C – tai atitinka antro etapo T_{max}. Antrame etape didžiausia masės netektis yra 70,7 %, esant PVA ir BDA moliniam santykiui 1:3, dedant BDA po 30 minučių nuo sintezės pradžios. Paskui skyla ilgesnės polikarbamidinės grandinės – tai atitinka trečio etapo maksimalią skilimo greičio temperatūrą. Pirmos stadijos trečiame etape ir antroje skilimo stadijoje masės nuostoliai žymiai sumažėja. Maksimalus masės nuostolis trečiame etape siekia 11,3 %, esant santykiui 1:6 ir dedant PDA kartu su TDI. Antroje skilimo stadijoje didžiausias masės nuostolis yra 12,5 %, esant santykiui 1:5, ir dedant PDA po 30 minučių nuo sintezės pradžios. Antroje stadijoje skyla pirmosios stadijos metu nesuskilusios grandinių atkarpos, polieno likučiai, susidarant angliai ir angliavandeniliams.

3.3 PUUK sintezė iš PVA, TDI ir PDA

Darbo metu taip pat susintetintos poli(uretankarbamidinės) kapsulės, naudojant trečią DA – PDA, kai skirtingus PVA ir PDA moliniai santykiai buvo: 1:1, 1:3, 1:5, 1:6 (tie patys, kaip naudojant EDA arba BDA). PDA buvo dedamas į reakcijos mišinį iš karto su TDI arba po 30 minučių nuo TDI įdėjimo.

Cheminės analizės metodu buvo nustatytas –NCO grupių kiekis PUUK apvaskale, o elementinės analizės metodu – N, C, H elementų kiekis.

Iš pateiktų 7 lentelėje duomenų matyti, kad didinant PDA kiekį bei įdėjus jį į reakcijos mišinį iškar ir po 30 minučių, -NCO grupių kiekis PUUK apvaskale mažėja, o išeiga didėja. Įvertinus elementinės analizės rezultatus, matyti, kad, dedant PDA kartu su TDI, N kiekis dėl susidariusių karbamidinių grandžių didėja, o įdėjus DA po 30 minučių – praktiškai nekinta, o C – mažėja.

7 lentelė

PUUK apvaskalo išeigos, -NCO grupių kiekio ir elementinės analizės rezultatai, sintezei naudojant PDA

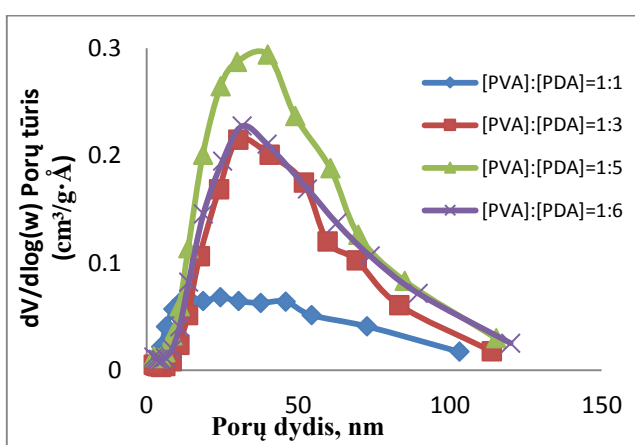
Nr.	Sintezės sąlygos		-NCO grupių kiekis PUUK apvaskale, %	PUUK apvaskalo išeiga, %	Elemento kiekis PUUK, %		
	[PVA]:[PDA]	PDA įdėjimas į reakcijos mišinį kartu su TDI			N	C	H
1	1:1	PDA įdėjimas į reakcijos mišinį kartu su TDI	4,7	14,69	14,42	63,36	7,45
2	1:3		3,2	19,28	16,18	60,88	7,35
3	1:5		2,9	39,61	16,92	59,37	7,37
4	1:6		1,5	80,94	17,06	59,32	7,37
5	1:1	PDA įdėjimas į reakcijos mišinį po 30 min. nuo TDI įdėjimo	3,6	23,71	15,99	63,32	6,93
6	1:3		2,7	31,31	15,07	63,28	6,91
7	1:5		1,8	50,68	15,26	60,25	7,84
8	1:6		1,1	49,25	15,76	59,77	7,74

Buvo atlikti liofilizavimo būdu išdžiovintų PUUK apvaskalo paviršiaus ploto, bendro porų tūrio ir dydžio tyrimai, rezultatai pateikti 8 lentelėje.

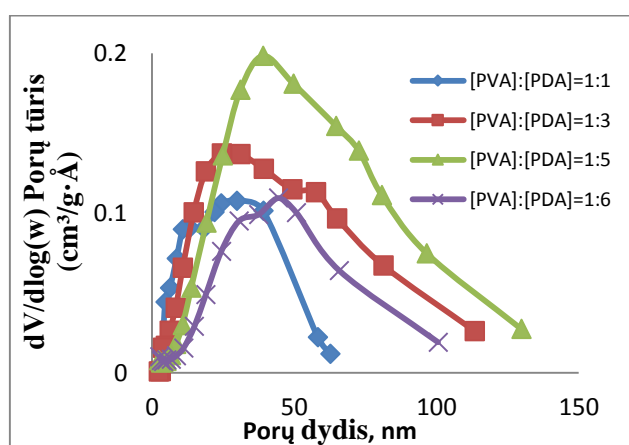
PUUK apvalkalo paviršiaus ploto, bendro porų tūrio ir dydžio tyrimų rezultatai, sintezei naudojant PDA

Nr.	Sintezės sąlygos		PUUK paviršiaus plotas, m ² /g	PUUK apvalkalo bendras porų tūris, cm ³ /g
	[PVA]:[PDA]	PDA įdėjimas į reakcijos mišinį kartu su TDI		
1	1:1			14,6
2	1:3	16,7		0,11
3	1:5	31,7		0,17
4	1:6	24,5		0,13
5	1:1	PDA įdėjimas į reakcijos mišinį po 30 min. nuo TDI įdėjimo	34,3	0,13
6	1:3		21,2	0,12
7	1:5		20,3	0,11
8	1:6		15,1	0,05

8 lentelėje pateikti duomenys rodo, kad, didinant PDA kiekį ir jį įdėjus po 30 minučių, PUUK apvalkalo paviršiaus plotas sumažėjo nuo 34,3 iki 15,1 m²/g, o bendras porų tūris sumažėjo nuo 0,13 iki 0,05 cm³/g. Šiuo atveju iš atvirų porų susidaro uždarnos, todėl labai sumažėja paviršiaus plotas ir bendras porų tūris. Įdėjus PDA kartu su TDI, paviršiaus plotas padidėjo nuo 14,6 iki 31,7 m²/g, o bendras porų tūris – nuo 0,06 iki 0,17 cm³/g. Manoma, kad dėl susidariusių atvirų porų didėja paviršiaus plotas bei bendras porų tūris.



15 pav. Porų dydžių pasiskirstymas, sintezei naudojant skirtingus PVA ir PDA molinius santykius, dedant PDA reakcijos pradžioje

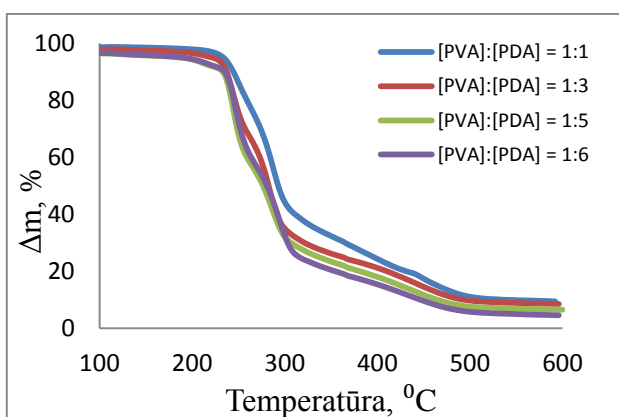


16 pav. Porų dydžių pasiskirstymas, sintezei naudojant skirtingus PVA ir PDA santykius, dedant PDA po 30 min nuo reakcijos pradžios

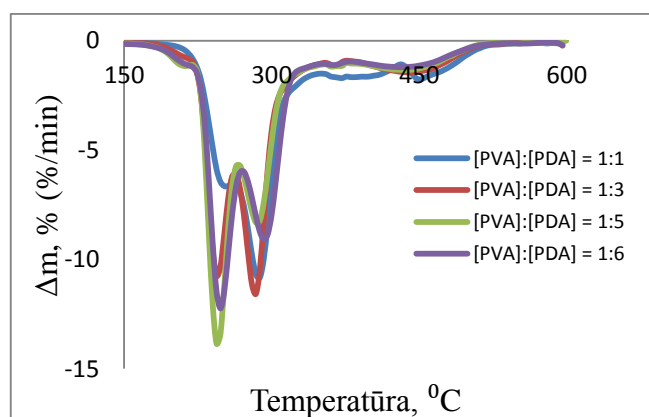
Iš 15 ir 16 pav. matyti, kad porų dydžio pasiskirstymo intervalas taip pat yra platus, kaip ir kitose gautose PUUK. Dominuoja 20-30 ir 40-50 nm dydžio poros. Didžiausias porų tūris (0,17 cm³/g) gautas, naudojant sintezei sąlygas: [PVA]:[PDA] = 1:5, DA dedamas kartu su TDI. Esant [PVA]:[PDA] = 1:5, kai PDA dedamas po 30 minučių nuo reakcijos pradžios, gaunamas didžiausias porų dydžio pasiskirstymas, o esant [PVA]:[PDA] = 1:1 – mažiausias.

Atlikti išdžiūvusių PUUK terminio stabilumo tyrimai. TGA ir DTGA analizės kreivės pateiktos 17-20 paveiksluose, o apibendrinti skilimų rezultatai – 9 lentelėje.

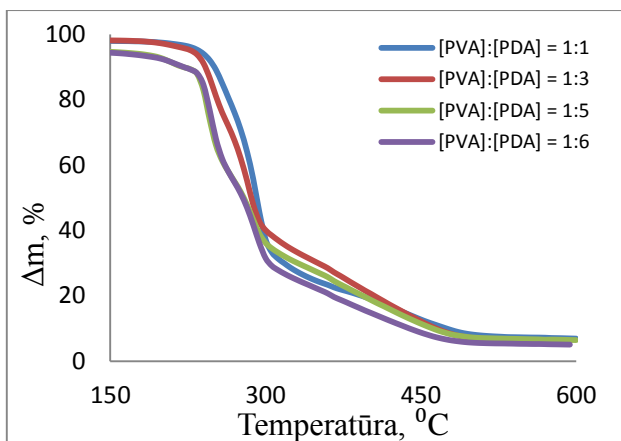
Iš 9 lentelėje pateiktų rezultatų matyti, kad PUUK skilimas vyksta per 2 stadijas, tiek PDA dedant kartu su TDI, tiek po 30 minučių nuo TDI įdėjimo. Iš DTGA kreivių (18 ir 20 pav.) galima matyti, kad pirmoji skilimo stadija yra sudaryta iš trijų etapų, nors TGA kreivėse (17 ir 19 pav.), kaip ir ankstesniais atvejais, juos sunku įžiūrėti. Pirmiausiai skyla trumpos uretaninės grandys ties 175,9-259,4 °C. Šis dydis atitinka pirmos skilimo stadijos pirmąjį etapą ir yra pirma maksimalaus skilimo greičio temperatūra. Didžiausia masės netektis šiame etape yra 26,3 %, esant PVA ir PDA moliniam santykiui 1:3 ir dedant PDA po 30 minučių nuo sintezės pradžios. Paskui skyla ilgesnės uretaninės ir trumpesnės karbamidinės grandinės – tai atitinka antro ir trečio etapo temperatūras. Antrame etape didžiausia masės netektis yra 63,1 %, esant PVA ir PDA moliniam santykiui 1:1, o trečiame etape – 34,8 %, kai medžiagų santykis 1:6 (abiems atvejais PDA dedamas po 30 minučių nuo sintezės pradžios). Antroje stadijoje skyla pirmosios stadijos metu nesuskilusios grandžių atkarpos, polieno likučiai. Šiuo atveju didžiausia masės netektis yra 20,4 %, esant PVA ir PDA moliniam santykiui 1:5, dedant PDA kartu su TDI.



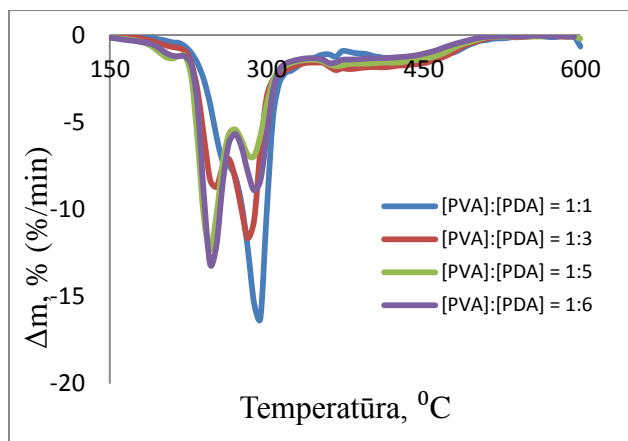
17 pav. PUUK TGA kreivės, sintezei naudojant skirtingus PVA ir PDA molinius santykius



18 pav. PUUK DTGA kreivės, sintezei naudojant skirtingus PVA ir PDA molinius santykius



19 pav. PUUK TGA kreivės, sintezei naudojant skirtingus PVA ir PDA molinius santykius, dedant PDA po 30 min nuo reakcijos pradžios



20 pav. PUUK DTGA kreivės, sintezei naudojant skirtingus PVA ir PDA molinius santykius, dedant PDA po 30 min nuo reakcijos pradžios

9 lentelė

PUUK terminės analizės rezultatai, sintezei naudojant PDA

[PVA]:[PDA]		Pirma skilimo stadija						Antra skilimo stadija			
		I etapas			II etapas		III etapas				
		T _{pradžia.} , °C	T _{max.} , °C	Δm, %	T _{max.} , °C	Δm, %	T _{max.} , °C	Δm, %	T _{max.} , °C	T _{pabaiga.} , °C	Δm, %
1:1	PDA įdėjimas į reakcijos mišinį kartu su TDI	220,8	253,9	16,4	287,4	45,9	371,8	14,7	450,7	510,9	8,7
1:3		222,9	245,5	25,1	283,6	38,3	364,8	9,9	440,9	507,4	9,6
1:5		188,9	213,2	2,7	245,9	31,4	286,2	29,9	439,8	506,3	20,4
1:6		186,3	211,2	3,4	247,5	33,3	292,9	34,5	441,0	510,2	17,2
1:1	PDA įdėjimas į reakcijos mišinį po 30 min. nuo TDI įdėjimo	222,6	259,4	1,8	292,3	63,1	363,1	11,2	438,9	504,8	11,1
1:3		175,9	207,8	26,3	248,9	32,8	248,4	11,4	364,1	498,3	17,8
1:5		178,8	206,8	4,2	245,7	27,1	285,8	32,9	366,2	511,1	19,6
1:6		191,1	211,3	3,6	247,7	31,3	290,6	34,8	362,5	488,2	17,1

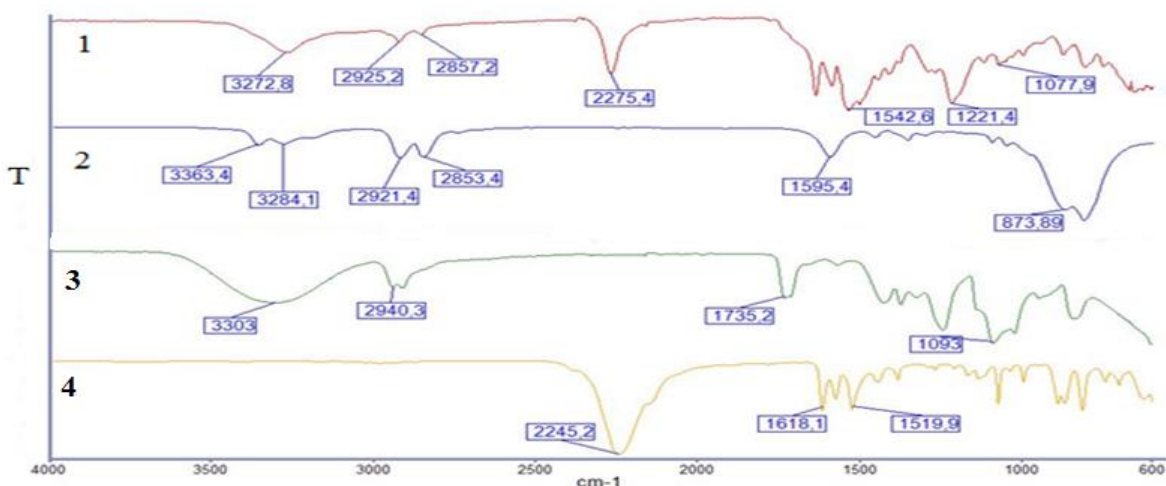
Apibendrinant PUU mikrokapsulių sintezę iš PVA ir įvairių diizocianatų, pastebėti bendri dėsningumai. Nepriklausomai nuo diamino ir nuo jo įdėjimo laiko į reakcijos mišinį, –NCO grupių kiekis PUUK mažėja, didinant DA kiekį. Didžiausias –NCO grupių kiekis (5,5 %) buvo pasiektas, esant PVA ir BDA moliniam santykiui 1:1, o mažiausias – (0,5 %), naudojant PVA ir EDA molinį santykį – 1:6 ir dedant DA po 30 min nuo sintezės pradžios. Palyginus DA įtaką tarpusavyje, galima pastebėti, kad didžiausia PUUK išeiga (80,9 %) gauta, naudojant PDA, kai [PVA]:[PDA] = 1:6, o mažiausia (12,4 %) – naudojant EDA, kai [PVA]:[EDA] = 1:1, ir diaminais dedami kartu su

TDI. Taip pat buvo pastebėta, kad, didinant EDA ir BDA kieki, nepriklausomai nuo jų įdėjimo laiko, PUUK paviršiaus plotas ir bendras porų tūris mažėja. Tokia pat priklausomybė matoma, naudojant PDA, kai jis dedamas po 30 min nuo sintezės pradžios, tačiau, dedant PDA kartu su TDI, paviršiaus plotas ir bendras porų tūris didėja.

3.4 PUUK apvalkalo sandaros tyrimas

Vykstant reakcijoms tarp emulsijos lašeliuose esančių PVA makromolekulių grandžių ir dispersinėje terpėje esančio diizocianato, formuojasi PUU kapsulių apvalkalas. Todėl daroma prielaida, kad sausų (išdžiovintų vakuume) PUUK masė yra adekvati apvalkalo masei.

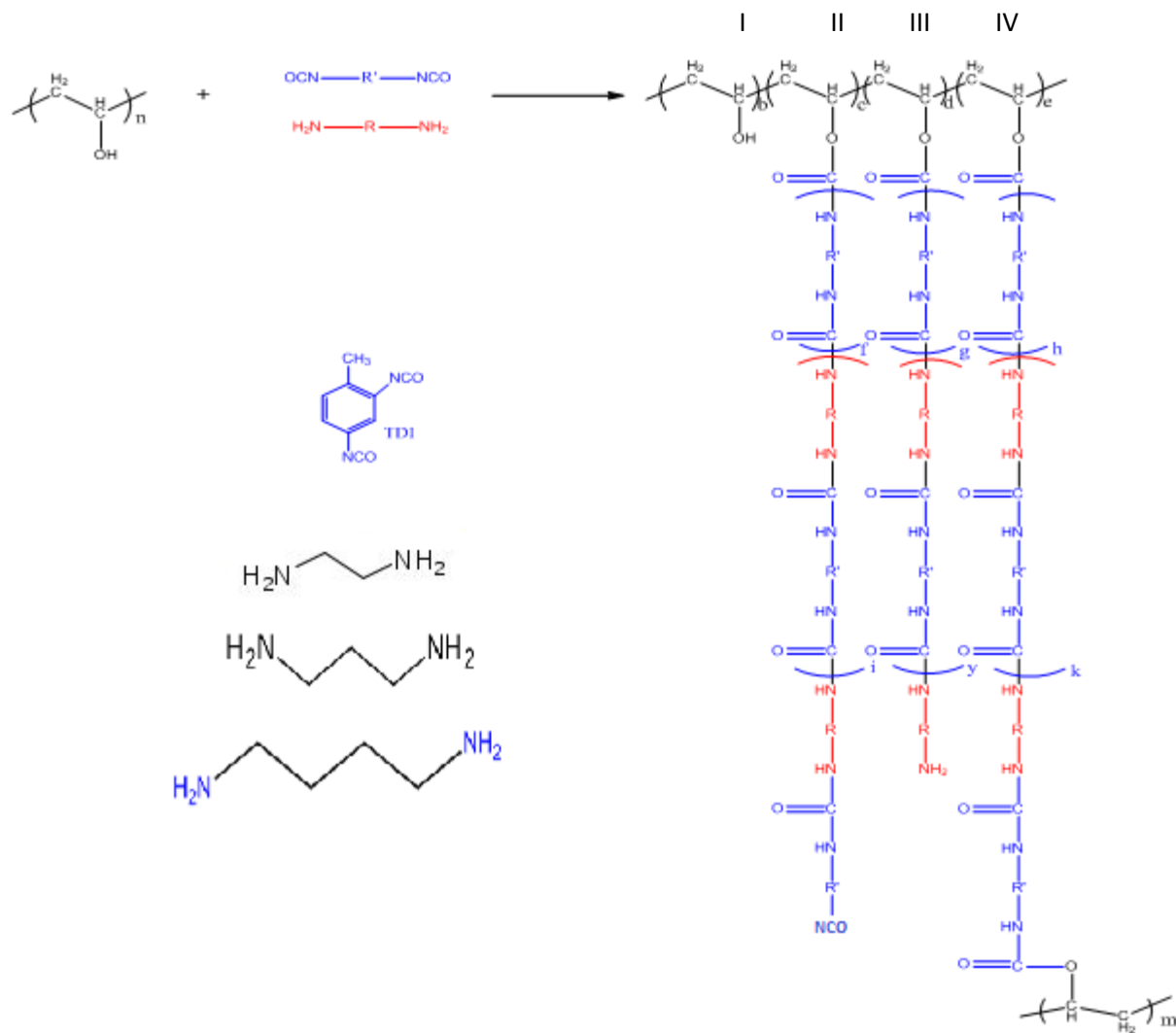
Liofilizavimo būdu išdžiovintų poli(uretankarbamidinių) kapsulių apvalkalo tyrimas atliktas, užrašant FT-IR spektrus (2.3.7 metodika). Pradinių medžiagų ir PUUK apvalkalo FT-IR spektrai pateikti (21 pav.).



21 pav. FT-IR spektrai: 1 – PUUK, susintetintų, esant [PVA]:[EDA]=1:1, įdėjus EDA į reakcijos mišinį kartu su TDI, 2 – EDA, 3 – PVA, 4 – TDI

PUUK, gautų sintezę vykdant, esant [PVA]:[EDA]=1:1, įdėjus EDA į reakcijos mišinį kartu su TDI (21 pav., (1)), spektre yra polikarbamidams būdingos juostos, ties 1542,6 cm^{-1} (amidograpių, $\delta(\text{N-H})$), $\nu(\text{C=N})$ ir 1221,4 cm^{-1} (amidograpių, $\delta(\text{N-H})$), $\nu(\text{C=N})$), o taip pat ties 3272,8 cm^{-1} stebima sugerties juosta, būdinga $\nu(\text{OH})$ ir $\nu(\text{NH})$ grupėms. Sugerties juostos ties 2925,2 cm^{-1} ir 2857,2 cm^{-1} būdingos $\nu(\text{CH}_2)$ virpesiams juosta, o 1077,9 cm^{-1} juosta liudija $\nu(\text{C-O-C})$ grupės buvimą. EDA spektre (21 pav., (2)) matoma sugerties juosta ties smailėmis 3363,4 cm^{-1} ir 3284,1 cm^{-1} , kurios būdingos $\nu(\text{NH})$ grupėms. Taip pat stebima asimetrinė ir simetrinė smailės ties 2921,4 cm^{-1} ir 2853,4 cm^{-1} , kurios rodo $\nu(\text{CH}_2)$ grupę. PVA spektre (21 pav., (3)) matoma sugerties

juosta ties smaile 3303 cm^{-1} , būdinga $\nu(\text{OH})$ virpesiams. PVA yra vinilacetato grandžių, todėl ties $1735,3\text{ cm}^{-1}$ stebima acetato grupės $\nu(\text{CO})$ sugerties juosta. Ties $2940,3\text{ cm}^{-1}$ stebimos $\nu(\text{CH}_2)$ virpesių juostos. TDI spektre (21 pav., (4)) stebima izocianato grupėms būdinga sugerties juosta su smaile ties $2245,2\text{ cm}^{-1}$. Panašūs FT-IR spektrai gauti ir kitais PUUK atvejais. PUUK sandarai patvirtinti taip pat atlikta elementinė analizė (1, 4, 7 lentelės) ir TGA bei DTGA tyrimai (3, 6, 9 lentelės, 5-8, 11-14, 17-20 pav.).

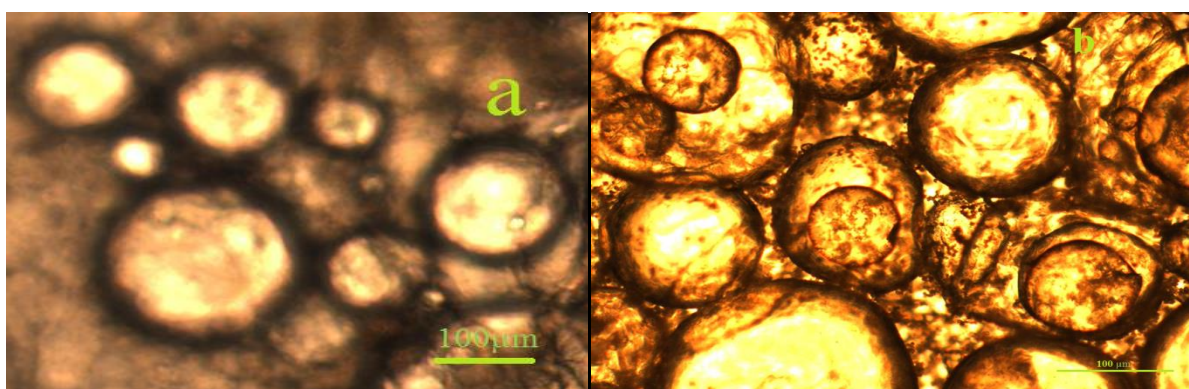


22 pav. PUUK gavimas iš PVA, TDI ir įvairių diaminų (EDA, BDA arba PDA).

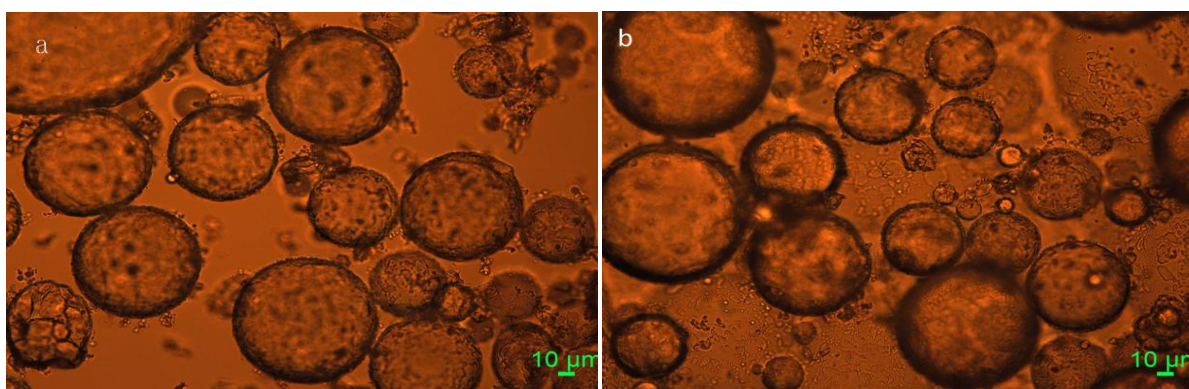
PUU kapsulių apvaskalas susidarė poliadicijos reakcijos metu. Manoma, kad susintetintas PUU kapsulių apvaskalas sudarytas iš skirtingų sandaros grandžių: I – hidroksietileno; II – su viena laisva $-\text{NCO}$ arba III – su viena laisva $-\text{NH}_2$ grupe, kai sureaguoja viena hidroksietileno grandies hidroksigrupė su viena TDI diizocianato grupe, o, kitai NCO grupei likus laisvai, gali susidaryti įvairaus ilgio polikarbamido grandinė, besibaigianti $-\text{NCO}$ ar $-\text{NH}_2$ grupe. Polikarbamido grandinės gali susidaryti reguojant diizocianato pertekliui su diaminu. Esant reakcijos terpėje vandens, iš diizocianatų gali susidaryti diaminai, o šie, reguodami su diizocianatais, gali sudaryti poli-

karbamidus. Polikarbamidai su galinėmis -NCO grupėmis taip pat gali reaguoti su PVA -OH grupe; IV – susiūtos struktūros grandys, kai sureaguoja dvi PVA hidroksigrupės su dviem diizocianato grupėmis. Šiuo atveju taip pat gali susidaryti įvairaus ilgio polikarbamidiniai tilteliai (22 pav.).

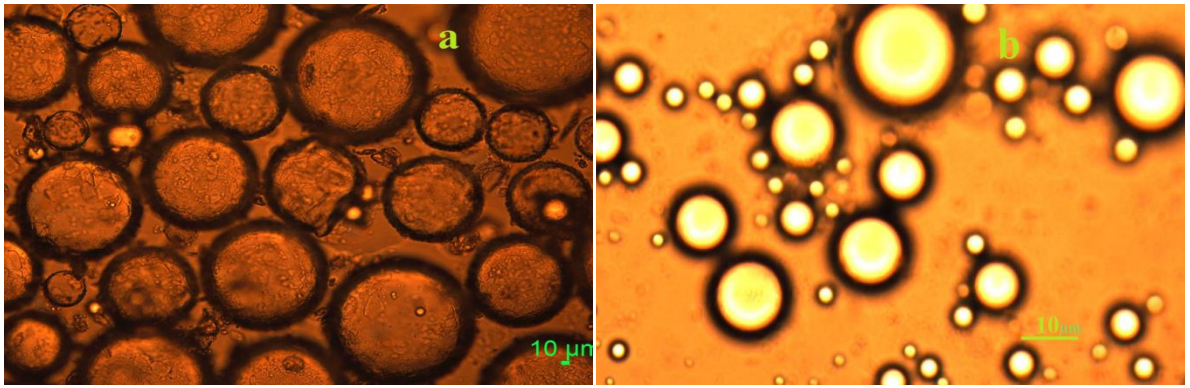
Susintetintos PUUK kapsulės be MG iškart po reakcijos buvo nufotografuotos optiniu mikroskopu (23-25 pav.) ir įvertintas kapsulių dydis bei jų pasiskirstymo intervalas. Iš 23-25 pav. pateiktų nuotraukų matyti, kad kapsulių paviršius yra nelygus, gruoblėtas, o dydžių pasiskirstymo intervalas platus. Nuotraukose matomų kapsulių dydis siekė nuo 10 iki 150 μm , tačiau daugiausia yra $\sim 75 \mu\text{m}$ dydžio. Gautų PUUK kapsulių dydis nepriklauso nuo įdėto DA bei jo įdėjimo kiekio ar laiko. Žinoma, kad jų dydis labiausiai priklauso nuo maišymo greičio, o jis visais atvejais buvo vienodas (400 aps/min).



23 pav. PUUK nuotraukos darytos optiniu mikroskopu. PUUK sintezės sąlygos: (a) - [PVA]:[EDA]=1:1, kai EDA dedamas kartu su TDI; (b) - [PVA]:[EDA]=1:6, kai EDA dedamas kartu su TDI.

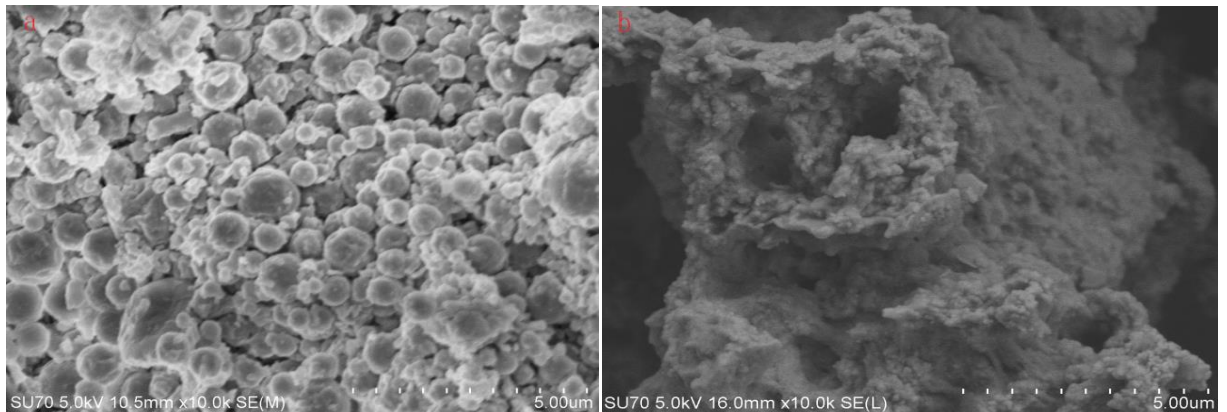


24 pav. PUUK nuotraukos darytos optiniu mikroskopu. PUUK sintezės sąlygos: (a) - [PVA]:[BDA]=1:5, kai BDA dedamas po 30 min nuo reakcijos pradžios; (b) - [PVA]:[BDA]=1:6, kai BDA dedamas po 30 min nuo reakcijos pradžios.

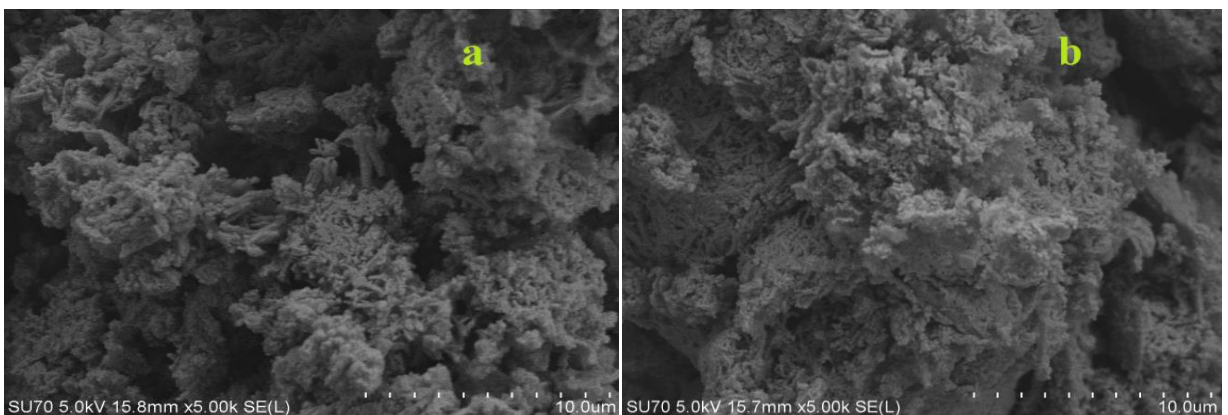


25 pav. PUUK nuotraukos darytos optiniu mikroskopu. PUUK sintezės sąlygos: (a) - [PVA]:[PDA]=1:1, kai PDA dedamas kartu su TDI; (b) - [PVA]:[PDA]=1:5, kai PDA dedamas kartu su TDI.

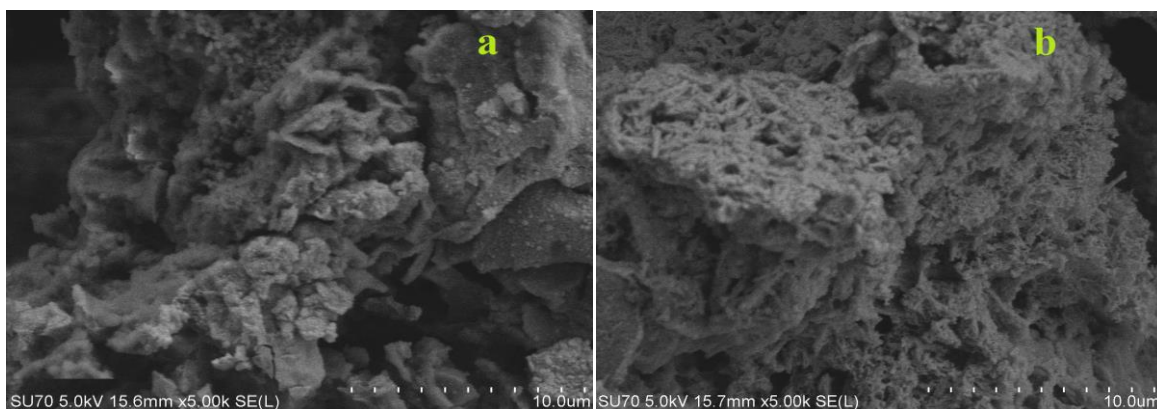
Išdžiovintos liofilizavimo būdu kapsulės be MG buvo fotografuojamos skenuojančiu elektroniniu mikroskopu. Nuotraukose matoma, kad jų paviršius yra porėtas (26-28 pav.).



26 pav. PUU kapsulių, gautų iš PVA, TDI ir EDA, SEM nuotraukos: a - [PVA]:[EDA]=1:1, kai EDA dedamas reakcijos pradžioje; b- [PVA]:[EDA]=1:6, kai EDA dedamas reakcijos pradžioje.



27 pav. PUU kapsulių, gautų iš PVA, TDI ir BDA, SEM nuotraukos: a- [PVA]:[BDA]=1:1, kai BDA dedamas reakcijos pradžioje; b- [PVA]:[BDA]=1:6, kai BDA dedamas reakcijos pradžioje.

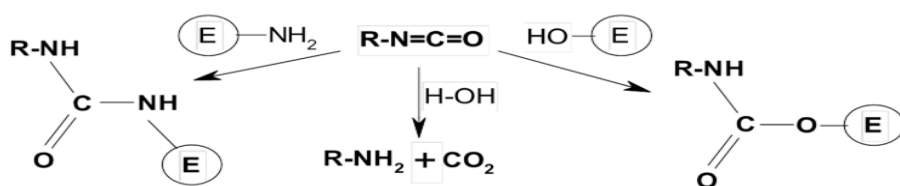


28 pav. PUU kapsulių, gautų iš PVA, TDI ir PDA, SEM nuotraukos: a- [PVA]:[PDA]=1:1, kai PDA dedamas reakcijos pradžioje; b- [PVA]:[PDA]=1:6, kai PDA dedamas reakcijos pradžioje.

3.5 MG imobilizavimo PUUK ir pasišalinimo iš jų tyrimas

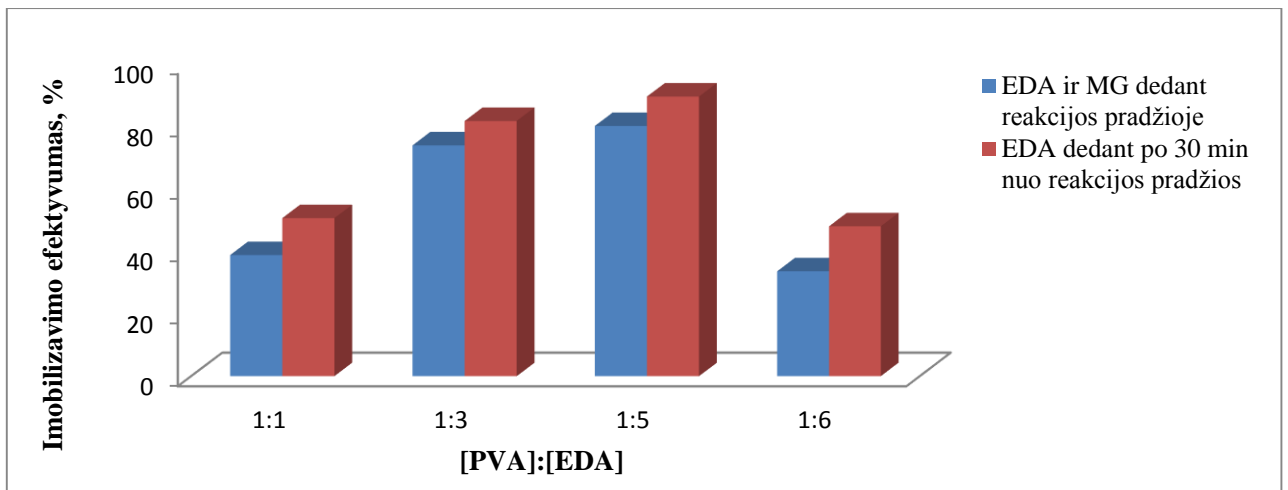
Viena iš galimų PUUK taikymo sričių yra fermentų imobilizavimas. Šiame darbe, kaip modelinis fermentas naudojama maltogenazė (MG). MG buvo imobilizuota kapsulėse, kurios susintetintos, naudojant skirtingus DA ir jų kiekį. MG imobilizavimas buvo vykdomas PUUK sintezės metu (2.3.3 metodika) ir po PUUK sintezės (2.3.2 metodika). Buvo ištirtas MG imobilizavimo efektyvumas PUUK bei jos pasišalinimas iš PUUK apvalkalo. Gauti imobilizavimo efektyvumo rezultatai apskaičiuoti pagal 2.3.6.4 ir 2.3.6.5 formules.

Imobilizuojant MG kapsulėse, vyksta kovalentinių ryšių susidarymas tarp PUUK apvalkale esančių laisvų izocianatograpių ir MG amino- arba hidroksigrapių. Kadangi reakcijos vykdomos vandeniniuose tirpaluose, todėl galima izocianato grupių reakcija su vandeniu, tačiau prisijungimas vyksta sparčiau per aminogrupes (5 schema.). Be to, MG gali imobilizuotis adsorbcijos būdu.

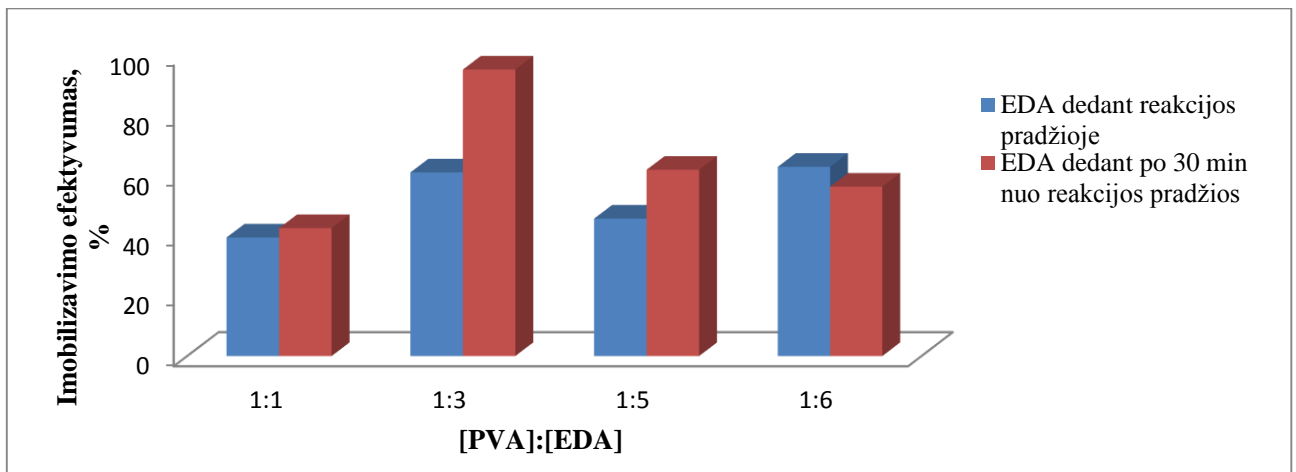


5 schema. Fermento kovalentinis imobilizavimas PUUK

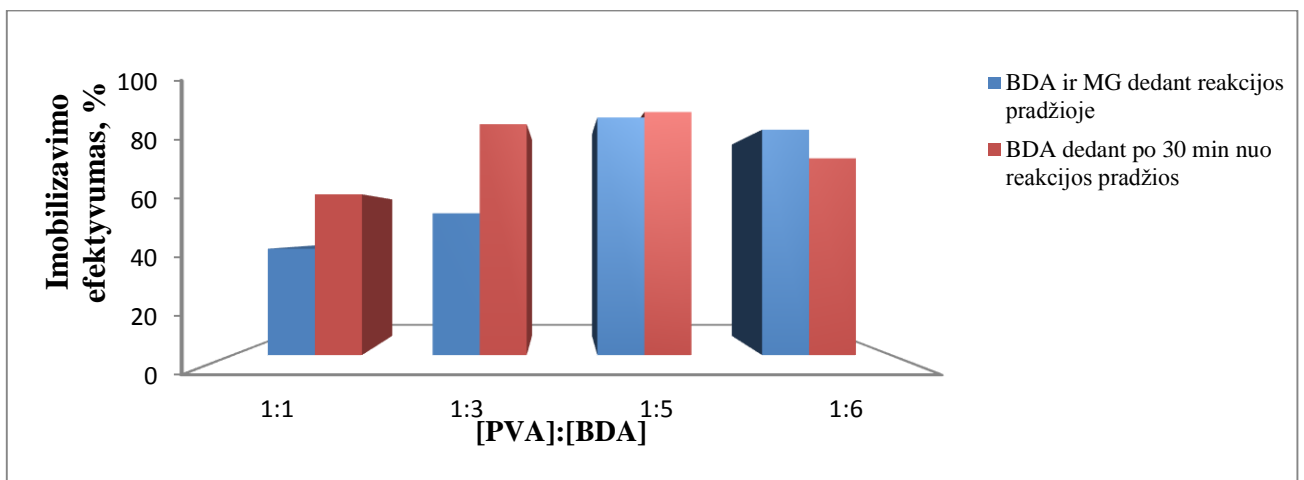
Nustatyta, kad fermentas geriausiai imobilizuojasi, kai porų skersmuo yra 10 kartų didesnis už fermento skersmenį. Galima daryti išvadą, kad geriausiai imobilizavimas turėtų vykti, kai poros yra 30-100 nm ribose. Toks porų dydis reikalingas, kad fermentas galėtų laisvai difunduoti į jų vidų iki dugno, o substratas ir produktas galėtų laisvai prieiti prie fermento ir išeiti. Esant mažoms poroms, fermentas nedifunduoja iki dugno, o gali prisikabinti ant sienelės, prie poros viršaus ir neišnaudoti viso poros paviršiaus ploto [58].



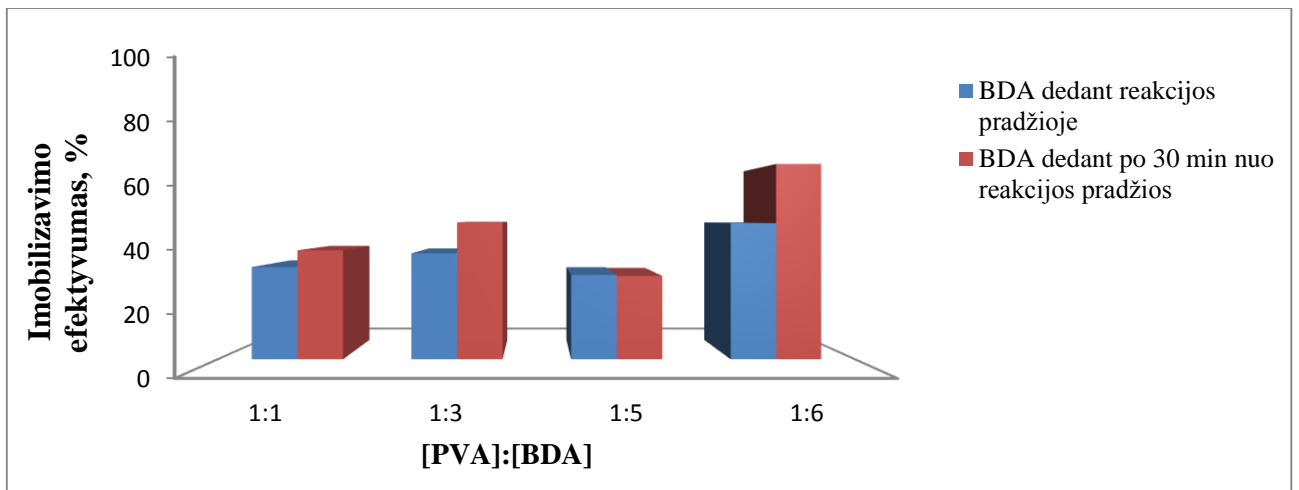
29 pav. MG imobilizavimo efektyvumo priklausomybė nuo PVA ir EDA santykio, imobilizuojant PUUK sintezės metu



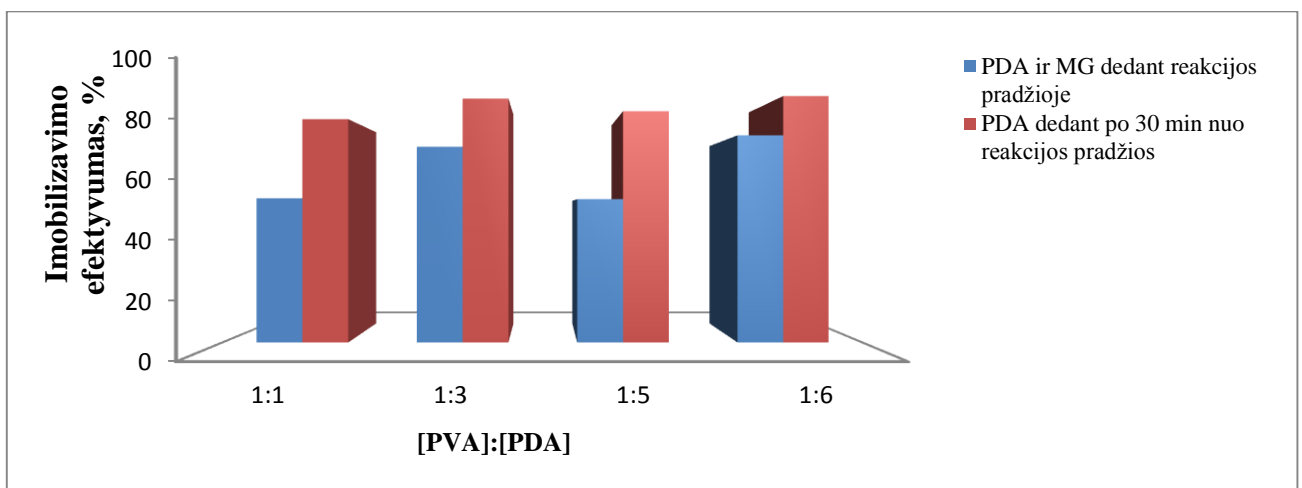
30 pav. MG imobilizavimo efektyvumo priklausomybė nuo PVA ir EDA santykio, imobilizuojant po PUUK sintezės



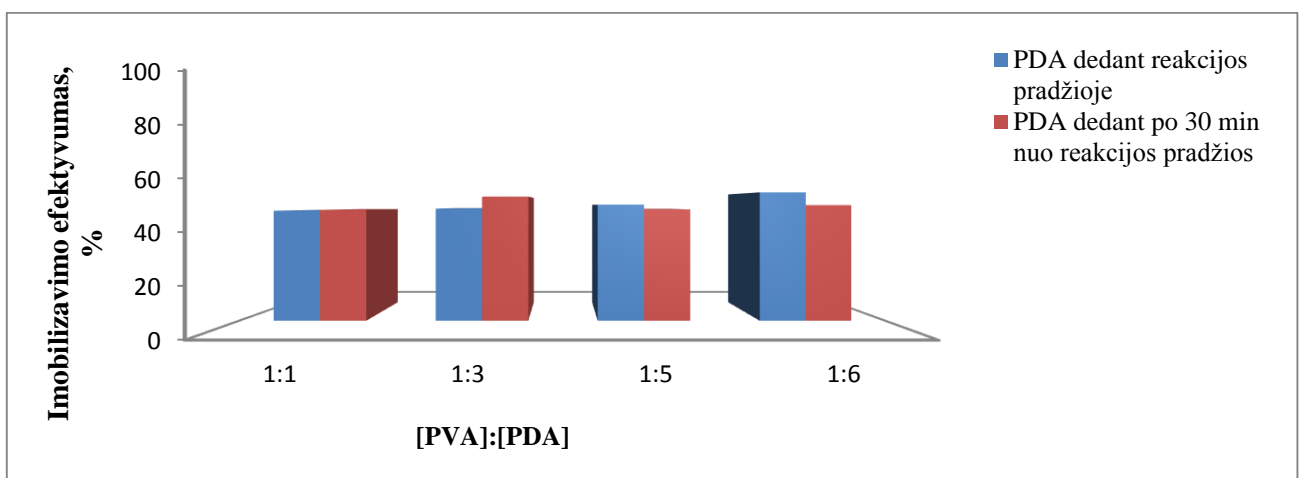
31 pav. MG imobilizavimo efektyvumo priklausomybė nuo PVA ir BDA santykio, imobilizuojant PUUK sintezės metu



32 pav. MG imobilizavimo efektyvumo priklausomybė nuo PVA ir BDA santykio, imobilizuojant PUUK po sintezės



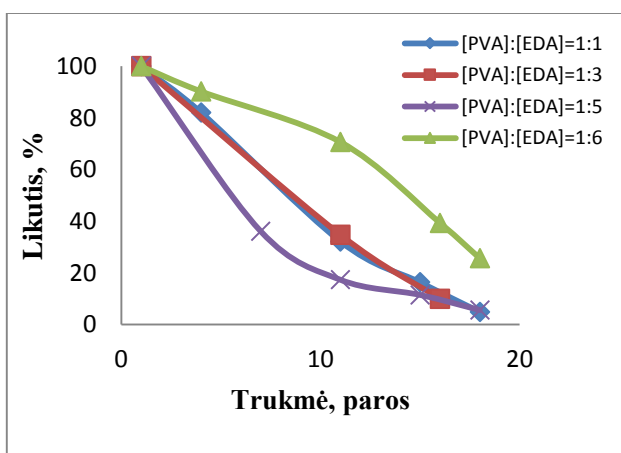
33 pav. MG imobilizavimo efektyvumo priklausomybė nuo PVA ir PDA santykio, imobilizuojant PUUK sintezės metu



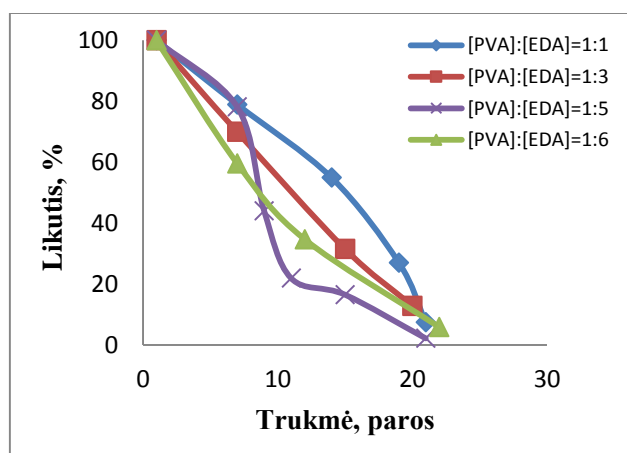
34 pav. MG imobilizavimo efektyvumo priklausomybė nuo PVA ir PDA santykio, imobilizuojant PUUK po sintezės

Ištirti imobilizuotos maltogenazės imobilizavimo efektyvumas (IE). PUUK, sintezei naudojant įvairius DA, kai DA dedamas kartu su TDI reakcijos pradžioje arba po 30 minučių ir kai fermentas imobilizuojamas PUUK sintezės metu arba po jos (29-34 pav.). Iš 29-34 pav. pateiktų duomenų matyti, kad daugeliu atvejų didesnis imobilizavimo efektyvumas gaunamas, kai DA dedamas po 30 minučių nuo reakcijos pradžios. Didžiausiais imobilizavimo efektyvumas (95 %) gautas, kai PUUK sintezė vykdoma, esant PVA ir EDA moliniam santykiui 1:3, DA dedamas po 30 minučių, o fermentas imobilizuojamas po sintezės. Gautų PUUK paviršiaus plotas, šiuo atveju yra 33,9 m²/g, o bendras porų tūris – 0,15 cm³/g. Mažiausias imobilizavimo efektyvumas (29 %) gautas, kai PUUK sintezė vykdoma, esant [PVA]:[BDA] moliniam santykiui 1:5, DA dedamas po 30 minučių ir fermentas imobilizuojamas po sintezės. Šių PUUK paviršiaus plotas lygus 16,8 m²/g, o bendras porų tūris – 0,089 cm³/g. Manoma, kad esant didesniai kapsulių apvalkalo paviršiaus plotui ir porų tūriui, daugiau MG gali sorbuotis kapsulėse. Tačiau, įvertinus IE vidurkį, didesnis IE yra, kai MG imobilizuojama sintezės metu.

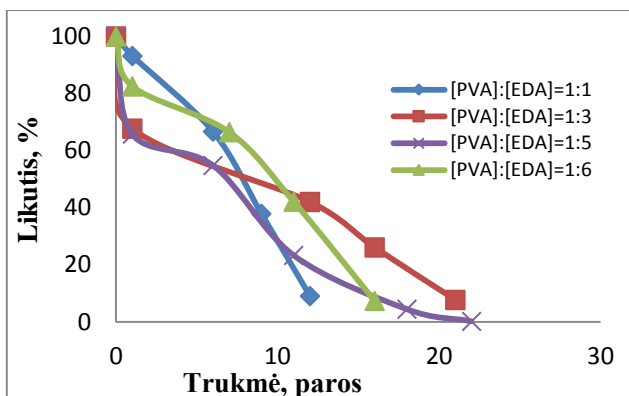
MG pasišalinimas iš poli(uretankarbamidinių) kapsulių priklauso nuo jų sintezės ir fermento imobilizavimo sąlygų. Fermento pasišalinimo iš PUUK, kai jis buvo imobilizuojamas kapsulių sintezės metu arba po jos, duomenys pateikti 35-46 paveiksluose.



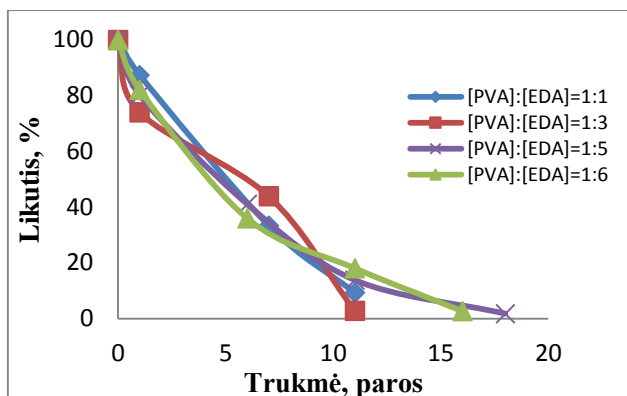
35 pav. MG likučio PUUK priklausomybė nuo laikymo trukmės, kai EDA dedamas PUUK sintezės pradžioje, o MG imobilizuojama po sintezės



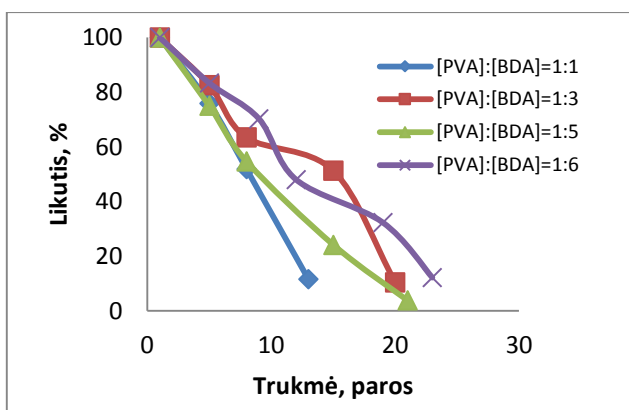
36 pav. MG likučio PUUK priklausomybė nuo laikymo trukmės, kai EDA dedamas po 30 min nuo PUUK sintezės pradžios, o MG imobilizuojama po sintezės



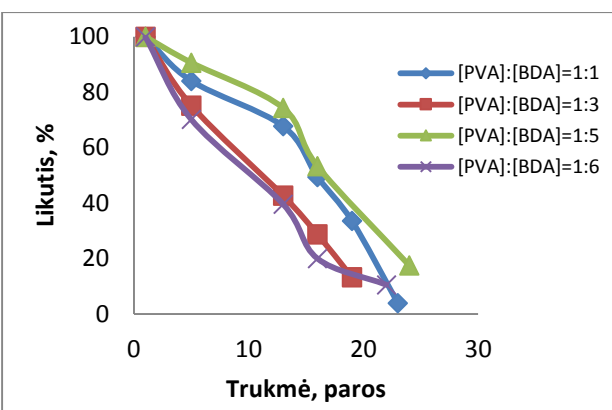
37 pav. MG likučio PUUK priklausomybė nuo laikymo trukmės, kai EDA dedamas PUUK sintezės pradžioje, o MG imobilizuojama sintezės metu



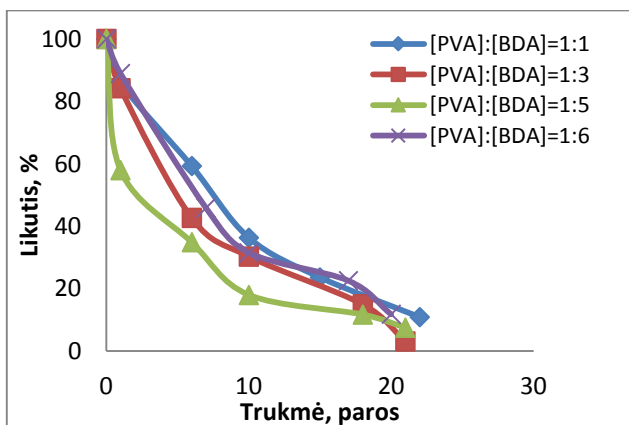
38 pav. MG likučio PUUK priklausomybė nuo laikymo trukmės, kai EDA dedamas po 30 min nuo PUUK sintezės pradžios, o MG imobilizuojama sintezės metu



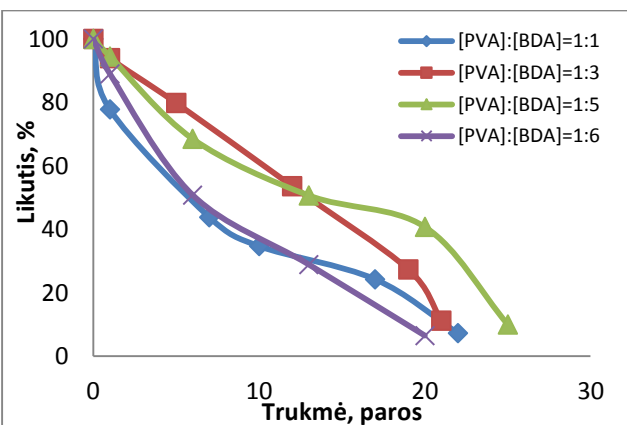
39 pav. MG likučio PUUK priklausomybė nuo laikymo trukmės, kai BDA dedamas PUUK sintezės pradžioje, o MG imobilizuojama po sintezės



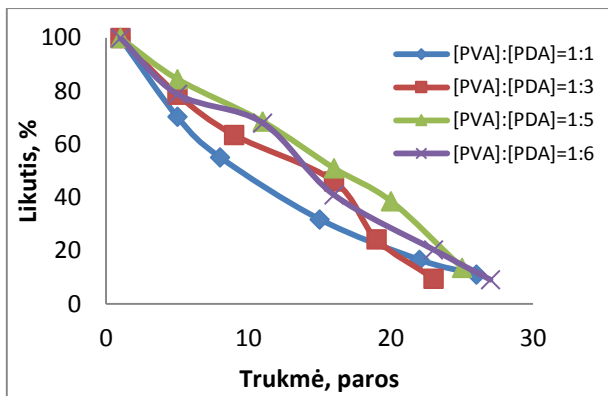
40 pav. MG likučio PUUK priklausomybė nuo laikymo trukmės, kai BDA dedamas po 30 min nuo PUUK sintezės pradžios, o MG imobilizuojama po sintezės



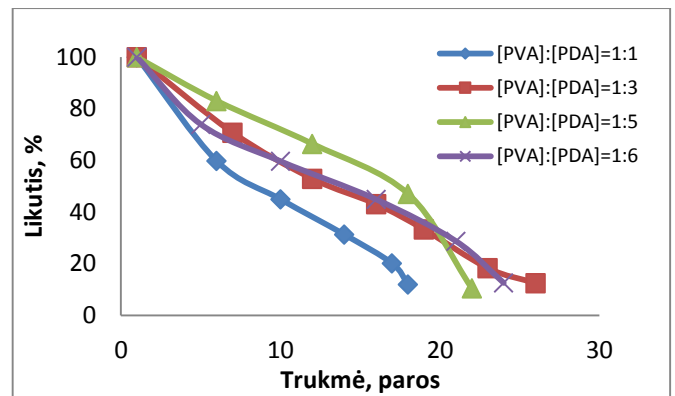
41 pav. MG likučio PUUK priklausomybė nuo laikymo trukmės, kai BDA dedamas PUUK sintezės pradžioje, o MG imobilizuojama sintezės metu



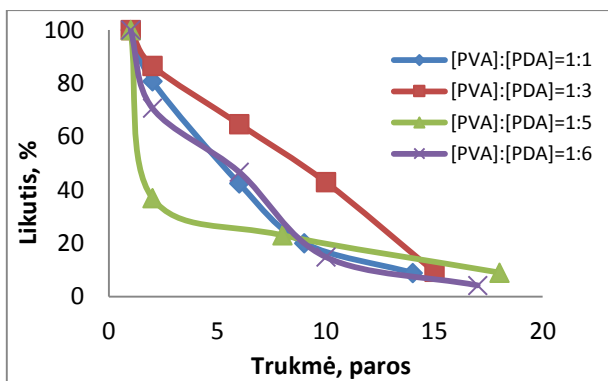
42 pav. MG likučio PUUK priklausomybė nuo laikymo trukmės, kai BDA dedamas po 30 min nuo PUUK sintezės pradžios, o MG imobilizuojama sintezės metu



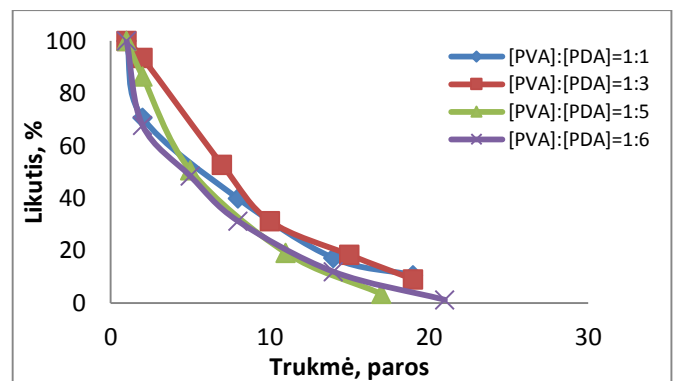
43 pav. MG likučio PUUK priklausomybė nuo laikymo trukmės, kai PDA dedamas PUUK sintezės pradžioje, o MG imobilizuojama po sintezės



44 pav. MG likučio PUUK priklausomybė nuo laikymo trukmės, kai PDA dedamas po 30 min nuo PUUK sintezės pradžios, o MG imobilizuojama po sintezės



45 pav. MG likučio PUUK priklausomybė nuo laikymo trukmės, kai PDA dedamas PUUK sintezės pradžioje, o MG imobilizuojama sintezės metu



46 pav. MG likučio PUUK priklausomybė nuo laikymo trukmės, kai PDA dedamas po 30 min nuo PUUK sintezės pradžios, o MG imobilizuojama sintezės metu

Išnagrinėjus duomenis pateiktus 35-46 paveiksluose, matoma, kad PUUK sintezei naudojant skirtingus DA, gaunamas skirtingas fermento pasišalinimas. Didinant DA kiekį ir pailginus jo įdėjimo laiką į reakcijos mišinį, sunku pastebėti MG pasišalinimo iš PUUK po 27 parų tendencingumą.

Naudojant EDA (35-38 pav.), galima pastebėti, kad, kai DA dedamas kartu su TDI bei imobilizuojant MG po sintezės, daugeliu atvejų MG likutis pasišalina iki 20 paros, o dedant DA po 30 minučių nuo TDI įdėjimo, MG pasišalina per ilgesnę trukmę. Imobilizuojant MG sintezės metu bei EDA dedant po 30 minučių nuo reakcijos pradžios, visais atvejais MG pilnai pasišalina iki 20 dienos, o, dedant EDA kartu su TDI į reakcijos mišinį, esant PVA ir EDA moliniam santykiui 1:3 ir 1:5, MG likutis pilnai pasišalina po 20 paros.

Nagrinėjant maltogenazės likučio PUUK priklausomybę nuo laikymo trukmės, PUUK sintezei naudojant BDA (39-42 pav.). Beveik visais atvejais matyti, kad MG pasišalina iš PUUK po 20 parų, tiek imobilizuojant sintezės metu, tiek po jos. Greičiausiai MG pasišalina, esant PVA ir

BDA santykiui 1:1, imobilizuojant po sintezės, dedant DA kartu su TDI. PUUK paviršiaus plotas šiuo atveju yra $41 \text{ m}^2/\text{g}$, o apvalkalo bendras porų tūris – $0,26 \text{ cm}^3/\text{g}$. Lėčiausiai šioje sistemoje MG pasišalina iš PUUK, gautų, esant PVA ir BDA santykiui 1:5, dedant DA po 30 minučių nuo reakcijos pradžios, o MG imobilizuojant sintezės metu. Šiomis sąlygomis susintetintų PUU kapsulių paviršiaus plotas lygus $16,8 \text{ m}^2/\text{g}$, o bendras porų tūris $0,089 \text{ cm}^3/\text{g}$. Lyginant šiuos duomenis, galima daryti prielaidą, kad, esant didesnėms poroms MG greičiau pasišalina iš apvalkalo.

Nagrinėjant maltogenazės likučio priklausomybę nuo laikymo trukmės, naudojant PDA (43-46 pav.), galima pastebėti, kad, kai PDA dedamas kartu su TDI bei MG mobilizuojant po sintezės, jos pasišalinimas užtrunka nuo 23 iki 27 paros, o, dedant PDA po 30 minučių nuo TDI įdėjimo, MG pasišalina greičiau – tarp 18 iki 23 paros. Imobilizuojant MG sintezės metu bei PDA dedant po 30 minučių nuo reakcijos pradžios, MG pasišalinimo iš PUUK intervalas yra nuo 14 iki 18 parų, o, dedant EDA kartu su TDI į reakcijos mišinį – nuo 17 iki 21 paros.

Lyginant MG, įkapsuliuotos PUUK, kurios gautos naudojant skirtingus diametus, greičiausiai MG pasišalina iš PUUK, gautų naudojant EDA, kai $[\text{PVA}]:[\text{EDA}]=1:3$, EDA dedamas į reakcijos mišinį po 30 minučių nuo reakcijos pradžios, o MG imobilizuojama sintezės metu. IE šiuo atveju siekia beveik 93 %, o po 11 parų PUUK lieka ~ 2 % imobilizuoto fermento. Lėčiausiai fermentas pasišalina iš PUUK, gautų naudojant PDA, kai $[\text{PVA}]:[\text{PDA}]=1:3$, PDA dedamas į mišinį po 30 minučių nuo reakcijos pradžios, o MG imobilizuojama po sintezės. Šiuo atveju IE siekia 54 %, o po 27 parų lieka ~ 12 % imobilizuoto fermento. Galima daryti prielaidą, kad MG iš PUUK nepasišalina, yra prijungta kovalentiniu būdu.

4. IŠVADOS

1. Susintetintos poli(uretankarbamidinės) kapsulės (PUUK) iš poli(vinilalkoholio), (2,4-toluendiizocianato (TDI) ir įvairių diaminų (DA): etandiamino (EDA), 1,4-butandiamino arba 1,3-propandiamino (PDA). Susintetintų kapsulių sandara įrodyta FT-IR spektrais, chemine ir elementine analizėmis.
2. Didinant DA kiekį ir jį įdėjus kartu su TDI arba po 30 minučių nuo reakcijos pradžios, izocianatograpių kiekis apvalkale mažėja, o PUUK išeiga didėja dėl polikarbamidinių segmentų susidarymo. Didžiausia apvalkalo išeiga (~ 81%) gaunama naudojant PDA.
3. Dėl uždarų porų susidarymo PUUK paviršiaus plotas ir bendras apvalkalo tūris mažėja, didinant DA kiekį reakcijos mišinyje.
4. Didinant DA kiekį, maltogenazės (MG) imobilizavimo efektyvumas (IE) didėja, ją imobilizuojant PUUK sintezės metu arba po jos. Didesnis efektyvumas gaunamas, kai DA dedamas po 30 minučių nuo reakcijos pradžios. Didžiausiais IE (95 %) gautas, kai PUUK sintezė vykdoma, esant PVA ir EDA moliniam santykiui 1:3, EDA dedamas po 30 minučių, o fermentas imobilizuojamas po sintezės.
5. Greičiausiai MG pasišalina iš PUUK (po 11 parų lieka apie 2 % imobilizuotos MG), esant [PVA]:[EDA]=1:3, EDA dedamas į reakcijos mišinį po 30 minučių nuo reakcijos pradžios, o MG imobilizuojama sintezės metu. Lėčiausiai MG pasišalina iš PUUK (po 27 parų lieka apie 12 % imobilizuotos MG), esant [PVA]:[PDA]=1:6, PDA dedamas į mišinį iš karto, o MG imobilizuojama po sintezės.

PUBLIKACIJOS MAGISTRINIO DARBO METU

DALYVAVIMAS TARPTAUTINĖSE MOKSLINĖSE KONFERENCIJOSE (TEZĖS)

1. S. Maciulyte, I. Viliunaite, J. Niedritis, T. Kochane, S. Budriene. Microencapsulation of water – soluble materials by a water in oil emulsion *Baltic Polymer Symposium 2014, Laulasmaa, Estonia, September 24-26. Programme and abstracts.* 2014. P. 64.
2. S. Mačiulytė, I. Viliūnaitė, J. Niedritis, T. Kochanė, S. Budrienė. Preparation and characterization of poly(urethane-urea) microcapsules with different diamines, diisocyanates and poly(vinyl alcohol). *Baltic Polymer Symposium 2015, Programme and proceedings.* Riga: Institute of polymer materials. 2015. P. 128. (ISBN: 9789934542121).

Synthesis and Investigation of Poly(urethane-urea) Capsules from Poly(vinyl alcohol), 2,4-Toluene diisocyanate and various Diamines.

J. Niedritis

Master work has been carried out at the Department of Polymer Chemistry of Vilnius University

SUMMARY

Poly(urethane-urea) (PUU) capsules were synthesized from poly(vinyl alcohol) (PVA), toluene diisocyanate (TDI), various diamines such as: ethylenediamine (EDA), 1,3-diaminopropane (PDA) and 1,4-diaminobutane (BDA) by inverse emulsion method. The poly(urethane-urea) capsules were formed by varying reaction conditions: molar ratio of PVA and diamine and different diamine injection time. The structure of shell of capsules has been proven by chemical analytical methods and by FT-IR spectra. Thermal stability of dried capsules in inert atmosphere was studied by simultaneous thermal analysis. The surface area and the pore size of shell of microcapsules were determined by the physical adsorption/desorption of nitrogen by using BET and BJH methods, respectively. The size of the PUU capsules were investigated by using the optical microscope. Properties of synthesized PUU capsules and their application for immobilization of maltogenase (MG) was investigated. The highest efficiency of immobilization of MG was 95 % during the synthesis of capsules from PVA, TDI and EDA, when their initial molar ratio was 1:6:3. Capsules with encapsulated MG were studied as enzyme delivery systems. MG release depends on used diamine for synthesis of capsules. The efficiency of immobilization of MG during the synthesis of capsules was higher than efficiency of immobilization after their synthesis .

5. LITERATŪROS ŠARAŠAS

1. Weisi Y. Development of Novel Microencapsulation Processes, University of Rochester, New York, 2009, p. 131.
2. Emami Sh. H, Orang F., Morteza M. and Rafienia M. R. A study of starch addition on burst effect and diameter of polyurethane microspheres containing theophylline. *Polym. Adv. Technol.* 19, 2008, p. 167-170.
3. Tischer W., Wedekind F. Immobilized Enzymes: Methods and Applications. *Top. Curr. Chem.* 1999, 225 p.
4. Robinson P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem.* 59, 2015, p. 1-41.
5. Kadziauskas J. Biochemijos pagrindai. VU leidykla, ISBN 978-955-33-298-5. 2008, 443 p.
6. Brady D., Jordaan J., Clinton S., Chetty A., Arumugam C. Spherezymes: A novel structured self-immobilisation enzyme technology. *BMC Biotechnology.* 2008.
7. Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology.* 35, 2004, p. 126-139.
8. Mohamad R., Marzuki H., Buang A., Abdul R. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 29 (2), 2015, p. 205-220.
9. Toscano L., Montero G., Stoytcheva M., Cervantes L. Comparison of the performances of four hydrophilic polymers as supports for lipase immobilisation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 28 (1), 2014, p. 52-60.
10. Mateo C., Palomo J., Fernandez-Lorente G., Guisan J. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology.* 40 (6), 2007, p. 1451-1463.
11. Praškevičius A., Burneckienė J., Ivanovienė L. Fermentai ir vitaminai. Kaunas. Kauno medicinos universiteto Spaudos ir leidybos centro leidykla. ISBN 995-479-12-4. 2002, 199 p.
12. Shtilman M.I. Immobilization on polymers. 2, 1993.
13. Six C., Richter F. Isocyanates, Organic in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.* Wiley-VCH. 2005.
14. Tisher W. and Kasche V. Immobilized enzymes: crystals or carriers *Reviews. TIBTECH.* 17, 1999, p. 326-335.
15. Shtilman M.I. Immobilization on polymers. 1993. VSP Utrecht, The Netherlands. 466 p.
16. Habeeb A., Hiramoto T. *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 1968, p. 16-26.
17. Verma L., Naebe M., Barrow C., Puri M. Enzyme Immobilisation on Amino-Functionalised Multi Walled Carbon Nanotubes: Structural and Biocatalytic Characterisation. 2013.

18. Kumar L., Nagar S., Mittal A., Garg N. Immobilization of xylanase purified from *Bacillus pumilus* VLK-1 and its application in enrichment of orange and grape juices. *J. Food Sci. Technol.* 51 (9), 2014.
19. Mars, G. J. & Scher, H. B. Controlled delivery of crop protecting agents, Wilkens, R.M. (Ed.) Taylor and Francis, London. 1990, p. 65-90.
20. Biswal I., Dinda A., Das D., Chowdary K. Encapsulation protocol for highly hydrophilic drug using non-biodegradable polymer. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 3 (2), 2011, p. 256-261.
21. Shukla P., Kalidhass B., Shah A. Preparation and characterization of microcapsules of water-soluble pesticide monocrotophos using polyurethane as carrier material. *J. Microencapsul.* 19 (3), 2002, p. 293-304.
22. Park S.J., Shin Y.S., Lee J.R. Preparation and Characterization of Microcapsules. *Nanomaterials and Biostructures.* 241, 2001, p. 502–508.
23. Green B., & Schleicher L. The National Cash Register Company, Dayton, Ohio. Oil containing microscopic capsules and method of making them. US Patent 2,800,457. 1957.
24. Dubey R., Shami T., Bhasker Rao K. Microencapsulation Technology and Applications. *Defence Science Journal.* 59, 2009, p. 82-95.
25. Dubey R., Shami C. Microencapsulation technology and applications. *Defence Sci J,* 59, 2009, p. 82–95.
26. Mahmood T., Akhtar N. Stability of a Cosmetic Multiple Emulsion Loaded with Green Tea Extract. *ScientificWorldJournal.* 2013.
27. Crespy D., Landfester K. Miniemulsion polymerization as a versatile tool for the synthesis of functionalized polymers. *Beilstein J. Org. Chem.* 6, 2010, p. 1132-1148.
28. Sabyasachi M., Paramita D., Santanu K., Somasree R., Sushomasri M. Investigation on Processing Variables for the Preparation of Fluconazole-Loaded Ethyl Cellulose Microspheres by Modified Multiple Emulsion Technique. *AAPS PharmSciTech,* 10 (3), 2009.
29. Tiarks F., Landfester K., & Antonietti, M. Preparation of Polymeric Nanocapsules by Miniemulsion Polymerization. *Langmuir.* 17, 2001, p. 908-918.
30. Wang B., Jiang W., Yan H., Zhang X., Yang L., Deng L., Pan J. Novel PEG-graft-PLA nanoparticles with the potential for encapsulation and controlled release of hydrophobic and hydrophilic medications in aqueous medium. *Int. J. Nanomedicine.* 6, 2011, p. 1443-1451.
31. Luteri G., Sandoz L. Microencapsulated agricultural chemicals. US Patent 5883046. 1999, p 6.

32. Arshady R. Microspheres and microcapsules: A Survey of manufacturing techniques Part I Suspension crosslinking. *Polym. Eng. Sci.* 29 (24), 1989, p. 46-58.
33. Yamakawa I., Tsushima Y., Machida R., & Watanabe R. Preparation of neurotensin analogue containing Poly (DL-lactic acid) Microsphere formed by oil in water solvent evaporation. *J. Pharm. Sci.* 81, 1992, p. 899-903.
34. Arshady R. Microspheres and microcapsules: A survey of manufacturing techniques Part II Coacervation. *Polym. Eng. Sci.* 30 (15), 1990, p. 905-14.
35. Burgess D. & Carless J. Manufacture of gelatin/gelatin coacervate microcapsules. *Int. J. Pharma.* 27, 1985, p. 61-70.
36. Okoda J., Kusai. & Ueda S. Factors affecting microencapsulability in simple gelatin coacervation method. *J. Microencap.* 2(3), 1985, p. 163-73.
37. Dinarvand R., Moghadam H., Sheikhi A. & Atyabi F. Effect of surfactant HLB and different formulation variables on the properties of poly-D,L-lactide microspheres of naltrexone prepared by double emulsion technique. *J. Microencapsulation*, 22(2), 2005, p. 139–151.
38. Chemical Characterisation of Polyurethanes. M.J Forrest. *Rapra Review Reports* 9, 1999.
39. Król P. Synthesis methods, chemical structures and phase structures of linear polyurethanes. Properties and applications of linear polyurethanes in polyurethane elastomers, copolymers and ionomers. 52, 2007, p. 915–1015.
40. Zatorski W., Brzozowski Z., Kolbrecki A. New developments in chemical modification of fire-safe rigid polyurethane foams. *Polymer Degradation and Stability.* 93, 2008, p. 2071-2076.
41. A. Žemaitaitis. *Polimerų fizika ir chemija*. Kaunas: Technologijos leidykla. 2001, 559 p.
42. Romaškevič T., Budrienė S., Pielichowski K., Pielichowski J. Application of polyurethane-based materials for immobilization of enzymes and cells: a review. *Chemija.* 17 (4), 2006, p.74-89.
43. www.polyurethane.org (žiūrėta 2016 05 23).
44. Erlangung K. Synthesis and characterization of hyperbranched poly(urea-urethane)s. Dissertation des akademischen Grades Doctor rerum naturalium. Germany, 2004.
45. Kumar N. Studies of glucose oxidase immobilized carbon nanotube-polyaniline composites [MSc thesis]. Thapar University. 2009.
46. K. Daukšas ir kt. *Chemijos terminų aiškinamasis žodynas*. Mokslo ir enciklopedijų leidybos institutas. ISBN 5-420-01510-2. 2003, 935 p.
47. Frisch K., Vogt H. *Polyurethanes and Related Isocyanate Polymers*. 927 p.
48. Benning J. *Plastic Foams: the Physics and Chemistry of Product Performance and Process Technology*. 1, 1969.

49. Azizi N., Ladhari N., Majdoub M. Elaboration and Characterization of Polyurethane – based Microcapsules: Application in Textile. *Asian J.* 1 (3), 2011, p. 130-137.
50. Wang F., Ren X., Huang L., Meng X. Preparation and Characterization of Polyurethane Microcapsules Containing n-Octadecane with Styrene-Maleic Anhydride as a Surfactant by Interfacial Polycondensation. *J. of Applied Polymer Science.* 102, 2006, p. 4996-5006.
51. Bouchemal K., Briançon S., Perrier E., Fessi H., Bonnet I. & Zydowicz N. Synthesis and characterization of polyurethane and poly(ether urethane) nanocapsules using a new technique of interfacial polycondensation combined to spontaneous emulsification. *International Journal of Pharmaceutics.* 269, 2004, p. 89-100.
52. Bouchemal K., Briançon S., Couenne F., Fessi H. & Tayakout M. Stability studies on colloidal suspensions of polyurethane nanocapsules. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.* 6 (9-10), 2006, p. 3187-3192.
53. Rafienia M., Orang F. & Emami S. Preparation and Characterization of Polyurethane Microspheres Containing Theophylline. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers.* 21 (4), 2006, p. 341-349.
54. Shukla G., Kalidhass B., Shah A., Palaskar D. Preparation and Characterization of microcapsules of water-soluble pesticide monocrotophos using polyurethane as carrier material. *J. Microencapsulation.* 3 (19), 2002, p. 293-304.
55. Batyrbekov Y., Iskakov R. *Polyurethane as Carriers of Antituberculosis Drugs.* ISBN 978-953-51-0726-2. 2012.
56. Hohnsen H., Schmid R. Preparation of Polyurethane Nanocapsules by Miniemulsion Polyaddition. *J. Microencapsulation.* 24 (8), 2007, p. 731-742.
57. Maciulyte S., Kochane T., Budriene S., Microencapsulation of maltogenic α -amylase in poly(urethane–urea) shell: inverse emulsion method. *J. Microencapsul.* 32 (6), 2015, p. 547-558.
58. Cao L., *Carrier-bound immobilized enzymes,* Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2005.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo magistro darbo vadovams dokt. Sandrai Mačiulytei ir prof. Saulutei Budrienei už nuolatinę pagalbą, konsultacijas, pasitikėjimą ir kantrybę.

Dėkoju Chemijos Fakulteto Polimerų chemijos katedros kolektyvui už konsultacijas ir geranoriškumą.

Dėkoju už pagalbą ir konsultacijas VU Chemijos fakulteto Organinės chemijos katedros mokslo darbuotojai dr. Gražinai Petraitytei ir VU Chemijos fakulteto Neorganinės chemijos katedros vyriausiajai specialistei Olgai Opuchovič.