

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Rūta GRUŠKIENĖ

**KATIJONIZUOTI IR POLIETILENGLIKOLIU
MODIFIKUOTI CHITIZANO DARINIAI BEI
NANODALELĖS**

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, chemija (03P)

Vilnius, 2010

Disertacija rengta 2005-2009 metais Vilniaus Universiteto Chemijos fakulteto Polimerų chemijos katedroje. Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos valstybinis mokslo ir studijų fondas.

Darbas atliktas vykdant FP 6 projektą „SOCON“, kontrakto Nr. MRTN-CT-2004-512331, ir Lietuvos Pramoninės biotechnologijos plėtros programos projektą „TECHNOSACHARIDAS“, kontrakto Nr. N-04/2007.

Darbo vadovas:

Prof. dr. Ričardas Makuška (Vilniaus Universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P)

TURINYS

TURINYS	3
SANTRUMPOS	6
ĮVADAS	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA	11
1.1. „Klik” chemija	11
1.1.1. „Klik“ chemijos esmė, pagrindinės reakcijos ir pritaikymas	11
1.1.2. Cu(I) katalizuojama Huisgen 1,3-dipolinė azido-alkino ciklizacijos .. „klik“ reakcija	16
1.1.3. „Klik“ chemija polisacharidų modifikavimo reakcijose	22
1.2. Polisacharidų katijonizavimas	28
1.2.1. Katijoniniai celiuliozės ir krakmolo dariniai	28
1.2.2. Katijoniniai chitozono dariniai	36
1.3. Chitozono nanodalelės ir nanopluoštai	42
1.3.1. Chitozono nanodalelės	42
1.3.2. Katijonizuoto chitozono nanodalelės ir nanopluoštai	50
1.4. Literatūros apžvalgos apibendrinimas	53
2. DARBO METODIKA	54
2.1. Naudotos medžiagos ir reagentai	54
2.1.1. Polimerai ir oligomerai, naudoti kopolimerų sintezėje	54
2.1.2. Organinės medžiagos	54
2.1.3. Neorganinės medžiagos	56
2.1.4. Tirpikliai	56
2.1.5 Fermentai	57
2.2. Sintezių metodikos	58
2.2.1. Metoksipolietilenglikolio „aktyvavimas“	58
2.2.1.1. Metoksipolietilenglikolio alkino sintezė	58
2.2.1.2. Metansulfonilmetoksipolietilenglikolio sintezė	58
2.2.1.3. Metoksipolietilenglikolio azido sintezė	58
2.2.1.4. Metoksipolietilenglikolio sukcinato sintezė	59
2.2.2. Chitozono aminogrupių apsauga	59
2.2.2.1. N-ftaloilchitozono sintezė	59
2.2.2.2. Chitozono/dodecilsulfato komplekso ruošimas	59
2.2.3. Chitozono C(6) hidroksigrupės „aktyvavimas“	60
2.2.3.1. N-ftaloilchitozono C(6)-tozilinimas	60
2.2.3.2. N-ftaloilchitozono C(6)-azidinimas	60
2.2.3.3. N-ftaloilchitozono C(6)-propargilinimas	60
2.2.4. CDK esančio chitozono C(6) hidroksigrupės „aktyvavimas“	61
2.2.4.1. CDK esančio chitozono C(6)-tozilinimas	61
2.2.4.2. CDK esančio chitozono C(6)-brominimas	61

2.2.4.3. CDK esančio chitozano modifikavimas trichlortriazinu.....	61
2.2.4.4. CDK esančio chitozano C(6)-azidinimas.....	61
2.2.5. Chitozano azidinio reagentų sintezė	62
2.2.5.1. Chlorhidrino azido (CHA) sintezė	62
2.2.5.2. Trifluormetansulfonilazido (TFA) sintezė	62
2.2.5.3. Imidazol-1-sulfonilazido hidrochlorido (ISA) sintezė.....	62
2.2.6. N-azidinto chitozano sintezių metodikos	63
2.2.6.1. N-azidinto chitozano sintezė, naudojant chlorhidrino azidą	63
2.2.6.2. N-azidinto chitozano sintezė, naudojant NaN ₃ ir NaNO ₂	63
2.2.6.3. N-azidinto chitozano sintezė, naudojant trifluormetan- sulfonilazidą.....	63
2.2.6.4. N-azidinto chitozano sintezė, naudojant imidazol-1-sulfonilazido hidrochloridą.....	64
2.2.7. Chitozano skiepytųjų kopolimerų sintezė.....	64
2.2.7.1. Chitozano-N-TMPEG skiepytųjų kopolimerų sintezė “klik” chemijos metodu	64
2.2.7.2. Chitozano-C(6)-TMPEG skiepytųjų kopolimerų sintezė “klik” chemijos metodu.....	65
2.2.7.3. Chitozano-N-MPEG skiepytųjų kopolimerų sintezė, naudojant MPEG sukcinatą	65
2.2.8. Chitozano katijonizavimas N-2,3-epoksipropil-N,N,N-trimetilamonio chloridu	66
2.2.8.1. Chitozano katijonizavimas EPTMAC rūgštinėje terpėje	66
2.2.8.2. Chitozano katijonizavimas EPTMAC neutralioje terpėje	66
2.2.8.3. Chitozano katijonizavimas EPTMAC šarminėje terpėje	66
2.2.9. CDK esančio chitozano O-katijonizavimas	67
2.2.10. Chitozano-N-MPEG skiepytųjų kopolimerų katijonizavimas	67
2.2.11. Katijonizuoto chitozano fermentinė hidrolizė	67
2.2.12. Katijonizuoto chitozano destrukcija UV spinduliais	67
2.2.13. Chitozano N-modifikavimas di- arba trikarboksirūgštimis.....	68
2.2.13.1. Chitozano N-modifikavimas adipo rūgštimi	68
2.2.13.2. Adipo rūgštimi modifikuoto chitozano N-modifikavimas CPAD	68
2.3. Analizių metodikos	68
2.3.1. Pirminių aminogrupių, karboksigrupių, epoksigrupių ir azoto kiekio nustatymas	68
2.3.2. Joninėje formoje esančio chloro kiekio nustatymas	69
2.3.3. Chitozano azidinio laipsnio nustatymas	69
2.3.3.1. Iš aminogrupių kiekio	69
2.3.3.2. Iš azoto kiekio	70
2.3.3.3. Iš FT-IR spektrų	70

2.3.4. Chitozano pakeitimo laipsnio jo kopolimeruose skaičiavimas	70
2.3.4.1. Chitozano- <i>N</i> -TMPEG kopolimeruose.....	71
2.3.4.2. Chitozano- <i>O</i> -TMPEG kopolimeruose	71
2.3.4.3. Chitozano katijonizavimo laipsnio nustatymas.....	71
2.3.4.4. Naudojant ¹ H BMR spektrus.....	72
2.3.5. Vario kiekio chitozano- <i>N</i> -TMPEG kopolimeruose nustatymas	72
2.3.6. Spektroskopinis chitozano darinių tyrimas	73
2.4. Chitozano skiepytųjų kopolimerų savybių tyrimas	73
2.4.1. Ribinio klampos skaičiaus nustatymas	73
2.4.2. Dinaminės klampos nustatymas.....	73
2.4.3. Kopolimerų molekulinės masės nustatymas molekulinę sietų chromatografijos metodu	74
2.4.4. Dinaminė šviesos sklaida	74
2.4.5. Potenciometrinis titravimas	75
2.4.6. Liofilizavimas	75
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	76
3.1. Chitozano ir MPEG „aktyvavimas“	76
3.1.1. Chitozano <i>N</i> -azidinimas.....	76
3.1.2. Chitozano aminogrupių apsauga.....	83
3.1.3. <i>C</i> (6)-funkcionalizuotų <i>N</i> -apsaugoto chitozano darinių sintezė.....	86
3.1.4. Metoksipolietilenglikolio „aktyvavimas“	90
3.2. Chitozano-MPEG kopolimerų sintezė „klik“ chemijos metodu.....	93
3.2.1. Chitozano- <i>N</i> -TMPEG kopolimerų sintezė ir savybės.....	93
3.2.2. Chitozano- <i>C</i> (6)-TMPEG kopolimerų sintezė naudojant <i>N</i> -ftaloil- chitozaną.....	99
3.2.3. Chitozano- <i>C</i> (6)-TMPEG kopolimerų sintezė, naudojant dodecilsulfato- chitozano kompleksą	103
3.3. Chitozano katijonizavimas.....	104
3.3.1. Chitozano katijonizavimas EPTMAC.....	104
3.3.2. CDK esančio chitozano katijonizavimas	110
3.3.3. Chitozano- <i>N</i> -MPEG kopolimerų sintezė ir jų katijonizavimas	114
3.3.4. Katijonizuoto chitozano darinių dalinė destrukcija	116
3.4. Di- ir trikarboksirūgštimis modifikuoto chitozano nanodalelės	122
IŠVADOS	133
LITERATŪRA	135
PUBLIKUOTŲ DARBŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS.....	152

SANTRUMPOS

AL	– azidavimo laipsnis
AR	– adipo rūgštis
ATRP	– atomo pernašos radikalinė polimerizacija
CHA	– azidintas chlorhidras
Chz	– chitozanas
CPAD	– (4-cianpentano rūgšties)-4-ditiobenzenkarboksilatas
CR	– citrinų rūgštis
CuAAC	– vario(I) katalizuojama Huisgen 1,3-dipolinė azidų-alkinų ciklizacijos reakcija
CDK	– chitozano/dodecilsulfato kompleksas
CHPTMAC	– 3-chloro-2-hidroksipropiltrimetilamonio chloridas
DL	– deacetilavimo laipsnis
DMA	– <i>N,N</i> -dimetilacetamidas
DMF	– <i>N,N</i> -dimetilformamidas
DMSO	– dimetilsulfoksidas
DNR	– deoksiribonukleorūgštis
EDC	– <i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilkarbodiimido hidrochloridas
EPTMAC	– <i>N</i> -2,3-epoksipropil- <i>N,N,N</i> -trimetilamonio chloridas
Et ₃ N	– trietilaminas
HA	– hialurono rūgštis
HDC	– Huisgen dipolinė ciklizacijos reakcija
ISA	– imidazol –1– sulfonilazido hidrochloridas
KL	– katjonizavimo laipsnis
KK	– katjoninis krakmolas
KKT	– tinklinis katjoninis krakmolas
MeOH	– metanolis
MPEG	– metoksipolietilenglikolis (polietilenglikolio monometileteris)
MSC	– molekulių sietų chromatografija
MWCO	– molekulinės masės riba
NaTPF	– natrio tripolifosfatas

ND	– nanodalelė
NHS	– <i>N</i> -hidroksisulfosukcinimidas
NMA	– <i>N</i> -metilolakrilamidas
<i>N</i> -KChz	– <i>N</i> -[(2-hidroksi-3-trimetilamonio)propil] chitozano chloridas
<i>O</i> -KChz	– <i>O</i> -[(2-hidroksi-3-trimetilamonio)propil] chitozano chloridas
P	– puazas
PAN	– poliakrilnitrilas
PEG	– polietilenglikolis
PEK	– polielektrolitinis kompleksas
PL	– pakeitimo laipsnis
PLC	– poli(ε-kaprolaktonas)
PMDETA	– <i>N,N,N',N',N</i> -pentametildietilentriaminas
<i>i</i> -PrOH	– 2-propanolis
Py	– piridinas
RAFT	– grįžtamoji jungimosi-fragmentacijos grandinės perdavos polimerizacija
RNR	– ribonukleorūgštis
SPAAC	– įtempio paremta azidų-alkinų [3+2] ciklizacijos reakcija
THF	– tetrahidrofuranas
TBTA	– tris(triazolil)benzilaminas
TFA	– trifluormetansulfonilazidas
TRIS	– trishidroksimetilamino-metanas
TMPEG	– metoksipolietilenglikolis, prijungtas prie chitozano per tarpinę triazolilgrandį
VR	– vyno rūgštis

ĮVADAS

Pastaruoju metu ir toliau daug dėmesio skiriama gamtinių polimerų panaudojimui naujose technologijose. Dėl savo išskirtinių savybių – bioskalumo, biosuderinamumo, netoksiškumo, o taip pat dėl savaime atsinaujinančių šaltinių – gamtiniai polisacharidai (celiuliozė, krakmolas, chitozanas) yra plačiai naudojami kaip žaliava maisto, techninių produktų ir chemijos pramonei. Ateityje gamtinių polimerų kaip atsinaujinančios žaliavos svarba chemijos pramonei tik didės – jų modifikavimo produktai ar per eilę stadijų iš jų gauti polimerai turės didelę dalimi pakeisti sintetinius polimerus, gaunamus iš antrinių naftos produktų.

Vienas iš svarbesnių gamtinės kilmės polimerų yra chitozanas – linijinės struktūros katijoninis polisacharidas, gaunamas deacetilinus chitiną. Chitozanas pasižymi unikaliomis fizikinėmis, cheminėmis, adsorbcinėmis ir biologinėmis savybėmis: antimikrobiniu aktyvumu, netoksiškumu, bioskalumu ir biosuderinamumu. Jis plačiai naudojamas įvairiose mokslo šakose, o taip pat biotechnologijoje, farmacijoje, vandenvalyje, kosmetikoje, žemės ūkyje, maisto ir tekstilės pramonėje. Platesnį chitozano panaudojimą apsunkina mažas jo tirpumas neutralioje ir šarminėje vandeninėje terpėje bei daugelyje pagrindinių organinių tirpiklių.

Daug dėmesio skiriama įvairiems chitozano modifikavimo būdams, kuriais galima pakeisti chitozano tirpumą, o taip pat jam suteikti naujų vertingų savybių. Papildomas chitozano katijonizavimas, prijungiant ketvirtines amonio grupes, atliekamas, vykdant vieną iš daugelio chitozano reakcijų su mažamolekuliais junginiais. Sudėtingiau gauti skiepytuosius chitozano kopolimerus, prijungiant kito tipo grandžių (dažniausiai sintetinių) šonines grandines, pvz., polietilenglikolio (PEG). Chitozano-PEG skiepytieji kopolimerai, priklausomai nuo sintezės būdo ir sudėties, yra tirpūs vandenyje arba sudaro gelius, pasižymi paviršiniu aktyvumu, flokuliacinėmis savybėmis, kompaktizuoja DNR ir t.t., todėl laikomi vienais iš perspektyvių biosuderinamų medžiagų.

Darbo aktualumas

Didžioji dalis dabartinių polimerų yra sintetiniai. Jie žymiai prasčiau bioskalūs ir biosuderinami nei gamtiniai polimerai, pvz., celiuliozė, krakmolos, chitinas, chitozanas ar jų dariniai. Yra sričių, kuriose gamtinės kilmės polimerai ypač pageidaujami: tai medicina, farmacija, kosmetika, biotechnologija. Daug chitozano gaminių naudojami ten, kur reikalingas biosuderinamumas, pvz., vaistų pernašai.

Tarp chitozano darinių ypatingą vietą užima chitozano – polietilenglikolio kopolimerai ir konjugatai, kurie, kaip ir baltymų-PEG dariniai, jau seniai naudojami medicinoje ir biotechnologijoje. Deja, akivaizdžiai gero metodo chitozano-PEG darinių sintezei nėra, nes kopolimerų gryninimas nuo nesureagavusio MPEG yra sudėtingas. Siekiant sumažinti nesureagavusių pradinių medžiagų ir šalutinių produktų kiekį, kaip alternatyva chitozano-MPEG kopolimerų sintezei redukcinio alkilavimo ar karbodiimidiniu metodais galėtų būti panaudota „klik“ chemijos reakcija. Informacijos apie chitozano PEG'inimą „klik“ chemijos būdu nėra.

Katijonizavimas – vienas iš būdų chitozano tirpumui pagerinti, kartu pakeičiant kai kurias jo savybes. Iš katijonizuoto chitozano sudarytos nanodalelės gali būti plačiai taikomos farmacijoje ir medicinoje (vaistų, baltymų, genų pernašai). Katijonizuoto chitozano nanopluoštai pasižymi geromis antibakterinėmis savybėmis ir gali būti naudojami kaip žaizdų tvarstomoji medžiaga, medicininiai protezai, apsauginiuose drabužiuose, o taip pat antibakteriniams filtrams gaminti. Plačiai tyrinėtas papildomas chitozano katijonizavimas per jo amino grupes; duomenų apie chitozano katijonizavimą per hidroksigrupes ar chitozano–PEG kopolimerų katijonizavimą beveik nėra.

Darbo tikslas

Susintetinti vandenyje tirpius norimos struktūros bei skirtingo pakeitimo laipsnio skiepytuosius chitozano-MPEG kopolimerus bei katijonizuotus chitozano darinius ir ištirti jų savybes.

Šiam tikslui pasiekti buvo iškelti tokie *uždaviniai*:

- „klik“ chemijos būdu susintetinti skiepytuosius chitozano-MPEG darinius;
- ištirti skiepytuosius chitozano-MPEG kopolimerus, nustatyti sąryšį tarp sintezės būdo, chitozano darinių struktūros ir kopolimerų savybių;
- papildomai katijonizuoti chitozaną ir chitozano-*N*-MPEG kopolimerus, katijonizuotą chitozaną panaudoti katijoninių nanopluoštų gamybai;
- pagaminti chitozano nanodaleles ir jų paviršių modifikuoti RAFT grandinės perdavos agentu.

Mokslinis naujumas ir praktinė svarba

Pirmą kartą chitozano-metoksipolietilenglikolio skiepytieji kopolimerai susintetinti „klik“ chemijos reakcijų pagalba. Pasiūlyti nauji chitozano-*C(6)*-MPEG bei *C(6)*-katijonizuoto chitozano sintezės būdai, chitozano aminogrupėms apsaugoti naudojant chitozano kompleksus su dodecilsulfatu. Pirmą kartą susintetinti *N*-ftaloilchitozano dariniai, gliukozamino grandžių *C(6)* padėtyje turintys azido- arba propargil- liekanas, tinkami modifikuoti „klik“ chemijos būdais. Dalinai *N*-katijonizuoto chitozano darinius papildomai katijonizuojant šarminėje terpėje, gauti *N,O*-katijonizuoti chitozano dariniai, turintys labai didelį katijonizavimo laipsnį. Pasiūlytas katijonizuoto chitozano fermentinės hidrolizės metodas, kurį naudojant chitozano darinio molekulinę masę lengvai galima sumažinti dešimtimis kartų.

Ginamieji teiginiai

- Sintetinant chitozano-MPEG kopolimerus „klik“ chemijos būdu, pasiekiamas toks chitozano pakeitimo laipsnis, kokį turi azidinti chitozano dariniai, tačiau šios reakcijos metu vyksta chitozano pagrindinės grandinės destrukcija.
- Didelis chitozano katijonizavimo laipsnis gali būti pasiektas, katijonizavimą vykdant dviem pakopomis: iš pradžių chitozaną katijonizuojant rūgštinėje, o po to šarminėje terpėje.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. „Klik“ chemija

1.1.1. „Klik“ chemijos esmė, pagrindinės reakcijos ir pritaikymas

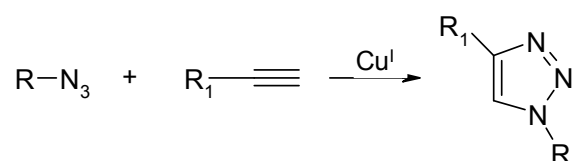
„Klik“ chemija neseniai apibrėžta kaip efektyvių ir selektyvių reakcijų, dėl kurių susidaro ryšiai tarp heteroatomų, sritis [1]. Pagrindinis „klik“ chemijos pradininkų tikslas buvo sukurti plačią eilę „molekulinių bloku“ su tokiomis funkcinėmis grupėmis, kurios tarpusavyje būtų sujungiamos anglies–heteroatomo–anglies ryšiu [2]. „Klik“ chemija apima ne tik atrankių ir efektyvių cheminių reakcijų klasę, bet ir naują požiūrį į cheminę sintezę. Pagrindinė šio požiūrio idėja – dvi molekulės, kuriose yra aktyvių funkcinė grupių, sujungti taip lengvai, kaip „susegant sagtį“, tokiu būdu susintetinant pageidaujamos savybėmis pasižyminčias medžiagas ir išvengiant šalutinių produktų. Pirmą kartą „klik“ chemijos terminą 1999 m. kasmetiniame Amerikos chemikų draugijos suvažiavime panaudojo Nobelio premijos laureatas K.B. Sharpless [3]. Ši reakcijų klasė labai išpopuliarėjo, o publikacijų, susijusių su „klik“ chemija, skaičius per pastaruosius 5 metus augo eksponentiškai [3]. Nors iš pradžių „klik“ chemija buvo daugiau skirta vaistų kūrėjams, gana greitai paaiškėjo, kad tiek požiūris, tiek pačios reakcijos gali būti plačiai pritaikomos organinėje [4] bei polimerų chemijoje [5].

K.B. Sharpless 2001 metais savo apžvalginiame straipsnyje pateikė eilę kriterijų, kuriuos turi atitikti „klik“ reakcijai priskiriama reakcija [2]. Tokia reakcija turi būti modulinė, universali, plačiai pritaikoma, greitai atliekama, stereospecifinė, produktai turi būti stabilūs ir didelės išeigos. Be to, „klik“ reakcijų metu turi susidaryti tik nekenksmingi šalutiniai produktai, kuriuos būtų galima pašalinti išvengiant chromatografinių metodų. Jei būtina gryninti, siektina, kad vietoje chromatografinių metodų būtų galima naudoti tokius paprastus metodus kaip kristalizacija arba distiliacija. Pagrindinis reikalavimas „klik“ reakcijai – ji turi būti paprasta: lengvai prieinamos pradinės medžiagos ir reagentai; sintetinama be tirpiklio arba naudojant neagresyvius (pvz., vanduo) ar lengvai pašalinamus tirpiklius; paprastas reakcijos produktų

išskyrimas bei didelis jų stabilumas fiziologinėse terpėse, pageidautina, kad jie būtų inertiški deguoniui ir vandeniui. Dar viena pageidautina savybė – didelė termodinaminė reakcijos varos jėga, dažniausiai didesnė nei 80 kJ/mol [2,3,6]. Greitos, patikimos ir efektyvios „klik“ chemijos reakcijos gali pagreitinti naujų medžiagų su norimomis savybėmis paieškos, atradimo ar jų optimizavimo procesą [1].

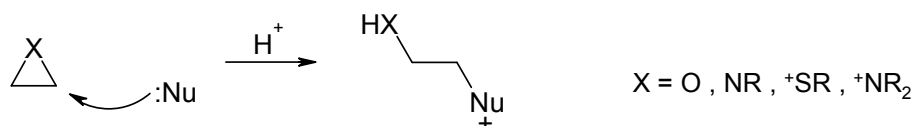
Yra keturios pagrindinės „klik“ *chemijos reakcijų grupės* [2,3,6]:

1. Nesočių junginių ciklizacija – Huisgen dipolinio ciklinio jungimosi (HDC) bei hetero-Diels-Alder ciklinio jungimosi reakcijos:



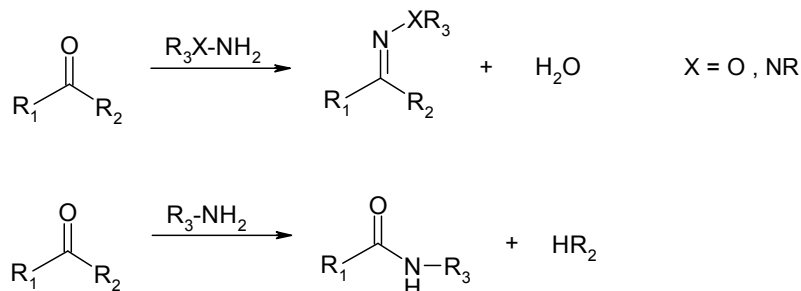
1.1 schema. Huisgen dipolinė azidų-alkinų ciklizacija

2. Nukleofilinė deciklizacija – ypač stiprių heterociklinių elektrofilų: epoksidų, aziridinų, aziridinų ir episulfonio jonų, ciklinių sulfatų ir sulfamidatų, deciklizacijos reakcijos:



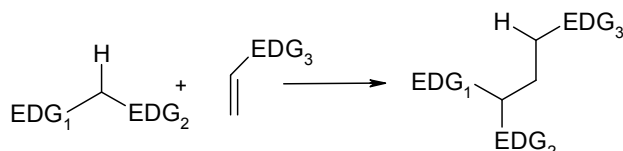
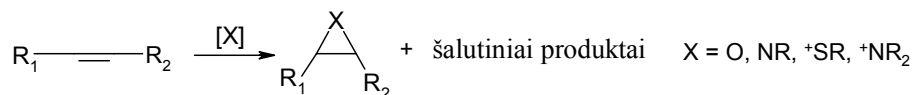
1.2 schema. Nukleofilinė deciklizacija (Nu – nukleofilas)

3. Nealdolinio tipo junginių karbonilų chemija – karbamidų, tiokarbamidų, aromatinių heterociklų, oksimų eterių, hidrazinų, amidų sintezės reakcijos:



1.3 schema. Hidrazonų/oksimų eterių (viršuje) ir amidų/izokarbamidų (apačioje) susidarymas

4. Prisijungimo prie nesočiųjų anglies-anglies ryšių, ypač oksidacijos reakcijos: epoksidinimas, dihidroksilinimas, aziridinimas, sulfenil-, nitrozilhalogenidų prisijungimas, Michaelio prisijungimo reakcijos:



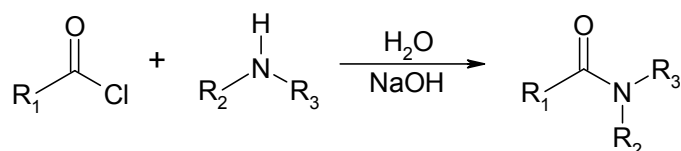
- 1.4 schema. Įvairių trinarių žiedų susidarymas (viršuje) ir Michaelio prisijungimo reakcija (apačioje). (EDG – elektronų donorinė grupė)

„Klik“ chemijai keliamus reikalavimus geriausiai atitinka 1,3-dipolinės ciklizacijos ir hetero-Diels-Alder reakcijos. Naudojant modulines greitas reakcijas, sujungiančias du nesočiuosius junginius, galima gauti didelę įdomių penkianarių ir šešianarių heterociklinių junginių įvairovę. Iš šių pagrindinių „klik“ chemijos grupių plačiausiai naudojamos ciklizacijos reakcijos, ypač vario(I) katalizuojama Huisgen 1,3-dipolinė azidų-alkinų ciklizacijos (CuAAC) reakcija, kurios metu susidaro 1,2,3-triazolai. Didžioji dalis „klik“ chemijai skirtų publikacijų ir aprašo minėtą reakciją, kuri plačiai pritaikyta daugeliui junginių gauti [3,4].

K.B. Sharpless ir kt. [2] pastebėjo, kad daugelis reakcijų, atitinkančių aukščiau išvardintus kriterijus, dažniausiai geriau vyksta vandenyje nei organiniuose tirpikliuose. Tam įtakos gali turėti kelios priežastys:

1. „Klik“ reakcijos karštame vandenyje dažnai vyksta greičiau ir lengviau, jų metu susidaro tik vienas produktas, nepaisant to, kad vienas ar daugiau reagentų, kaip ir pats produktas, gali būti netirpūs vandenyje. Paaiškinimas – ribotai vandenyje tirpios organinės molekulės turi žymiai didesnę laisvąją energiją ir dažnai yra reaktingesnės, ir tai kompensuoja mažą dalyvaujančių junginių koncentraciją.

2. Epoksidų ir elektrofilinių aziridinių nukleofilinė deciklizacija lengviau vyksta terpėje, kurioje gali susidaryti vandeniliniai ryšiai. Idealiai tam tinka vanduo.
3. Oksidacija elektrofiliniais reagentais ir ciklizacija yra svarbiausios alkenų ir alkinų „klik“ reakcijos. Abiem atvejais vyksta nukleofilų/elektrofilų poliarizacija, ir tam puikiai tinka vanduo.
4. Dviejų mažos koncentracijos tirpinių reakcija paprastai yra žymiai greitesnė nei mažos varomosios jėgos šalutinė reakcija tarp vieno iš tirpinių ir vandens. Geriausiai žinomas pavyzdys – Schotten-Baumann reakcija amidams iš acil- ar sulfonilhalogenidų vandenyje gauti (1.5 schema):

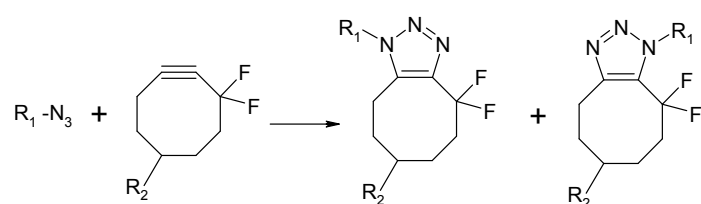


1.5 schema. Amidų sintezė iš acil- ar sulfonilhalogenidų

5. Vanduo pasižymi didele šilumine talpa ir tinkama daugeliui procesų virimo temperatūra. Be to, vanduo yra idealus tirpiklis dėl mažos kainos bei poveikio aplinkai.

Plačiausiai naudojamos „klik“ reakcijos – CuAAC – greitis ženkliai išauga naudojant atitinkamus katalizatorius, pvz., pereinamųjų metalų jonus, kurie užtikrina ir stereospecifiškumą. Tam dažniausiai naudojami azotą turinčiais ligandais stabilizuoti Cu(I) jonai. Deja, Cu(I) katalizatorių negalima naudoti gyvajame organizme, kadangi Cu^+ jonai yra toksiški, sukelia kai kurių virusų ar oligonukleotidų grandinių destrukciją. Siekiant išvengti citotoksiškumo pasižyminčio Cu, imta tyrinėti kitus pereinamuosius metalus (Ru, Ni, Pd, Pt, Fe) ir jiems tinkančius ligandus (*N,N,N',N',N'*-pentametildietilenti Aminą (PMDETA), biperidinus, terpiridinių darinius, tris[2-(dimetilamino)etil]aminą (Me_6Tren)) [7]. Per pastaruosius keletą metų išaugo susidomėjimas „klik“ reakcijomis, kurioms visai nereikalingas kompleksą sudarančio metalo katalizatorius. „Klik“ reakcijos, vykdomos be metalo kompleksų katalizatoriaus, plačiai apžvelgtos Lutz darbuose [8,9].

Azidai yra silpni 1,3-dipoliniai akceptoriai ir be katalizatoriaus su alkinais reaguoja sunkiai, todėl ieškoma įvairių būdų alkinų grupės aktyvumui padidinti. C.R. Bertozzi ir kt. [10-12] plačiai aprašė pakeistų ciklooktinių ciklizacijos reakcijas, nenaudojant katalizatoriaus (1.6 schema). Šios azidų-alkinų [3+2] ciklizacijos reakcijos (SPAAC), vykstančios dėl įtampos, pasižymėjo selektyvumu biomolekulėms, nebuvo toksiškos, jas buvo galima atlikti mėgintuvėlyje bei gyvuose organizmuose [7].



1.6 schema. SPAAC „klik“ reakcija

Cu nekatalizuojamas [3+2] ciklizacijos su azidais reakcijas galima vykdyti naudojant volframu aktyvuotus, mažiausiai vieną elektronų donorinę grupę turinčius alkinus [7].

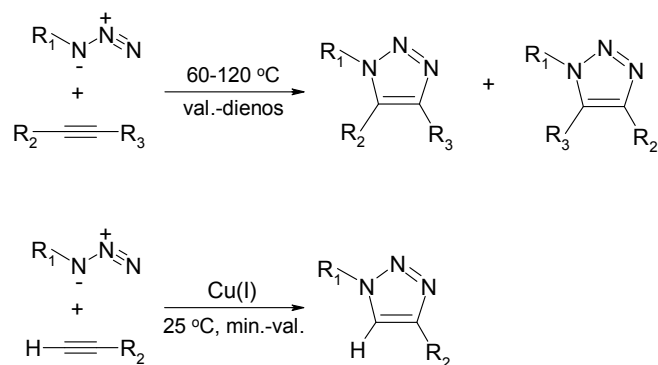
Nemažai dėmesio susilaukė tiolių „klik“ reakcijos. Tiolių radikalinis prisijungimas prie dvigubą ryšio plačiai naudojamas polimerizacijos ir polimerų modifikavimo reakcijose [7]. Kombinuojant grįžtamąją jungimosi-fragmentacijos grandinės perdavos polimerizaciją (RAFT) su tiolių „klik“ reakcija, buvo susintetinti dendrimerai [7,13].

„Klik“ reakcijos dažnai derinamos su kitomis polimerų sintezės reakcijomis: polikondensacija, katijonine ar anijonine deciklizacijos polimerizacija, RAFT, ATRP polimerizacija [14]. Panaudojant „klik“ reakcijas, galima susintetinti skiepytuosius kopolimerus (pvz., skiepytuosius poliesterius [15]), linijinius diblokinius, triblokinius [16] ir tetrakisblokinius kopolimerus, makrociklus, paprastos ir žvaigždinės struktūros terpolimerus [17], tinklinės, dendrimerinės struktūros darinius [3,5,13,14,18], hidrogelius [19]. Be to, šiuo metu „klik“ chemija naudojama *in situ* biomolekulinių aktyvių centrų, biokonjugatų sintezei [14,20], biomolekulėms (DNR, baltymams, polisacharidams) modifikuoti.

Cu(I)-katalizuojamų cikloadicijos reakcijų tarp azidų ir grandinės gale esančių alkinų vystymas leido pritaikyti „klik“ reakcijas daugelyje įdomių sričių, taip pat ir gamtinių junginių darinių sintezei. Nors azidai ir alkinai linke reaguoti tarpusavyje, pavieniui šios funkcinės grupės yra nepakankamai aktyvios. Jos yra stabilios ir nereaguoja su tipinėmis biologinių molekulių funkcinėmis grupėmis [6], todėl azidų-alkinų [3+2] cikloadicija gali būti naudojama įvairiose biologinėse sistemose [21,22].

1.1.2. Cu(I) katalizuojama Huisgen 1,3-dipolinė azido-alkino ciklizacijos „klik“ reakcija

Kaip jau minėta, viena iš efektyviausių ir plačiausiai naudojamų reakcijų, geriausiai atitinkančių „klik“ chemijos kriterijus, yra Cu(I) katalizuojama Huisgen dipolinė azido-alkino grupių ciklizacija (CuAAC), susidarant 1,2,3-triazolams [1,3,4] (1.7 schema). Huisgen 1,3-dipolinės ciklizacijos būdu iš dviejų reagentų greitai gaunami įvairius pakaitus turintys penkianariai heterociklai [20,23]:



1.7 schema. Terminė (viršuje) ir Cu(I) katalizuojama (apačioje) azidų-alkinų ciklizacijos reakcija

Pirmą kartą 1,2,3-triazolą iš fenilazido ir dietilacetilendikarboksilato dar 1893 m. susintetino A. Michaelis [20]. Taigi, terminės ciklizacijos reakcijos, kuriose dalyvavo trigubuosius ryšius grandinės gale ar viduryje turinčios molekulės, buvo žinomos daugiau nei prieš šimtą metų, o nuodugnai iširtos R. Huisgen ir bendradarbių 1950-1970 m. [20]. Nustatyta, kad procesas

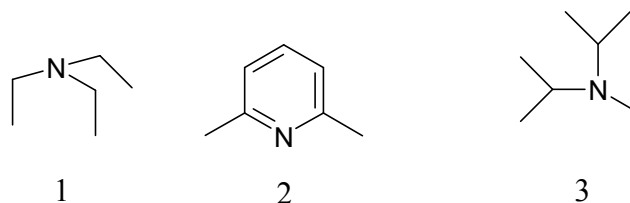
termodinamiškai labai palankus, turintis didelį potencinės energijos kiekį, tačiau kartu ir santykinai didelį kinetinės energijos barjerą, dėl kurio reakcija kambario temperatūroje vyksta labai lėtai.

CuAAC reakciją vienu metu viešai pasiūlė Sharpless ir Meldal [2,5,24]. Ši reakcija susilaukė didžiulio susidomėjimo ir, praėjus keleriems metams po jos atradimo, CuAAC jau buvo plačiai naudojama organinėje sintezėje, medicininėje chemijoje, molekulinėje biologijoje ir medžiagotyroje. CuAAC puikiai vyksta daugelyje tirpiklių, jos dažniausiai nestabdo nei deguonis, nei vanduo. Priešingai, reakcija dažniausia ir vykdoma vandenyje. Reakcijos metu nesusidaro šalutinių medžiagų, gaunamos didelės produktų išeigos, jų dažnai nereikia gryninti. Gryninant produktus paprastai užtenka juos tik nufiltruoti [3]. Jei būtina, Cu pėdsakai ir šalutiniai produktai gali būti pašalinti naudojant kietafazę ekstrakciją arba mėginius praleidžiant pro silikagelio kolonėlę [20].

Azidai ir alkinai paprastai yra inertiški daugumai organinių ir biologinių terpių, taip pat didelio funkcionalumo biologinėms molekulėms, molekuliniam deguoniui ir vandeniui. Tiek azido grupė, tiek trigubasis ryšys gali būti įterpiami į molekulę iš anksto ir išlikti nepakitę per eilę vėliau vykstančių virsmų. Dėl kinetinio alkinų ir azidų stabilumo jų ciklizacija vyksta lėtai, jai reikalinga gana aukšta temperatūra bei ilga reakcijos trukmė. Vykdamas nekatalizuojamą Huisgen ciklizaciją, geras regioselektyvumas pasiekiamas tik tada, kai naudojamas elektronoakceptorinis alkinas su trigubuoju ryšiu molekulės gale. Reakcijų su kitais alkinais metu dažnai susidaro 1,4- ir 1,5-regioizomerų mišinys [1] (1.7 schema). Cu(I) katalizė akivaizdžiai padidina reakcijos regioselektyvumą, todėl gaunamas tik 1,4-regioizomeras, be to, reakcijos trukmė gali sutrumpėti iki 10^7 kartų. Naudojant Cu katalizatorių, reakcija gali vykti gana plačiame temperatūros intervale (0-160 °C) ir esant įvairioms pH vertėms (pH \approx 5-12). Būtina paminėti, kad atrankiai su alkinais reaguoja ne tik alifatiniai, bet ir įvairiai pakeisti pirminiai, antriniai, tretiniai bei aromatiniai azidai [3]. Apibendrinant galima išskirti keletą Cu(I) katalizuojamai reakcijai būdingų išskirtinių savybių [20]:

1. Reakcija mažai priklauso nuo prie azido ir alkino aktyviųjų centrų esančių grupių erdvinių ir elektroninių savybių. Pvz., azidai, turintys elektronų akceptorinių, elektronų donorinių, alifatinių, aromatinių ar heteroaromatinių pakaitų, dažniausiai gerai reaguoja su įvairiai pakeistais alkinais.
2. Reakcijai netrukdo nei vanduo, nei dauguma organinių ir neorganinių funkcines grupes turinčių junginių, todėl nereikia apsaugoti funkcinių grupių. Reakcija yra pakankamai greita jau 0-25 °C temperatūroje, o jei papildomai naudojami ir ligandai, reakcijos trukmė dar labiau sutrumpėja.
3. Reakcijos metu susidarę 1,2,3-triazolai pasižymi keliomis naudingomis savybėmis: yra chemiškai stabilūs (inertiški hidrolizinei, oksidacinei ir redukcinei aplinkai aukštos temperatūrose), turi didelį dipolinį momentą (5,2-5,6 D), lengvai sudaro vandenilinius ryšius.

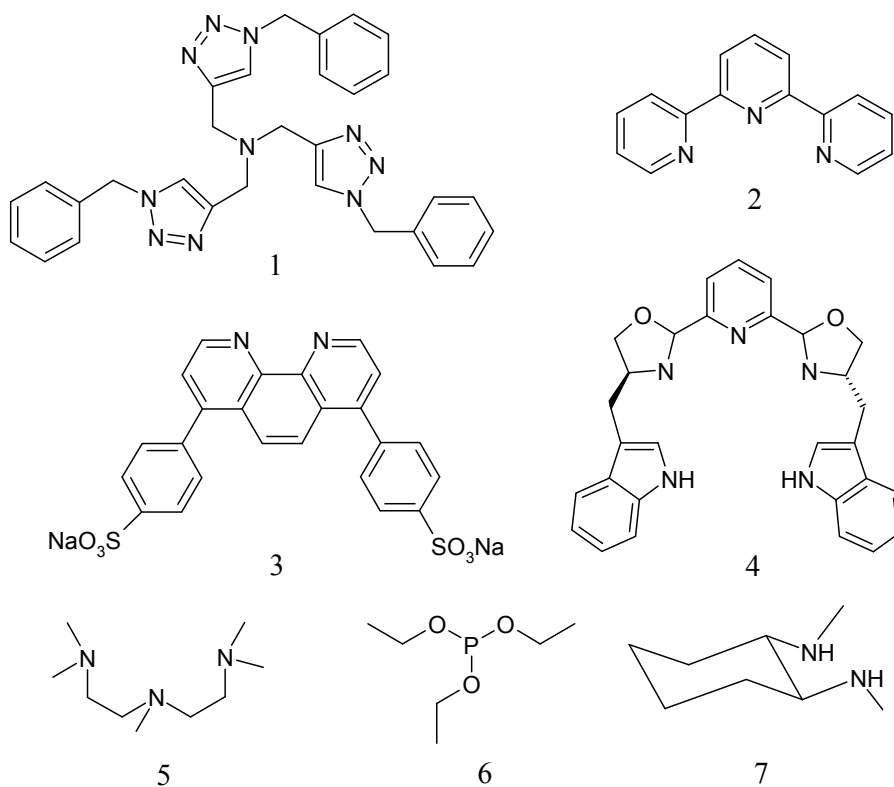
Cu(I) *katalizatoriui* paruošti naudojami keli metodai. Dažniausiai reikiamas Cu(I) kiekis gaunamas redukuojant Cu(II) druskas, pvz. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, kurios yra pigesnės ir dažnai grynesnės negu Cu(I) druskos [3,23]. Redukuojančiu agentu dažniausiai naudojamas natrio askorbatas (3-10-kartinis perteklius), tačiau pakankamai sėkmingai gali būti naudojami ir kiti reduktoriai, pvz., hidrazinas arba tris(2-karboksietil)fosfinas (TCEP). Šio metodo trūkumas yra tas, kad reduktorius Cu(I) gali redukuoti iki Cu(0). To galima išvengti, naudojant reikiamą reduktoriaus kiekį ir/arba pridėdant stabilizuojančio junginio, pvz. tris-(hidroksipropiltriazolilmetil)amino (THPTA). Kitas metodas katalizatoriui gauti – metalinio Cu oksidacija aminių druskomis iki Cu(I). Deja, naudojant šį metodą, reakcijos trukmė ilgesnė, reikalingas didesnis vario kiekis, todėl sintezė tampa brangesne. Katalizatoriais gali būti naudojamos ir Cu(I) druskos, pvz. CuBr, CuI, $\text{CuOTf} \cdot \text{C}_6\text{H}_6$ (OTf = trifluormetansulfonatas), $[\text{Cu}(\text{NCCH}_3)_4][\text{PF}_6]$ [25] ir kt. Šiuo atveju reduktoriaus nereikia, tačiau reikalinga bedeguonė aplinka, organinis tirpiklis ar tirpiklių mišinys ir organinės bazės, kurios žymiai pagreitina reakciją [1,4]. Dažniausiai naudojamos bazės yra trietilaminas, 2,6-lutidinas ir *N,N*-diizopropiletilaminas (DIPEA) (1.1 pav.).



1.1 pav. CuAAC reakcijoms pagreitinti naudojamos bazės: trietilaminas (1), 2,6-lutidinas (2), *N,N*-diizopropiletilaminas (DIPEA) (3)

S. Chassaing ir kt. [26] HDC reakciją pasiūlė katalizuoti su Cu(I) modifikuotais ceolitais. Tiek gamtiniai, tiek sintetiniai ceolitai yra porėti, turintys didelį paviršiaus plotą aliumosilikatai. Dėl didelio terminio/hidroterminio stabilumo bei valdomo porų dydžio jie yra geri katalizatoriai daugeliui reakcijų. Buvo nustatyta, kad HDC reakcijai naudojant Cu(I) modifikuotą ceolitą, gaunami geresni rezultatai nei naudojant CuCl.

Kai kuriais azidų-alkinų ciklizacijos atvejais, ypač sintetinant biojunginius, mažos Cu(I) katalizatoriaus bei reduktoriaus koncentracijos neužtikrina pakankamo reakcijos greičio, bet vis tiek ardo biologines struktūras. Tokiu atveju papildomai naudojami azoto turintys *ligandai* (1.2 pav.), kurie stabilizuoja Cu(I) joną aerobinėje ir vandeninėje terpėse, katalizuoja ciklizacijos reakciją, lėtina Cu(I) disproporcionavimą bei stabdo pavojingų oksidalelių susidarymą [1,5]. CuAAC reakcijoje panaudojus simetrinį (triazolil)benzilaminą (TBTA) [27], pasiekta gerų rezultatų. Buvo nustatyta, kad šį ligandą naudojant organinėje terpėje nebereikia bazinio priedo, nes tretinis azotas veikia ir kaip donoras Cu(I) jonams, ir kaip protonų akceptorius. Deja, TBTA netirpus vandenyje. Vėliau buvo atrastas kitas stabilizuojantis ligandas – batofenantrolindisulfonrūgštis, kuri gerai tirpo vandenyje ir savo stabilizuojančiu bei katalizuojančiu poveikiu prilygo TBTA. Deja, buvo pastebėta [2], kad vario batofenantrolindisulfonrūgšties kompleksai greitai reaguoja su deguonimi, susidarant oksidalelėms. Cu(I) galima kompleksuoti ir su bis(oksazolinil)piridinų (*piboks*) šeimos chiraliniais ligandais [28], kurie pasižymi katalizuojančiu poveikiu bei sukuria sąlygas enantioselektyvumui.

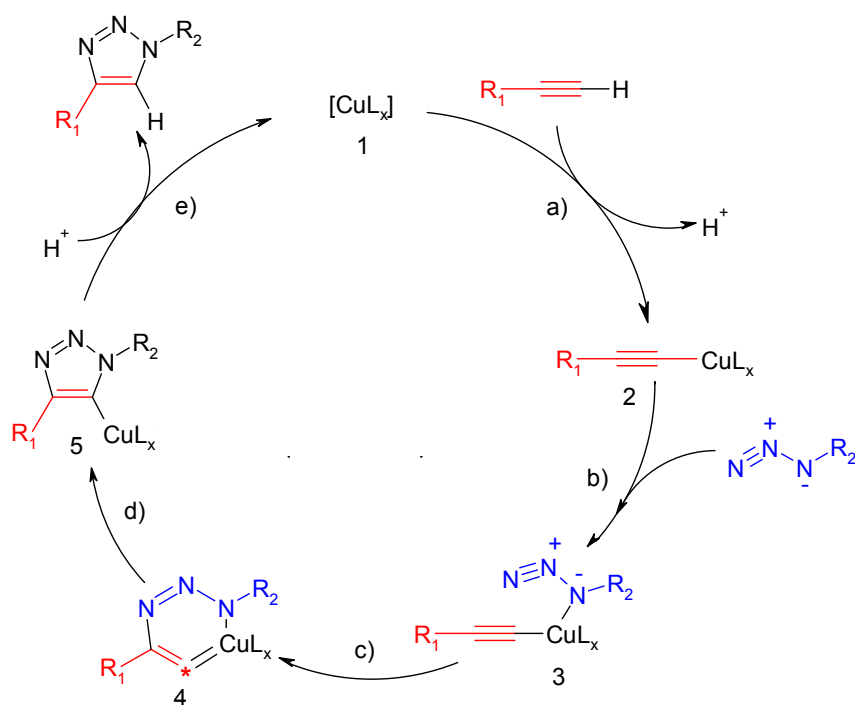


1.2 pav. CuAAC reakcijose dažniausiai naudojami ligandai: TBTA (1), 2,2':6'2''-terpiridinas (2), betofenantrolindisulfonato (3), piboks (4) ligandai, PMDETA (5), trietoksifosfinas (6), *N,N'*-dimetilcikloheksano-1,2-diaminas (7)

Ligandų naudojimas teigiamai veikia ciklizaciją, ypač atliekant reakciją gyvajame organizme, kur kitų bazių panaudojimas ribotas. Nors ligandų naudojimas gali pagerinti kai kuriuos ciklizacijos rodiklius, dažnai geriau taikyti kitus metodus, pvz., naudoti bazes, gaunant panašius rezultatus bei išvengiant papildomo produktų valymo nuo ligandų likučių.

Cu(I) katalizuojamai Huisgen 1,3-dipolinės azido-alkino ciklizacijos sąveikai įvertinti bei kinetikai tirti buvo pasiūlytas pakopinis (*stepwise*) **mechanizmas** (1.8 schema) [1,20].

Ciklas prasideda susidarant Cu(I) acetilidui **2** (kaip ir tikėtasi, reakcija su alkinais, esančiais grandinės viduje, nevyksta). Kadangi susidaro tarpiniai Cu(I) dimero – alkino π -kompleksai, ši stadija vyksta lengvai, išsiskiriant 49 kJ/mol šilumos.



1.8 schema. Katalitinis CuAAC ciklas. L – ligandas

Susidarius Cu(I)-alkino π -kompleksams, galinių alkino protonų pKa vertės sumažėja net per 10 vienetų, todėl palengvėja deprotonacija vandeninėje terpėje, o taip pat nebereikia bazinių priedų. Apskaičiuota, kad azido – vario acetilido 1,3-dipolinė cikloadicija turi didelį energijos barjerą (apie 99 kJ/mol). Sekančioje pakopoje (b) azidas pakeičia vieną iš ligandų, esančių vario acetilide (2), ir susidaro tarpinis junginys **3**. Tai aktyvuoja azidą nukleofilinei anglies atomo atakai, ir azido azoto atomas gali lengvai prisijungti prie alkino anglies atomo. Trečiojoje pakopoje (c) tarpinis junginys **3** pavirsta šešianariu metalociklu **4**. Ši stadija yra endoterminė (53 kJ/mol), turinti 78 kJ/mol energetinį barjerą, kuris yra žymiai mažesnis už nekatalizuojamos reakcijos energetinį barjerą (apytiksliai 109 kJ/mol). CuAAC regiospecifiškumas aiškinamas azido bei alkino prisijungimu prie Cu anksčiau nei susidarant C-C ryšiui. Šešianario ciklo **4** persitvarkymo į penkianarį energijos barjeras yra pakankamai mažas (13 kJ/mol), todėl sekančioje pakopoje (d) susidaro triazolo-vario darinys **5**. Vykstant junginio **5** protonizacijai, susidaro triazolas, ir katalitinis ciklas užbaigiamas. Nuo triazolo

žiedo atsiskyres Cu(I) katalizatorius vėl gali pradėti naują katalitinį ciklą, dalyvaujant kitai alkinio ir azido molekulei.

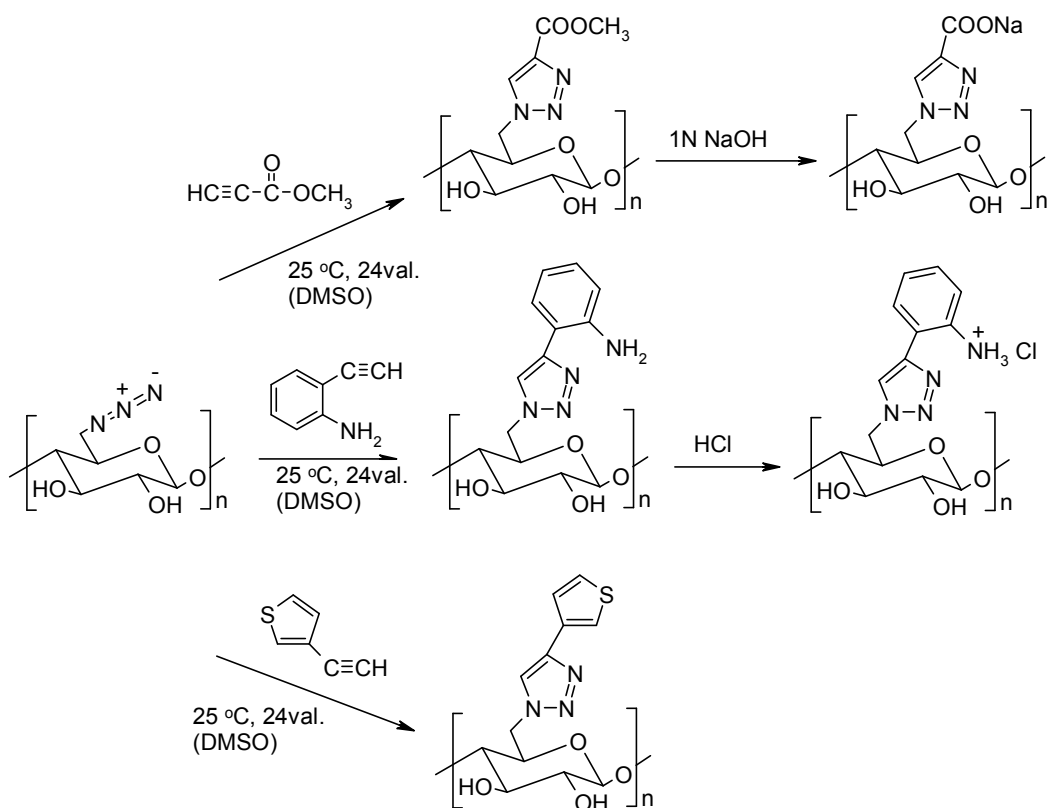
Azidų-alkinų ciklizacija inertiška didelei grupei junginių: alkoholiams, karboksirūgštims, aminams ir kt. Dažniausiai ciklizacijos reakcija vykdoma vandens/alkoholio (paprastai *tert*-butanolio) mišinyje, kuris pagerina lipofilinių reagentų tirpumą, pagreitina reakciją, be to, nebereikia dėti bazinių priedų [1]. Geri rezultatai taip pat gaunami naudojant vandens ir kitų organinių tirpiklių, pvz., DMSO [29], tetrahidrofurano (THF), acetonitrilo mišinius [30]. B. Y. Lee ir kt. [31] nustatė, kad, vykdant CuAAC reakciją vandens/metilenchlorido mišinyje, reakcijos trukmė, lyginant su kitomis ko-tirpiklių sistemomis, žymiai sutrumpėja, gaunamos geros produktų išeigos, nereikia naudoti bazinių priedų. Vandens/metileno chlorido mišinys tinka įvairiems azidams ir alkinams.

Nepaisant kelių trūkumų ir riboto panaudojimo gyvuose organizmuose, Cu(I) katalizuojamos azido-alkino ciklizacijos reakcijos paplito ne tik kaip patrauklus sintezės kelias, bet ir išpopuliarino pačią „klik“ chemijos idėją [3,5].

1.1.3. „Klik“ chemija polisacharidų modifikavimo reakcijose

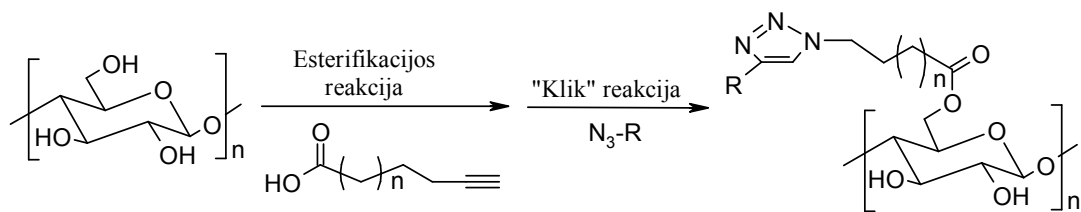
„Klik“ chemijos reakcijos gana plačiai taikomos ir polisacharidams modifikuoti. T. Liebert ir bendradarbiai [32] celiuliozei modifikuoti panaudojo Cu(I) katalizuojamą Huisgen reakciją ir, atskleisdami bendrus bruožus, atrankumą ir naudingumą, parodė, kad „klik“ chemija yra daug žadantis būdas polisacharidams modifikuoti.

Azido funkcinė grupė prie celiuliozės prijungiama per tarpinius tozildarinius. Vykdam 6-azido-6-deoksiceliuliozės ir metilpropiolato, 2-etinil-anilino arba 3-etiniltiofeno CuAAC reakciją, gaunami didelio pakeitimo laipsnio (80-93 %) organiniuose tirpikliuose (DMSO, DMF) tirpūs celiuliozės dariniai, pasiekiant 81-98 % išeigas (1.9 schema). Skirtingai nuo įprasto polisacharidų esterinimo, šios reakcijos metu tarp polimero pagrindinės grandinės ir funkcinės grupės (alkino) sudaromas hidrolizei atsparus ryšys. Gautus junginius veikiant rūgštimi ar šarmu, gaunami vandenyje tirpūs polielektrolitai.



1.9 schema. 6-azido-6-deoksceliuliozės modifikavimas alkinais [32]

Žinoma ir daugiau 6-azido-6-deoksceliuliozės, tirpios poliniuose aprotoniniuose tirpikliuose, tokiuose kaip DMF, DMA, DMSO, panaudojimo „klik“ reakcijose atvejų. Karboksimetilinant 6-azido-6-deoksceliuliozę, gaunami vandenyje tirpūs dariniai, kurie naudojami atrankiai pakopinei celiuliozės dendronizacijai [33]. Cu(I) katalizuojamos Huisgen reakcijos metu gaunami skirtingo pakeitimo laipsnio karboksimetil-6-deoksi-(1-*N*-[1,2,3-triazolo]-4-poliamidoamino) celiuliozės dariniai. Kadangi Cu druskos gali ardyti dendrimerus, jų likučiui pašalinti naudojamas dietilditiokarbamato trihidratas, kuris yra puikus Cu kompleksonas. Nustatyta, kad po gryninimo produkte lieka tik 10 ppm Cu [33]. CuAAC reakcijoms naudojama ne tik azidinta celiuliozė, bet ir alkilinti jos dariniai. Buvo susintetinta 3-*O*-propargil-celiuliozė [34], kuri panaudota šakotų struktūrų sintezei. Tuo tarpu alkingrupė prie celiuliozės (popieriaus) prijungiama celiuliozę veikiant 5-heksinoine rūgštimi, naudojant katalizinį kiekį (5 mol%) vyno rūgšties [35] (1.10 schema).



1.10 schema. Celiuliozės modifikavimas, naudojant „klik“ reakciją

Kombinuojant esterinimo ir Cu(I) katalizuojamos „klik“ chemijos reakcijas, tokiu gamtai draugišku būdu heterogeninėmis sąlygomis galima modifikuoti ir kitas celiuliozines medžiagas, pvz., medvilnę ir kitus augalinius pluoštus.

Aprašytas [36] fotobaktericidinio medvilninio audinio gavimas, prie chemiškai modifikuotos celiuliozės „klik“ chemijos būdu prijungiant acetileninį porfirino darinį. Gautas polimeras panaudotas siekiant sunaikinti Gram-teigiamas ir Gram-neigiamas bakterijas, tokias kaip *E. coli* ir *S. aureus*. Celiuliozė veikiant undecinoine rūgštimi ir susidariusiam celiuliozės esterui (celiuliozės undecinoatui) toliau reaguojant su polikaprolaktono azidu (CuAAC reakcija), gautas skiepytosios celiuliozės pluoštas [37].

Aprašyta vietinė atranki ir kiekybiškai vykstanti gliukoklasterių celiuliozės pagrindu sintezė. Naudojant CuAAC reakciją [38], sintetinta per tarpines celiuliozės C(6)-hidroksigrupės brominimo-azidinimo stadijas. Vykdam „klik“ reakciją su alkino grupę turinčiu β -laktozidu, gautas vandenyje tirpus celiuliozės gliukoklasteris.

Norint pagreitinti oligosacharidų kompleksų prisijungimą prie polipeptidų, paprastai prie oligosacharidų prijungiamos azido funkcinės grupės, o prie polipeptidų – alkino funkcinės grupės turinčios šoninės atšakos [39]. Ši CuAAC paremta technologija gali būti naudojama sintetinių vakcinų sintezei.

„Klik“ reakcijos naudojamos ir polisacharidų hidrogelių sintezei. Vykdam CuAAC reakciją tarp celiuliozės azido ir alkino funkcinę grupę turinčio poli(*N*-izopropilakrilamido-*ko*-hidroksietilmetakrilato) (p(NIPAAm-*ko*-HEMA)), buvo gauti termojautrūs p(NIPAAm-*ko*-HEMA)/celiuliozės

hidrogeliai [40]. Hidrogeliai gauti ir hialurono rūgšties pagrindu [41,42]. Hialurono rūgštis (HA) – polisacharidas, susidedantis iš *N*-acetilgliukozamino ir gliukurono rūgšties liekanų. Paruošus vandenyje tirpius HA darinius, turinčius azido ir alkino galines grupes, bei sumaišius jų vandeninius tirpalus, esant reikiamam katalizatoriaus Cu(I) kiekiui, vyksta 1,3-dipolinė ciklizacija ir greitai susidaro geliai. Gauti geliai gali būti naudojami kontroliuojamam vaistų atpalaidavimui arba audinių inžinerijoje ląstelėms sutvirtinti [41]. Nustatyta, kad gelinimui naudojamas Cu(I) kiekis nekenkia nei mielių ląstelėms, nei raudoniesiems kraujo kūneliams, tačiau kiti ląstelių tipai žūsta esant ir mažesnei Cu jonų koncentracijai [41]. Hidrogelių sudarymui vykdant CuAAC reakciją panaudotas HA-azidas ir skirtingi įvairaus ilgio dialkinai [42]. Gauti geliai panaudoti dirbtiniams implantams formuoti.

Dekstranas – dar vienas polisacharidas, kurio modifikavimui panaudota „klik“ chemija. Dekstranai – vandenyje tirpūs polisacharidai, sudaryti daugiausia iš 1,6-glikozidiniais ryšiais sujungtų monomerinių α -D-gliukopiranozės grandžių, turinčių mažą dalį α -1,2, α -1,3 ir α -1,4 ryšiu sujungtų grandžių [43]. Vykiant modifikuotų dekstranų – dekstrano-propargilkarbonato (dex-C \equiv C) ir dekstrano-azidopropilkarbonato (dex-N₃) – Cu(I) katalizuojamą ciklizaciją vandeniniame polietilenglikolio tirpale gaunami dekstrano mikrogeliai [44].

Kurdano (β -1,3-gliukano – didelės molekulinės masės polisacharido, susidedančio iš gliukozės likučių, sujungtų β -(1,3)-ryšiais) brominimo-azidinimo pasekmėje gaunamas 6-azido-6-deoksikurdanas, kuris [3+2] ciklizacijos būdu atrankiai reaguoja su įvairiais alkino grupę turinčiais junginiais. Tokiu būdu paprastai, kiekybiškai ir atrankiai gaunami (1 \rightarrow 3)- β -d-gliukanai, kiekvienoje gliukozidinėje grandyje turintys įvairias funkcines atšakas (laktozių, feroceno (bisciklopentadienilgeležies), pirenų, porfirinų) [45,46].

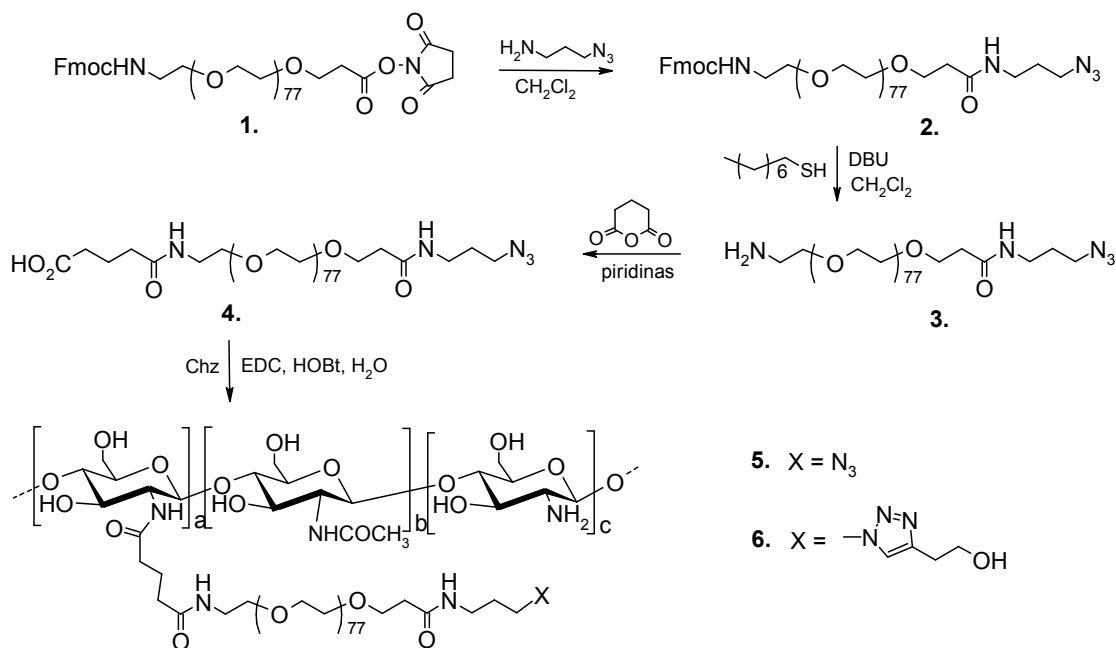
CuAAC reakcija panaudota greitam krakmolo fragmentų sujungimui, sintetinant tiksliai apibrėžtų šakotų oligosacharidų mimikrijas [47,48] (*mimikrija – reiškinys, kai organizmas savo spalva ir forma yra panašus į kitos*

rūšies organizmą arba negyvą daiktą, dėl ko jo gebėjimas išgyventi būna didesnis). Naudojant Cu katalizuojamą [3+2] dipolinę ciklizaciją buvo susintetintos pentadekasacharido ir dviejų heksadekasacharidų mimikrijos, turinčios dvi lygiagrečias maltoheptozilgrandines, per [1,2,3]-triazolą prijungtas prie gliukozės ar maltozės.

Diels-Alder ir azidų-alkinų [3+2] ciklizacijos reakcijos panaudotos polisacharidų ir baltymų imobilizavimui ant kieto paviršiaus [49]. Polietilenglikolio grandinės, turinčios galines alkino arba ciklodieno grupes, Diels-Alder reakcijos metu buvo imobilizuotos ant *N*-(maleimidokaproil)-funkcinę grupę turinčio stiklo.

Yra keletas publikacijų, skirtų chitozano modifikavimui naudojant „klik“ chemijos reakcijas. „Klik“ reakcijos metu prie chitozano *C(6)* padėties prijungus trimetilamonio katijoninę grupę gautas vandenyje tirpus 6-*N,N,N*-trimetiltriazolochitozanas [50].

Didelio azidinimo laipsnio (95 %) *N*-azidintas chitozanas buvo gautas per keletą stadijų – chitozano aminogrupės apsaugojimą ftalio rūgšties anhidridu, tritilinimą ar metoksitritilinimą, aminogrupės apsaugos pašalinimą hidrazino monohidratu, azidinimą trifluormetansulfonilazidu bei tritil- ar metoksitritilgrupių pašalinimą [51]. Vykdamas gauto *N*-azidinto chitozano ir fenil-, (fenil)alkil- bei alkilmonopakeistų alkinų CuAAC reakcijas, gaunami 1,2,3-triazolo dariniai, pasiekiamos geros jų išeigos (85-93 %). E. Lallana ir kt. [52] „klik“ reakcijai panaudojo chitozano-*N*-PEG- N_3 skiepytuosius kopolimerus. Naudojant karbodiimidinį metodą (EDC) prie chitozano buvo prijungtas karboksi- ir azido funkcinės grupės turintis PEG (1.11 schema).



1.11 schema. Chitozano-*N*-PEG- N_3 skiepytųjų kopolimerų sintezė ir jų panaudojimas „klik“ reakcijai [52]

Vykiant CuAAC reakciją tarp chitozano-*N*-PEG- N_3 (**5**, 1.11 schema) ir propargilalkoholio, gaunamas toziloiliekaną turintis junginys **6** (1.11 schema), pasiekiant 70-90 % išeigą. Yra nustatyta [52], kad, naudojant Cu(I) katalizatorių, vyksta chitozano grandinės destrukcija. Cu(I) susidarant *in situ* iš Cu(II)-askorbato, Cu(II)- H_2O_2 arba Cu(II)-Cu(0) oksidacijos-redukcijos sistemų, susidaro hidroksiradikalai ($\cdot\text{OH}$), kurie ardo biomolekules (polisacharidus, nukleorūgštis, fermentus). Naudojant SEC-MALLS tyrimus buvo įvertinta Cu(I) įtaka chitozano, manano, dekstrano ir hialurono rūgšties pagrindinės grandinės destrukcijai [52]. Nustatyta, kad manano molekulinė masė sumažėjo 3 %, dekstrano – 38 %, chitozano – 95 %, o hialurono rūgšties – daugiau nei 99 %. Dėl CuAAC reakcijos metu vykstančios akivaizdžios chitozano destrukcijos ir po gryninimo liekančio citotoksinio Cu kiekio, chitozano-*N*-PEG- N_3 „klik“ reakcijai autoriai rekomenduoja alternatyvą – Bertozzi pasiūlytą įtempiu paremtą azidų-alkinų [3+2] ciklizacijos (SPAAC) reakciją [10,11].

1.2. Polisacharidų katijonizavimas

Chitozanas, kaip ir krakmolos bei celiuliozė, yra pastoviai atsinaujinantys gamtiniai polisacharidai. Jie įgauna nebūdingas gamtiniams polisacharidams savybes, prie šių polimerų prijungus katijoninių amino- arba ketvirtinių amonio grupių. Ketvirtiniai amonio junginiai yra druskos, sudarytos iš ketvirtinio amonio katijono ir organinio arba neorganinio anijono. Šie junginiai naudojami kaip paviršinio aktyvumo medžiagos, dezinfekcijos priemonės, audinių minkštikliai, antistatikai (taip pat ir šampūne). Ketvirtinių amonio grupių sudarymas arba prijungimas vadinamas katijonizavimu [53].

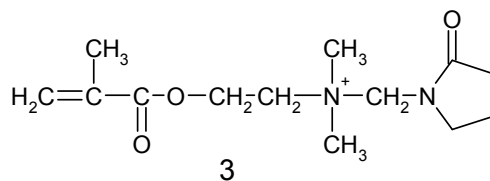
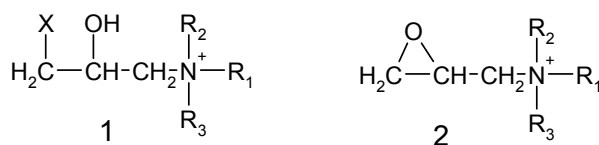
1.2.1. Katijoniniai celiuliozės ir krakmolo dariniai

Tarp modifikuotų polisacharidų darinių labai svarbią vietą užima vandenyje tirpūs katijoniniai dariniai. Efektyviausias tretinių amino ir/arba ketvirtinių amonio grupių prijungimo prie polisacharidų ir/arba heteropolisacharidų būdas remiasi šių polisacharidų reakcija su tretiniais aminais, turinčiais glicidil- pakaitą, pvz., dimetilglicidilaminu, ir/arba su halogeno atomą turinčiais amonio junginiais, pvz., 3-chloro-2-hidroksipropil-trimetilamonio chloridu.

Vandenyje tirpūs ketvirtinę amonio grupę turintys celiuliozės dariniai gaunami eterinant celiuliozę ketvirtiniais halogenhidriniais (1) arba ketvirtiniais epoksidais (2) (1.3 pav.) [54]. Sėkmingai celiuliozės eterinimo reakcijai reikalingas pakankamai didelis šarmo kiekis. Šarmas brinkina celiuliozės pluoštą ir tokiu būdu palengvina modifikavimo reagentų prieigą prie aktyvių centrų.

Keičiant reakcijos trukmę ir pradinių reagentų (celiuliozės/katijonizuojančio agento) molinius santykius, katijonizuotos celiuliozės pakeitimo laipsnis kinta nuo 0,2 iki 0,63. Tokia celiuliozė jau tirpi vandenyje ir ribinis klampos skaičius vandenyje didėja, didėjant jos katijonizavimo laipsniui [55]. Katijoninė celiuliozė gauta vandeninėje šarminėje terpėje celiuliozę veikiant epichlorhidrino ir dimetilamino kondensatu [56], taip pat celiuliozei

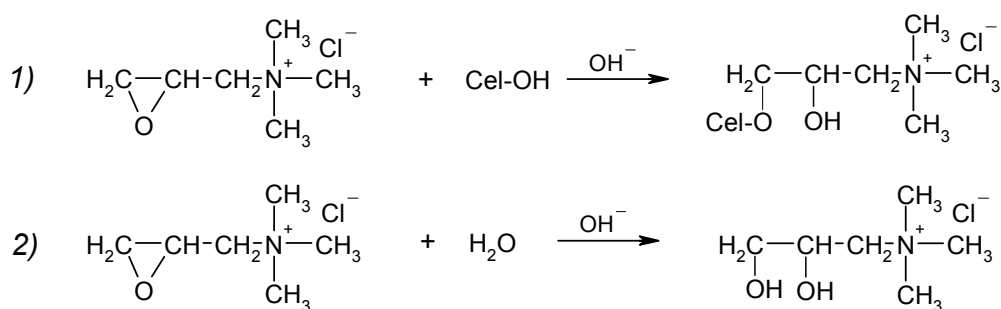
homogeninėmis sąlygomis NaOH/karbamido vandeniniame tirpale reaguojant su 3-chloro-2-hidroksipropiltrimetilamonio chloridu (CHPTMAC) [55].



X: Cl, Br, ar I R₂, R₃: CH₃ ar CH₂CH₃

1.3 pav. Celiuliozės katijonizavimui naudojami reagentai: ketvirtiniai halogenhidrinai (1), ketvirtiniai epoksidai (2), 2-metakriiloiloksietil [(1-pirolidonil)-metil] dimetilamonio chloridas (3). R₁ – alkilgrupė, turinti nuo 1 iki 10 anglies atomų

Katijonizuota celiuliozė buvo gauta mikrokristalinę celiuliozė NaOH/karbamido vandeniniame tirpale veikiant su 2,3-epoksipropiltrimetilamonio chloridu (EPTMAC) (1.12 schema) [57]. Tačiau, esant didelei NaOH koncentracijai, nemaža dalis EPTMAC hidrolizuojasi, o didesnis katijonizavimo laipsnis pasiekiamas per ilgesnį reakcijos laiką.

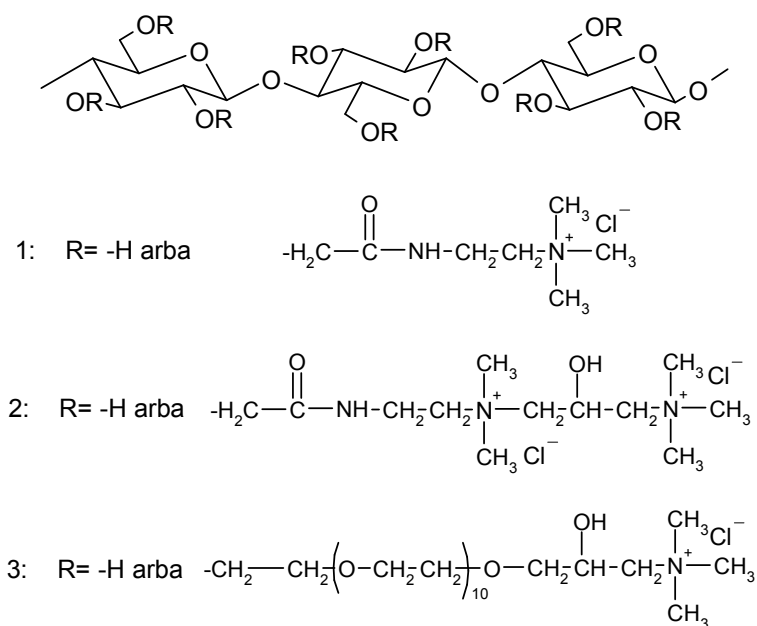


1.12 schema. Celiuliozės katijonizavimas EPTMAC (1) ir pašalinė EPTMAC hidrolizės reakcija (2)

Gerų rezultatų pasiekama katijonizavimui naudojant reagentą, turintį pirolidono bei amonio liekanas, pvz., 2-metakriiloiloksietil[(1-pirolidonil)-metil] dimetilamonio chloridą (3) (1.3 pav.). Tokiu junginiu modifikuota

hidroksietilceliuliozė mažiau jautri hidrolizei vandeniui, gerai tirpsta, iš jos gaunami geresni plaukų ir odos kondicionieriai [54].

Buvo paruošti vandenyje tirpūs alkilkarbamoilceliuliozės mono- ir diketvirtiniai amonio dariniai 2-trimetilamonioetilkarbamoilceliuliozės chloridas (1) ir 3-trimetilamonio-2-hidroksipropil-*N,N*-dimetilamonioetilkarbamoilmetilceliuliozės chloridas (2) [54], kurie siūlomi naudoti kosmetikoje (1.4 pav.). Šių darinių sintezei naudota *N,N*-dimetilaminoetilkarbamoilceliuliozė.

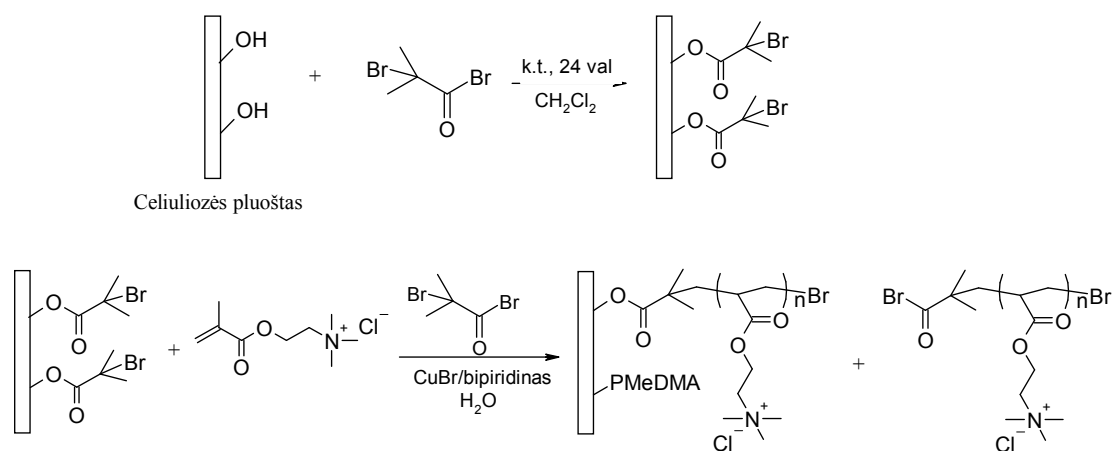


1.4 pav. Kosmetikoje naudojami katijoniniai celiuliozės dariniai: 2-trimetilamonioetilkarbamoilceliuliozės chloridas (1), 3-trimetilamonio-2-hidroksipropil-*N,N*-dimetilamonioetilkarbamoilmetilceliuliozės chloridas (2), hidroksietilceliuliozės dariniai, kuriuose katijoninė liekana prijungta prie polietilenoksido grandinės (3)

Taip pat buvo susintetinti katijonizuoti hidroksietilceliuliozės dariniai, kuriuose katijoninė liekana prijungta prie polietilenoksido grandinės (3) (1.4 pav.), ir tai celiuliozės molekulei suteikia lankstumo [54].

Aprašytas celiuliozinio pluošto modifikavimas katijoniniu polimeru poli[2-(metakriloiloksi)etil]-trimetilamonio chloridu (pMeDMA), vykdant ATRP (*atomo pernašos radikaline polimerizacija*) nuo pluošto paviršiaus [58].

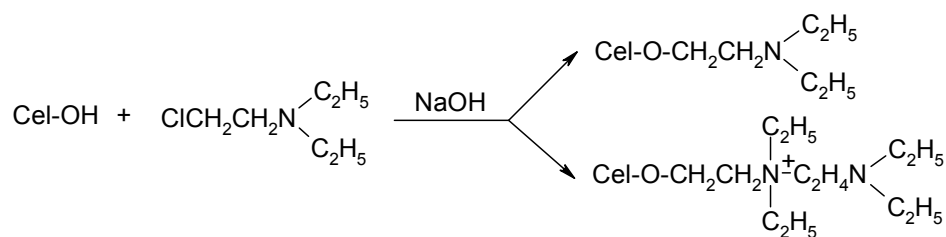
Pirmiausiai prie celiuliozės paviršiaus prijungiamas ATRP iniciatorius, turintis labilų Br atomą, nuo kurio pradeda augti polimerinė grandinė (1.13 schema).



1.13 schema. pMeDMA skiepijimo nuo celiuliozės pluošto paviršiaus ATRP metodu schema [58]

Didėjant skiepijamo katijoninio polimero pMeDMA molekulinėi masei stipriau pasireiškia kaimyninių polimerinių grandinių steriniai trukdžiai, todėl prie celiuliozės paviršiaus priskiepijamų polimerinių grandinių skaičius mažėja. Taip modifikuojant celiuliozės pluoštą galima gauti stipriai adsorbuojančius, tirpius vandenyje, pasižyminčius geresnėmis savybėmis katijoninius celiuliozės polimerus [58].

Celiuliozės bei krakmolo katijoniniai dariniai plačiai tyrinėjami Kauno technologijos universitete [59-68]. Celiuliozės acetatui reaguojant su *N,N*-dietilepoksipropilaminu gauti vandenyje tirpūs katijoniniai celiuliozės dariniai, turintys tretines aminogrupes [63]. Gautų polielektrolitų pakeitimo laipsnis siekė 0,8 (prijungta 4,2 % azoto). Nustatyta, kad vandenyje tirpsta dariniai, turintys 1,2-4,2 % azoto. Vandenyje tirpūs amininti celiuliozės dariniai taip pat buvo gauti hidroksietilceliuliozei šarminėje terpėje reaguojant su *N*-dietil-*N*-chloretilamino hidrokloridu [64]. Šios reakcijos metu susidaro tretines ir ketvirtines aminogrupes turinčių produktų mišinys (1.14 schema).



1.14 schema. Celiuliozės modifikavimas *N*-dietil-*N*-chloretilaminu

Ištyrus vandenyje tirpių katijoninių celiuliozės darinių įtaką acetilsalicilo rūgšties atpalaidavimui iš tablečių nustatyta, kad polimerai sulėtina vaistinės medžiagos atsipalaidavimą skrandyje. Vaisto atsipalaidavimas lėtėja dėl joninės sąveikos tarp vaistinės medžiagos ir polimero [66]. Be to, vandenyje tirpi hidroksietilceliuliozė ir dietilaminoetilhidroksietilceliuliozė gali būti taikoma diaderminių pleistrų, skirtų vaistinių junginių transderminei pernašai, adhezyvinei plėvelei formuoti. Pleistrai su veikliosiomis medžiagomis, prasiskverbiančiomis per odą ir veikiančiom giliau esančius audinius, vadinami diaderminiais (transderminiais) [65].

Katijonizuota celiuliozė pasižymi polielektrolitams būdingomis savybėmis, be to, lyginant su polietileniminu, yra mažiau citotoksiška ir gali būti naudojama genų pernašai [55], o katijonizuotus celiuliozės darinius naudojant kaip užpildus tabletėse, galima reguliuoti rūgštinių vaistų atpalaidavimo spartą [64].

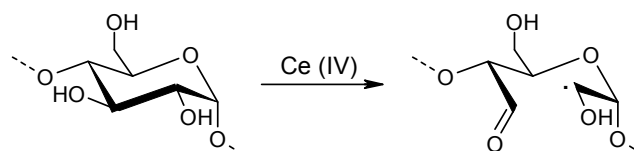
Natrio tripolifosfatu susiuvant katijonizuotą celiuliozę gautos nanodalelės yra potencialūs baltymų nešikliai [56]. Alkilkarbamoilceliuliozės mono- ir diketvirtiniai amonio junginiai pasižymi antimikrobiniu aktyvumu, gali būti naudojami kaip tirštikliai ar minkštikliai, taip pat paviršiaus įtempimui, putojimui ir putų, susidariusių kompleksavimosi su natrio dodecilsulfatu metu, stabilumui reguliuoti [69,70].

Kraskmolo katijonizavimas vyksta gerokai lengviau negu celiuliozės ar chitozano. Tiek mažo, tiek ir didelio pakeitimo laipsnio (PL) katijoninio kraskmolo (KK) sintezei dažniausiai naudojami panašūs katijonizuojantys reagentai, t.y., CHPTMAC (techninis pavadinimas – Quab[®] 188) ir

glicidilpakaitą turintys dariniai: EPTMAC (glicidiltrimetilamonio chloridas, techninis pavadinimas – Quab[®] 151), glicidiltrimetilamonio hidroksidas ar acetatas [68,71-80]. Mažo PL KK dariniai dažniausiai gaunami heterogeninėmis sąlygomis vandeninėje šarminėje terpėje. Šarminė terpė skatina krakmolo brinkimą ir kleisterizaciją, kuriems išvengti į reakcijos mišinį dedamos druskos, pvz., Na₂SO₄ [74]. Krakmolo brinkimą taip pat galima sumažinti vietoj Na₂SO₄ pridėjus su vandeniu gerai besimaišančių organinių tirpiklių, pvz., metilo, etilo ar izopropilo alkoholių [81].

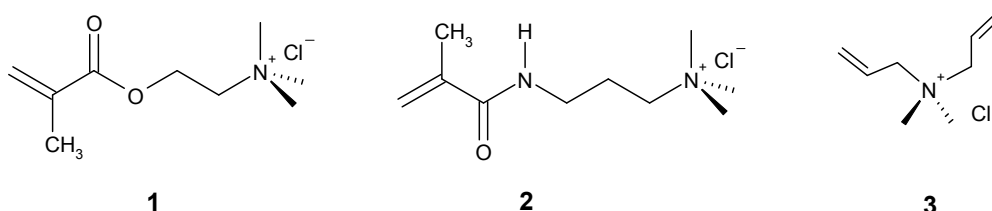
Didelio katijonizavimo laipsnio katijoniniai krakmolo dariniai (PL 1,1) gali būti gaunami krakmolo reakcijos su EPTMAC metu, naudojant įvairias reakcijos terpes: katijonizavimas vandeniniame NaOH tirpale, homogeninė reakcija DMSO tirpale ar heterogeninė reakcija etanolio/vandens mišinyje [74]. Naudojant dviejų stadijų reakciją, galima gauti KK, kurio PL 1,5.

Krakmolo granulių katijonizavimui gali būti naudojama skiepytoji kopolimerizacija [82,83]. Krakmolas teigiamą krūvį įgauna vykdant polimerizaciją su teigiamą krūvį turinčiais monomerais ar su monomerais, teigiamą krūvį įgaunančiais po polimerizacijos. Naudojami ketvirtinius amonio jonus turintys monomerai, pvz., dimetilaminometilmetakrilato dimetilsulfato ar metilchlorido ketvirtinės druskos, metildialilaminometilchlorido ketvirtinės druskos, taip pat *N,N*-dialkilaminoalkilakrilatai, metakrilatai bei jų druskos, *N,N*-dialkilaminoalkilakrilamidai, metakrilamidai bei jų druskos, arilvinilbenzildialkilaminai ir jų druskos, tačiau dažniausiai – *N*-(2,3-epoksi-propil)dimetilamino, *N*-(2,3-epoksi-propil)dibutilamino ar *N*-(2,3-epoksi-propil)metilanilino ketvirtinės metilchlorido druskos [84]. Pirmiausiai polisacharido makromolekulėje susidaro radikalas, kuris gali reaguoti su monomeru, turinčiu bent vieną dvigubąjį ryšį, pvz., 2-hidroksi-3-metakriiloiloksipropiltrimetilamonio chloridu [83]. Radikalas gali susidaryti naudojant efektyvų oksidavimo agentą – cerio (IV) kompleksą, pvz., cerio (IV) amonio nitrata [82]. Ceris (IV) sudaro oksidacijos-redukcijos porą su krakmolo anhidroglukozės grandimi, ir, nutrūkus *C(2)*-*C(3)* ryšiui, prie *C(2)* susidaro radikalas (1.15 schema).



1.15 schema. Radikalo susidarymas krakmolo grandyje

Skiepytajai kopolimerizacijai panaudoti monomerai: [2-(metakriiloiloksi)-etil]-trimetilamonio chloridas (TMAEMA (1)), [3-(metakriiloilamino)-propil]-trimetilamonio chloridas (MAPTAC (2)) ir dialildimetilamonio chloridas (DADMAC (3)) (1.5 pav.) [84]. Minėti monomerai gali būti priskiepyti prie krakmolo, tačiau didelės išeigos pasiekiamos tik tada, kai naudojamas krūvio neturintis komonomeras. Komonomeru pasirinktas vandenyje tirpus gerai besipolimerizuojantis akrilamidas. Gaunami katijoniniai skiepytieji krakmolo dariniai, kurių pagrindinė grandinė „apauginta“ nejoninių bei katijoninių vinilo monomerų segmentais. Be dažniausiai pasitaikančio akrilamido, gali būti naudojami ir kiti nejoniniai vinilmonomerai: stirenas, akrilatai, akrilnitrilas, dienai [84].



1.5 pav. Krakmolo katijonizavimui skiepytosios kopolimerizacijos būdu naudojami monomerai: TMAEMA (1), MAPTAC (2) ir DADMAC (3)

Keletas publikacijų skirta didelio pakeitimo laipsnio katijonizuoto krakmolo sorbentų sintezei ir tyrimui [59,60,68]. Gautas mikrogranulių pavidalo katijoninis (KK) arba tinklinis katijoninis krakmolas (TKK), išsamiai ištirtas krakmolo eterinimo ketvirtinių amonio grupių turinčiais epoksidais reakcijos mechanizmas, katalizatorių įtaka tokių reakcijų greičiui ir efektyvumui. TKK yra geras anijoninių dažiklių iš spalvotų nuotekų sorbentas, kuris sorbcine geba pranoksta aktyvintą anglį, o sorbcijos greičiu – chitozaną. Taip pat TKK iš tirpalų gerai pašalina ir Cr(VI) anijonus [61]. Sorbuojamo

Cr(VI) kiekis priklauso nuo TKK paruošimo – ar naudojamas sausas, ar išbrinkintas TKK, temperatūros, tinklinimo laipsnio; beveik visais atvejais geresni sorbcijos rezultatai gaunami naudojant sausą TKK. Iš KK ir TKK pagaminus katijoninio krakmolo-jodo-jodido kompleksus gaunami polimeriniai baktericidai [62]. Tiriant katijoninio krakmolo-jodo bei amilozės-jodo įtarpos kompleksų antimikrobinį poveikį heterotrofinėms bei koliforminėms bakterijoms nustatyta, kad, kai tiriamos medžiagos kiekis yra didesnis nei 0,1 g/l, jau po kelių minučių tiek koliforminių, tiek heterotrofinių bakterijų vandenyje nelieka. Pagal didėjančią antimikrobinį veiksmingumą katijoninių ketvirtinių amonio grupių turintys krakmolo dariniai gali būti išdėstyti tokia eile: tinklinto katijoninio krakmolo jodidas < tinklinto katijoninio krakmolo chloridas ≤ katijoninio krakmolo chloridas [62].

Gautų katijoninių darinių savybės priklauso nuo katijoninės grupės cheminės sudėties, pakeitimo laipsnio, bet labiausiai nuo sintezės metodo. Katijonizuotas krakmolas (PL 0,03-0,12), katijonizavimui naudojant EPTMAC, gautas keturiais skirtingais metodais [72]:

- Suspensijoje: krakmolo suspensija veikiama katijonizuojančiu reagentu;
- Pusiausausuoju metodu: reakcija vykdoma sumaišius sausą krakmolą, NaOH ir katijonizuojantį reagentą;
- Pastos (kleisterio) metodu: krakmolo suspensija veikiama garais, ir gautas kleisteris reaguoja su eterifikuojančiu reagentu;
- Ekstruderyje: krakmolas ir NaOH dedamas į ekstruderį su 7 skirtingomis temperatūrinėmis zonomis. Antroje zonoje įvedamas katijonizuojantis reagentas, o 3-7 zonose vyksta katijonizavimo procesas bei krakmolo destrukcija.

Granuluota darinių struktūra nepakinta tik suspensinio proceso metu. Pusiausauso metodo atveju apgadinamos kai kurios granulės, o kleisterio ir ekstruzijos būdu – granulės visiškai suardomos. Jei granuluota struktūra išlieka, šaltame vandenyje katijonizuoti dariniai tik brinksta arba dalinai ištirpsta. Visiškai suardžius granulinę struktūrą, produktai gerai tirpsta tiek karštame, tiek ir šaltame vandenyje [72,73]. Nuo granulių struktūros taip pat

priklauso ir katijonizuotų darinių reologinės savybės, tačiau visais atvejais KK klampa yra mažesnė nei pradinio krakmolo.

Katijoninis krakmolas yra labai svarbus komercinis produktas, dėl joninės prigimties plačiai taikomas maisto ir nemaisto, ypač popieriaus pramonėje [85]. Pusė viso krakmolo, naudojamo popieriaus gamybai, yra chemiškai modifikuotas krakmolas, iš kurio apie 20 % – mažo pakeitimo laipsnio katijonizuotas krakmolas, popieriui suteikiantis geresnes savybes [68]. Pridėjus KK, pagerėja popieriaus mechaninis atsparumas, užpildų įsisavinimas, pagreitėja nusausinimas, sumažinamas nuotėkų užterštumas [71].

Didelio katijonizavimo laipsnio katijoniniai krakmolo dariniai pasižymi puikiomis flokuliacinėmis savybėmis. KK flokuliacinis efektyvumas priklauso nuo amino grupių prigimties (ketvirtinė > tretinė > antrinė > pirminė), flokulianto cheminės struktūros, t.y., flokulantai, gauti skiepijimo būdu, yra efektyvesni nei gauti eterinimo reakcijos būdu [75]. Flokuliacijos efektyvumas didėja didėjant azoto kiekiui, mažėjant flokulianto molekulinėi masei, flokuliacija efektyvesnė esant pH 6 negu esant pH 8. Žinoma, kad didesnis katijonizavimo laipsnis pagerina KK flokuliacines savybes, tačiau modifikavimas gali sumažinti molekulinę masę. Įvertinant ekonominius (sintezės kainą) ir ekologinius (toksiškumą) parametrus nustatyta, kad KK, kurio PL 0,6, pasižymi optimaliomis flokuliacinėmis savybėmis [76]. Toks KK flokuliaciniu efektyvumu nenusileidžia sintetiniams flokulantams, pvz., PTAC tipo (Praestol™) poliakrilamido kopolimerams, kuriuose yra 50 mol. % katijoninių grupių, ir homopolimerams PDADMA (Polyquat™), turintiems 100 mol. % katijoninių grupių, be to, yra mažiau toksiškas.

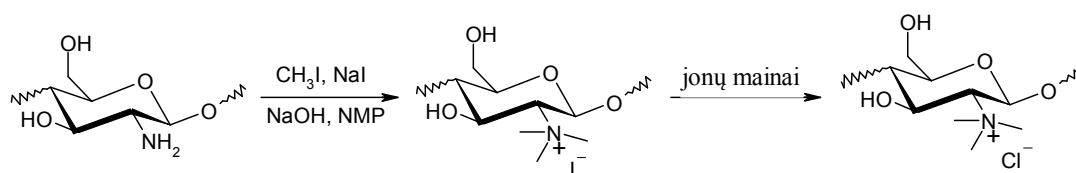
1.2.2. Katijoniniai chitozano dariniai

Kiekvienoje chitozano grandyje yra trys skirtingo reaktingumo funkcinės grupės: dvi hidroksi- ir pirminė aminogrupė. Parenkant reakcijos sąlygas galima gauti skirtingos struktūros, pakeitimo laipsnio, molekulinės masės ir savybių chitozano darinius. *N*-pakeistų chitozano darinių (*N*-alkil- arba *N*-acildarinių) sintezė yra paprasta. Galutiniai aminų alkilavimo produktai

yra ketvirtinės amonio druskos. Vykdamas alkilinimą, padaugėja teigiamų krūvių, ir tokie polimerai gali būti panaudoti anijoninėms dervoms gauti [86]. Prie chitozono prijungus katijonines ketvirtines amonio grupes, gaunami plačiame pH verčių intervale vandenyje tirpūs junginiai, o tai padidina chitozono panaudojimo galimybes.

Nors yra daug įvairių reagentų chitozanoi katijonizuoti, dažniausiai naudojama jodmetanas [87-88] ir *N*-2,3-epoksipropil-*N,N,N*-trimetilamonio chloridas (EPTMAC) [89-93].

Paprasciausi šios klasės dariniai yra chitozono trimetilamonio druskos [87,94,95]. Veikiant chitozaną jodmetanu *N*-metil-2-pirolidone (NMP), esant natrio jodido ir natrio hidroksido pertekliui, gaunamos didelio pakeitimo laipsnio (25-64 %) vandenyje tirpios chitozono trimetilamonio druskos (1.16 schema) [87].



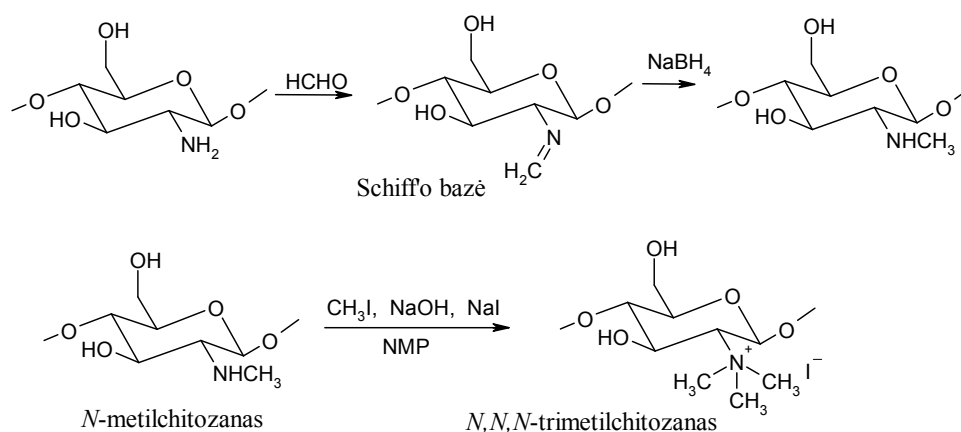
1.16 schema. Chitozono trimetilamonio druskų sintezė

Šarmas reikalingas susidarančiam HI surišti, taip išvengiant dar nesureagavusių aminogrupių protonizacijos. Norint pasiekti didesnę katijonizavimo laipsnį, reakcija kartojama keletą kartų. Siekiant išlaikyti katijonizuoto darinio stabilumą, jodido anijonas pakeičiamas chlorido anijonu.

Chitozono reakcija su jodmetanu DMF/vandens mišinyje (50:50, v/v) gali būti vykdoma ir be natrio jodido [88]. Priklausomai nuo reakcijos sąlygų ir reagentų molinio santykio, katijonizavimo laipsnis kito nuo 0 iki 74 %.

Katijonizuotas chitozanas dažnai sintetinamas naudojant tarpinį chitozono junginį – Schiff'o bazę [88]. Laisvos chitozono aminogrupės lengvai reaguoja su aldehidais ar ketonais, sudarydamos Schiff'o bazines. Reakcija tarp aldehido ir amoniako, pirminių arba antrinių aminogrupių, dalyvaujant redukuojančiam agentui ir susidarant pirminiam, antriniam arba tretiniam

aminui, vadinama karbonildarinių redukciniu amininimu arba aminų redukciniu alkiliniu. Reakcija vyksta keliomis stadijomis. Pradžioje susidaro metanolaminas, kuris dehidratuojasi į iminą (Schiff'o bazę). Reakcijos metu susidarantis imininis ryšys yra pakankamai stabilus neutralioje ir šarminėje terpėje. Reakcijos terpė yra rūgštinė, todėl iminas yra protonizuotas. Redukavus iminą natrio boranu arba natrio cianborhidridu, gaunamas *N*-alkilchitozanas. Chitozано katijonizavimas naudojant Schiff'o bazę vyksta dviem stadijomis. Pirmoje susidaro monoalkilintas chitozanas, kuris toliau reaguoja su jodmetanu (1.17 schema) [88]. Naudojant Schiff'o bazę pasiekiamas didesnis katijonizavimo laipsnis (~85-95 %), tačiau naudojami reagentai (ypač jodmetanas, NaBH₄) yra labai brangūs.



1.17 schema. Dviejų stadijų chitozано katijonizavimas, naudojant tarpinį darinį Schiff'o bazę: aminų monoalkilininimas (viršuje) ir metilchitozано katijonizavimas (apačioje)

Kitas chitozано katijonizavimui labai plačiai naudojamas junginys – EPTMAC [89-93,96]. Chitozaną katijonizuojant EPTMAC neutralioje ar rūgštinėje terpėje, reakcijoje dalyvauja jo aminogrupė, kuri yra pajėgi atidaryti EPTMAC epoksižiedą [96]. Šarminėje aplinkoje katijonizavimo reakcijoje dalyvauja hidroksigrupė.

Katijonizavimo laipsnis priklauso nuo reakcijos sąlygų: temperatūros, reakcijos vykdymo trukmės, polimero koncentracijos [96]. Chitozaną katijonizuojant su EPTMAC rūgštinėje terpėje nustatyta, kad per pirmąsias 18

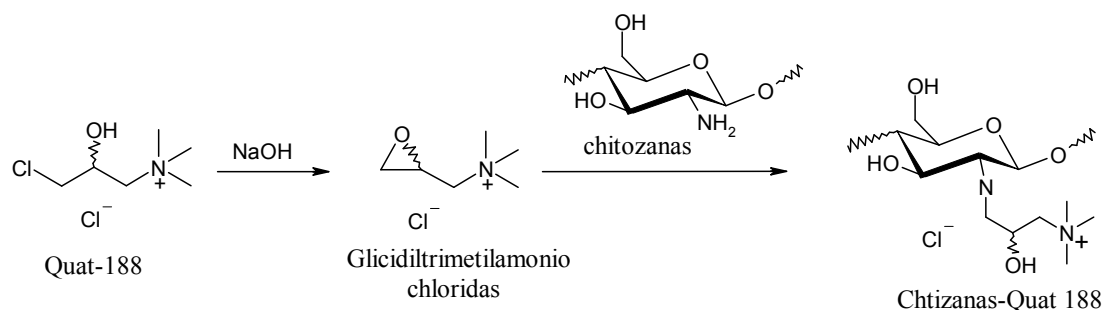
valandų pakeitimo laipsnis didėja, o, reakciją vykdant ilgiau, beveik nebekinta, todėl optimalia reakcijos vykdymo trukme laikoma 18 valandų. Reakcijos temperatūrą keliant iki 50 °C, pakeitimo laipsnis didėja greičiau, negu temperatūrą keliant nuo 50 °C iki 80 °C. Katijonizavimo laipsnis didėja naudojant EPTMAC perteklių [96].

Chitozano darinių, turinčių ketvirtinių aminogrupių, sintezei dažnai naudojamas nedidelis acto rūgšties kiekis, kuris padidina reakcijos greitį, palengvina reakciją [97]. Rūgštinėje terpėje lengviau atsidaro epoksižiedas, dėl to padidėja reakcijos greitis, palengvėja EPTMAC epoksigrupių ir chitozano aminogrupių susijungimas. Chitozaną katijonizuojant su EPTMAC 1 % acto rūgštyje 70 °C temperatūroje 24 valandas, pasiektas 96 % katijonizavimo laipsnis (KL).

Nors katijonizavimas efektyvesnis rūgštinėje terpėje, pakankamai geri rezultatai pasiekiami ir neutralioje terpėje. Chitozano dispersiją vandenyje veikiant EPTMAC 80 °C temperatūroje 4 val., KL siekia 51 % [89].

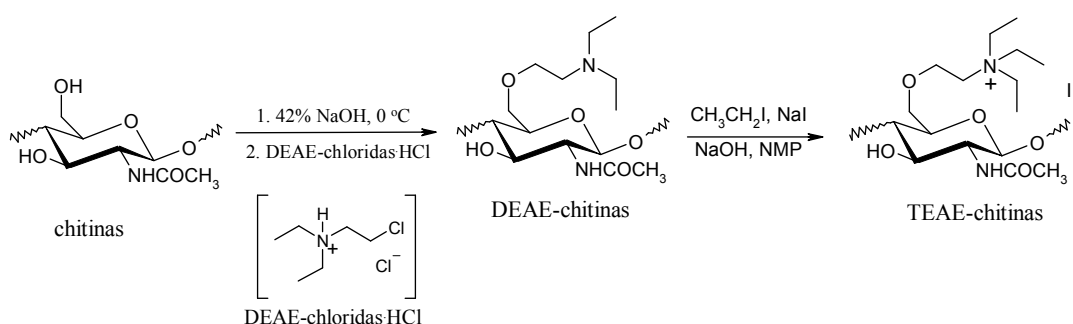
Katijonizavimo EPTMAC reakciją galima katalizuoti ne tik rūgštimi, bet ir kitais junginiais, pvz., $Zn(BF_4)_2$ [98].

Alternatyvų būdą katijonizuotiems dariniams gauti pasiūlė Daly ir Guerrini (18 schema) [99]. Naudojant CHPTMAC – komercinę stabilią druską Quat-188, glicidilgrupę turintis reagentas susidaro *in situ*, ir, tokiu būdu, padidėja saugumas, susijęs su epoksidų naudojimu dideliu mastu. Gauti chitozano dariniai tirpsta neutraliame vandenyje.



1.18 schema. Katijoninio chitozano sintezė naudojant katijonizuojantį reagentą *Quat-188*

Įdomūs rezultatai gauti katijonizuojant chitiną. Chitino trietilaminoetilidariniai (TEAE-chitinas) gerai tirpsta vandenyje esant neutralioms pH vertėms [100]. Šie dariniai gaunami dviem stadijomis. Pirmiausiai žemoje temperatūroje aktyvuojama chitino C(6) pirminė hidroksigrupė. Tuo tikslu chitinas 3 val. kambario temperatūroje vakuume veikiamas 42 % NaOH vandeniniu tirpalu, po to gauta dispersija intensyviai sumaišoma su sutrintu ledu, gaunant skaidrą šarminį chitino tirpalą.



1.19 schema. Trietilaminoetilchitino sintezė

Po to aktyvuotas chitinas veikiamas su dietilaminoetilchlorido druska (1.19 schema). Įdomu, kad tarpinis junginys DEAE-chitinas taip pat yra tirpus neutraliame vandenyje. Tai galima paaiškinti tuo, kad stipriai šarminėje terpėje vyksta chitino deacetilinimas, o, kaip žinoma [101], pasiekus apie 50 % deacetilinimo laipsnį, chitinas tampa tirpus vandenyje. DEAE-chitiną 9 val. kaitinant 80 °C temperatūroje 10 % NaOH tirpale, turinčiame NaBH₄, gaunamas dietilaminoetilchitozanas.

O-katijonizuotų chitozano darinių sintezė yra komplikauta dėl chitozano netirpumo šarminėje terpėje. Publikacijų apie chitozano tiesioginį katijonizavimą per hidroksigrupę nerasta. Norint chitozaną katijonizuoti per hidroksigrupę, reikia apsaugoti žymiai aktyvesnę aminogrupę. O-(2-hidroksi)-propil-3-trimetilamonio chitozono chloridas (O-KCHZ) buvo susintetintas naudojant N-benzilidenchitozaną [102].

Gana dažnai katijonizuojami chitozano dariniai, pvz., katijoninis karboksimetilchitozanas. Pirmiausiai į trimetilamino tirpalą lašinama koncentruota druskos rūgštis, po to supilamas epoksichloropropanas. Kai

reakcijos mišinys tampa homogeninis, reakcijos temperatūra keliama iki 51 °C ir lėtai (1-1,5 valandos) lašinamas vandeninis NaOH tirpalas, kuris lėtai skaido susidariusį trimetilamino hidrochloridą, susidarant trimetilaminui, kuris toliau reaguoja su epoksichloropropanu [103,104]. Gautas mišinys sumaišomas su karboksimetilchitozanu bei EPTMAC, ir reakcija vykdoma 80 °C temperatūroje 8 valandas.

N-chloracetil-6-*O*-trifenilmetilchitozanas tirpsta organiniuose tirpikliuose, todėl jis naudojamas kaip tarpinis junginys katijonizuotiems chitozано dariniams gauti. Įvairiems tretiniams aminams (piridinui, 1-metilimidazolui, trietilaminui, tributilaminui) reaguojant su *N*-chloracetil-6-*O*-trifenilmetilchitozanu argono atmosferoje gaunami katijonizuoti chitozано dariniai, kuriuose chitozано KL siekia 85 %. Kadangi *N*-chloracetil-6-*O*-trifenilmetilchitozано pakeitimo laipsnis (PL) buvo 85 %, iš čia seka, kad visos *N*-chloracetilgrupės pakeičiamos katijoninėmis. Tokiomis sąlygomis *N*-chlorbutil-6-*O*-trifenilmetilchitozaną veikiant piridinu gaunamas *N*-(1-karboksibutil-4-piridino)chitozано chloridas, kuriame chitozано KL siekia 67 %. Pradinio junginio pakeitimo laipsnis buvo 67 %, taigi, ir šiuo atveju visos *N*-chlorbutilo grupės pakeičiamos piridinu [105].

Lyginant su neutraliu chitozanu, katijonizuoti dariniai turi didesnę imlumą drėgmei, didesnę pralaidumą, geresnes bioadhezes ir antimikrobines savybes [89,106]. Ketvirtinėmis amonio grupėmis katijonizuotas chitozanas pasižymi antimikrobinu ir antigrybeliniu aktyvumu [102]. Buvo nustatyta, kad papildomai katijonizuotas chitozanas pasižymi geresniu antigrybeliniu aktyvumu, lyginant su pradiniu chitozanu, chitozано Schiff'o bazėmis ar *N*-pakeistais chitozано dariniais [106]. Katijonizuotų junginių antibakterinis aktyvumas stiprėja didinant KL ir mažinant molekulinę masę [104].

Anksčiau polimeriniai ketvirtiniai amonio dariniai dažniausiai buvo naudojami kaip biocidiniai polimerai. Dabar didžiausias dėmesys skiriamas žmogaus organizmui saugių vaistų paieškai. Dėl gerų antibakterinių savybių katijonizuotas chitozanas plačiai naudojamas medicinoje, farmacijoje. Koncentruoti chitozано tirpalai naudojami kremų, kosmetikos priemonių

gamyboje, o taip pat maisto pramonėje, fotografijoje, vandenvaloje [107]. Vandenvaloje jais sujungiami ir pašalinami iš nuotekų sunkieji metalai: Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} [108,109].

1.3. Chitozano nanodalelės ir nanopluoštai

Nanodalelė (ND) – mikroskopinė dalelė, kurios bent vienas matmuo mažesnis nei 100 nm [110]. ND traktuojamos kaip tarpininkės tarp dalelių, matomų optinio mikroskopo pagalba, ir atominių bei molekulinių dalelių. Jos dažnai pasižymi netikėtomis savybėmis, nes yra pakankamai mažos ir gali pasižymėti kai kuriomis kvantinėmis savybėmis. Pavyzdžiui, aukso ND tirpale gali būti nuo tamsiai raudonos iki juodos spalvos. ND paviršiaus ploto ir tūrio santykis labai didelis, o tai skatina difuziją, ypač aukštose temperatūrose. ND agregacija yra greitesnė nei didesnių dalelių.

Polimerinės nanodalelės įdomios tuo, kad sudaro polimerinį sluoksnį – apvaskalą, kurio viduje gali būti „patalpintas“ bioaktyvus junginys. Nanodalelių sistemose bioaktyvios medžiagos gali būti ištirpintos, kapsuliuotos, adsorbuotos, imobilizuotos arba disperguotos. Priklausomai nuo paruošimo būdo gaunamos įvairių formų nanodalelės: nanosferos, nanolazdelės, nanokapsulės, nanopluoštai [111].

Pastaruoju metu išaugo susidomėjimas polisacharidų nanodalelių sistemomis.

1.3.1. Chitozano nanodalelės

Nanodalelėms (ND) iš polisacharidų gauti naudojami įvairūs metodai: kovalentinis ar joninis tinklinimas, polimer-polimerinis polielektrolitų kompleksavimas, hidrofobiškai modifikuotų polisacharidų savaiminė agregacija [112-114]. Gamtinių polisacharidų nanodalelių sintezei plačiausiai naudojamas chitozanas (Chz). Chitozaną tinklinant įvairiais susiuvančiais agentais paprastai gaunamas hidrogelis. Iš chitozano tirpalų (gelių) įvairiais būdais gali būti formuojamos nanosferos, nanomembranos, nanodangos,

nanokapsulės, nanopluoštai. Naudojant tam tikrus medžiagų santykius, atitinkamas reakcijos sąlygas, galima gauti ir skirtingo dydžio daleles.

Kovalentiškai susiūtos chitozano nanodalelės gali būti gaunamos keliais skirtingais būdais: emulsinio susiuvimo, atvirkštinės micelizacijos, tirpiklio išgarinimo, purškiamojo džiovinimo arba terminio susiuvimo [115]. Žinomiausias ir dažniausiai naudojamas būdas – *tirpiklio išgarinimas*, nes jis lengvai atliekamas. Be to, šiuo būdu galima kapsuliuoti įvairius gamtinius lipofilinius junginius [116], o taip pat ir vandenyje tirpius vaistus, pvz., peptidus, baltymus [117]. Chitozano atveju, tirpiklio išgarinimo būdas remiasi polimero vandeninio tirpalo emulgavimu organinėje fazėje ir tolimesniu vandeninio tirpalo išgarinimu [115,118]. Proceso metu polimeras nusėda nanodalelių, kurių skersmuo keli šimtai nanometrų, pavidalu [117]. Esant didelei polimero koncentracijai, gauti mažesnes nei 100 nm daleles labai sudėtinga.

Purškiamasis džiovinimas – tirpiklio išgarinimas išpurškiant tirpalą – plačiai naudojamas chemijos, maisto ir farmacijos pramonėje [119]. Purškiamasis džiovinimas gali būti naudojamas hidrofilinių ir hidrofobinių polimerų, vandenyje tirpių arba netirpių, temperatūrai jautrių arba atsparių vaistų mikro- ar nanosistemų sudarymui. Tuo tikslu chitozanas ištirpinamas vandeniniame acto rūgšties tirpale ir gautame tirpale disperguojamas ar ištirpinamas vaistas bei įdedamas atitinkamas susiuvantis agentas [120]. Paruoštas tirpalas ar dispersija išpurškiama mažų lašelių pavidalu, iš kurių karšto oro srove išgarinus tirpiklį susidaro dalelės. Dalelių dydis priklauso nuo purkštuko akučių dydžio, purškimo greičio, slėgio, temperatūros ir susiuvimo laipsnio.

Emulsinio susiuvimo būdu aktyvios chitozano funkcinės grupės susiuvamos susiuvančiais agentais, turinčiais mažiausiai dvi reaktingas grupes, pvz., aldehidais, epoksidais, cianatais ir kt. [115,120]. Šiam procesui paruošiama vandeninio chitozano tirpalo emulsija aliejinėje fazėje; joje vandeninio chitozano tirpalo lašeliai stabilizuojami naudojant tam tikrą paviršinio aktyvumo medžiagą. Chitozanas lašeliuose susiuvamas atitinkamu

susiuvančiu agentu, pvz., glutaro aldehidu. Šiuo būdu gaunamų dalelių dydį lemia chitozano vandeninio tirpalo lašelių dydis. Kaip jau buvo minėta, susiuvimui plačiai naudojamas glutaro aldehidas [115]. Deja, glutaro aldehidas yra kenksmingas ląstelėms, o tai riboja jo pritaikymą vaistų pernašos agentams gauti.

Polimerines nanodaleles, mažai besiskiriančias savo dydžiu, galima gauti *atvirkštinės micelizacijos* būdu. Atvirkštinio micelinio lašelio branduolys gali būti naudojamas kaip „nanoreaktorius“ tokioms dalelėms gauti. Atvirkštinės micelės gaunamos, organiniame tirpiklyje ištirpinus paviršinio aktyvumo medžiagą. Į gautą mišinį pridedama vandeninio chitozano-vaistų tirpalo, po to susiuvančio agento. Pasibaigus tinklinimo procesui, organinis tirpiklis išgarinamas, produktas gryninamas ir gaunamos vaistais „įkrautos“ nanodalelės.

Polisacharido grandines per aminogrupes kovalentiškai sujungiant natūralios kilmės dikarboksirūgštimis (obuolių (hidroksibutano), gintaro (butano), vyno (2,3-dihidroksibutano)) arba trikarboksirūgštimis (citrinų (2-hidroksi-1,2,3-propantrikarboksi-)) [115,121,122], esant tinkamai reagentų stochiometrijai, gaunamos hidrofilinės chitozano nanodalelės. Reakcija tarp rūgščių karboksigrupių ir chitozano aminograpių paprastai katalizuojama vandenyje tirpiaais karbodiimidais, pvz., *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilkarbodiimido metiljodidu. Priklausomai nuo naudojamos rūgšties kiekio, galima gauti polikatijonines, polianijonines bei poliamfolitines nanodaleles [115]. Chitozaną modifikuojant esant jo pertekliui, gaunamos polikatijoninės nanodalelės. Šiuo atveju karboksigrupės kovalentiškai prisijungia prie aminograpių, ir dar lieka nesureagavusių aminograpių, kurios rūgštinėje terpėje gali protonizuotis. Chitozaną modifikuojant citrinų rūgštimi, galima gauti poliamfolitines arba polianijonines nanodaleles. Esant trikarboksirūgšties pertekliui, lieka laisvų karboksigrapių, kurios neutralioje ar šarminėje terpėje nanodalelėms suteikia neigiamą krūvį.

Lyginant su kovalentiniu susiuvimu, **joninis susiuvimas** turi daug pranašumų: švelnios sąlygos, paprasta procedūra. Joninis susiuvimas remiasi

tu, kad krūvį turintys jonai formuoja tiltelį tarp polimerinių grandinių, dažnai susidarant hidrogeliams [115]. Mažos molekulinės masės polianijonais ar polikatijonais galima susiūti polikatijoninius ar polianijoninius polisacharidus. Plačiai naudojamas susiuvantis agentas yra natrio tripolifosfatas (NaTPF) [123-125]. Dėl joninės sąveikos tarp teigiamą krūvį turinčių chitozono aminogrupių ir neigiamą krūvį turinčių tripolifosfato polianijonų susidaro gelis. Ruošiant chitozono daleles joninio tinklinimo būdu, chitozanas ištirpinamas vandeniniame acto rūgšties tirpale, taip susidarant chitozono polikatijonams. Gautą tirpalą lašinant į NaTPF tirpalą, susidaro sferinės chitozono nanodalelės.

Nanodalelėms gauti joninio susiuvimo būdu plačiai naudojami vandenyje tirpūs chitozono dariniai. Lyginant su pradiniu chitozanu, šie dariniai lengvai tirpsta neutralioje vandeninėje terpėje, todėl nereikia naudoti rūgšties, kuri tam tikrais atvejais gali būti nepageidaujama.

ND gauti naudojami ir chitozono dariniai, turintys tiolinių grupių [126-128]. Chitozanui reaguojant su tioglikoline rūgštimi, reakciją katalizuojant vandenyje tirpiu karbodiimidu, gaunamas tiolintas chitozanas. Siuvančiu agentu naudojant NaTPF, joninio susiuvimo būdu gaunamos 220 ± 23 nm skersmens tiolinto chitozono ND. Tiogrupes turinčios chitozono nanodalelės taip pat naudojamos vaistų pernašai ar reguliuoti atpalaidavimui. Pvz., tokios dalelės palengvina tiofilino – vaisto, skirto alerginės astmos gydymui – dozavimą, padidina vaisto adsorbciją prie bronchų epitelio, stiprina priešuždegiminį vaisto efektą [126].

Dėl tarpmolekulinių elektrostatiinių sąveikų polielektrolitiniai polisacharidai su priešingą krūvį turinčiais polimerais gali sudaryti **polielektrolitinius kompleksus** (PEK). Chitozanas yra vienintelis polikatijoninis polisacharidas, galintis sudaryti PEK nanodaleles su daugeliu įvairių neigiamą krūvį turinčių polimerų (polisacharidais, peptidais, poli(met)akrilo rūgštimi ir kt.) [113]. PEK ND su chitozanu dažniausiai sudaromos su karboksimetilceliulioze, dekstrano sulfatu, natrio alginatu, gliukomananu, heparinu. Priklausomai nuo pradinių tirpalų pH, keičiasi susidariusių ND skersmuo.

Kaip jau minėta, chitozanas gali kompleksuotis ne tik su neigiamą krūvį turinčiais polisacharidais, bet ir su neigiamą krūvį turinčiais peptidais, pvz., poli- γ -glutamato rūgštimi [129], polimetakrilo, poliakrilo rūgštimis [130] bei kitais dariniais. Daug dėmesio skiriama chitozано ar jo darinių ir DNR bei RNR PEK nanodalelėms [114,131]. Chitozано-DNR nanodalelės susidaro dėl stiprios elektrostatinės sąveikos tarp teigiamą krūvį turinčių chitozано aminogrupių ir DNR neigiamą krūvį turinčių fosfato grupių.

Nanodalelės gali susidaryti ir dėl **hidrofobiškai modifikuotų polisacharidų savaiminės agregacijos**. Prijungus hidrofobinį segmentą prie hidrofilinės polimerinės grandinės, gaunami amfifiliniai kopolimerai [113]. Po amfifilinių polimerų sąlyčio su vandenine terpe pakinta tarp- ar vidumolekuliniai ryšiai tarp hidrofobinių liekanų, ir iškart formuojasi micelės ar miceliniai agregatai, sudaryti iš hidrofobinio vidinio branduolio ir hidrofilinio išorinio apvalkalo. Polimerinės ND, turinčios „branduolio-apvalkalo“ struktūrą (*angl. core-shell*), sintetamos dviem būdais: pirmiausiai susintetinant branduolį, o paskui tam tikros struktūros apvalkalą, arba naudojant blokinius kopolimerus, linkusius į savaiminę agregaciją [132]. Blokiniai kopolimerai gali būti gaunami skirtingais būdais: anijoninės ir gyvybingosios radikalinės polimerizacijos, taip pat RAFT, ATRP metu. Polisacharidams modifikuoti naudojamos linijinės, ciklinės hidrofobinės molekulės, hidrofobiniai vaistai, poliakrilatai ir kt. [113].

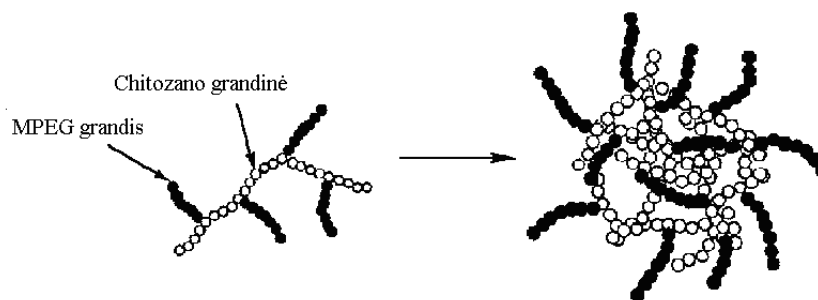
Polisacharidams modifikuoti naudojamos kai kurios ilgagrandės riebiosios rūgštys, pvz., heksano, dekanо, linoleno, linolo, palmitino, stearino, oleino [133-135]. Linolo rūgštis kovalentiškai prijungiama prie karboksimetilchitozано aminogrupių naudojant vandenyje tirpų karbodiimidą EDC [133,134]. Fluorimetriškai ištyrus tokio kopolimero agregacijos elgseną nustatyta, kad, esant krizinei agregacijos koncentracijai, t.y., mažiausiai amfifilinių polimerų koncentracijai kai jie jau agreguoja, dėl tarpmolekulinių ryšių vandeninėje terpėje kopolimeras pradeda formuoti hidrofobinius domenų. Agregacija priklauso nuo linolo rūgštimi modifikuoto

karboksimetilchitozano pakeitimo laipsnio, ir krizinė agregacijos koncentracija mažėja didinant pakeitimo laipsnį.

Poli(ϵ -kapolaktonui) (PCL) reaguojant su chitozanu, gaunami amfifiliniai kopolimerai. PCL yra netoksiškas, mechaniškai tvirtas, biosuderinamas, bioskalus pramoninis poliesteris. Šio poliesterio hidroksigrupėms, aktyvuotoms 1,1'-karbonildiimidazolu, reaguojant su 6-*O*-trifenilmetilchitozanu, susidaro amidinis tiltelis, ir gaunamas bioskalus amfifilinis chitozano-PCL skiepytasis kopolimeras [136].

Kita hidrofobinių reagentų grupė, naudojama chitozanui arba jo dariniams, pvz., vandenyje tirpiam hidroksietilchitozanui [137], modifikuoti, yra ciklinės hidrofobinės molekulės: cholesterolis [137,138], deoksicholio rūgštis [139,140], 5 β -cholano rūgštis [113] ir kt.

Atskirai reikėtų aptarti **chitozano-PEG nanodaleles**. Polietilenglikolis yra puikiai vandenyje tirpstantis polimeras ir dažnai naudojamas gamtinėms ir sintetinėms makromolekulėms chemiškai modifikuoti. Žinoma nemažai publikacijų, skirtų chitozano modifikavimui PEG ir jo dariniais, gaunant vandenyje tirpius kopolimerus, naudojamus ND sintezei. Norint garantuoti atrankų chitozano modifikavimą tik per *C*(2) padėtyje esančią aminogrupę, chitozano-PEG skiepytųjų kopolimerų ND buvo susintetintos per tarpinį junginį 6-*O*-trifenilmetilchitozaną [141,142]. Naudojant 4-nitrofenilchlorformiatą bei 4-dimetilaminopiridiną, PEG rūgštis jungiama prie 6-*O*-trifenilmetilchitozano aminogrupių, reakciją katalizuojant vandenyje tirpiaisiais karbodiimidais.



1.6 pav. Chitozano-MPEG nanodalelių susidarymas

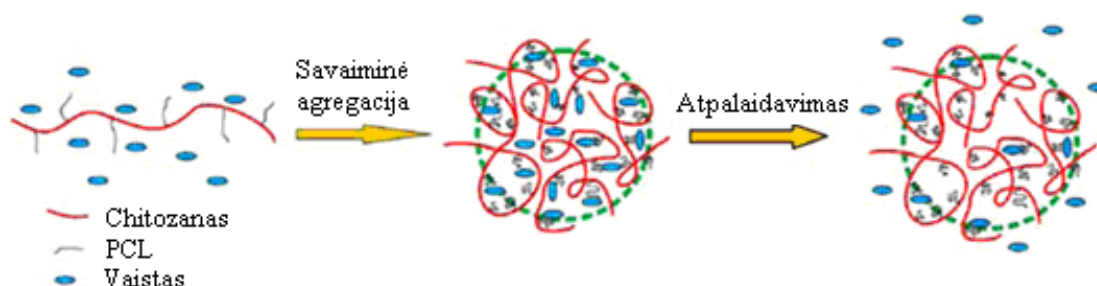
PEG-chitozano ND gaunamos susidarant vandeniliniams ryšiams tarp chitozano grandinių (1.6 pav.). Į gautas ND galima įterpti vandenyje tirpius polinius ar anijoninius substratus, pvz., baltymus ar polinukleotidus, kurie su chitozano aminogrupėmis sudaro vandenilinius ryšius, ar tarp jų pasireiškia elektrostatinė sąveika [141]. Literatūroje rasta duomenų ir apie chitozano-*O*-MPEG nanodalelių sintezę. Reguluojant chitozano grandinės hidrofiliškumą/hidrofobiškumą, gaunamos stabilios nanosferos [143]. MPEG buvo „aktyvuojamas“ gintaro rūgšties anhidridu, gaunant karboksigrupę turintį MPEG darinį, kuris jungiamas prie *N*-ftaloilchitozano, reakciją katalizuojant karbodiimidu. Nustatyta, kad dalelių dydis priklauso ir nuo sintezei naudojamą MPEG molekulinės masės. Kopolimerai, savo sudėtyje turintys MPEG, kurio molekulinė masė 550, vandenyje sudaro 400-500 nm dydžio nanosferas, o tuo tarpu kopolimerai su MPEG-5000 – 80-100 nm skersmens daleles [143].

PEG dikarboksirūgštimi kovalentiškai susiūto chitozano ND yra tirpios arba sudaro patvarias koloidines sistemas vandeninėje rūgštinėje ir neutralioje terpėje [144]. Naudojant skirtingą susiuvančio agento PEG dikarboksirūgšties kiekį, taip pat gaunami polikatijonai arba neutralios susiūtos ND. Jei susiuvimo laipsnis nedidelis, likusios laisvos chitozano aminogrupės rūgštinėje terpėje gali protonizuotis ir sudaryti polikatijonus. Jei visos aminogrupės su karboksigrupėmis sudaro kovalentinius ryšius, vandeninėje terpėje gaunamos krūvio neturinčios ND. Gauti produktai plačiai taikomi biomedicinoje kaip priešvėžinių ir kitų vaistų nešikliai, odos audinių inžinerijoje. Dalelių paviršiuje esant PEG, pailgėja kraujyje cirkuliuojančio nešiklio pusėjimo trukmė. Savaiminės agregacijos būdu gautos polimerinės micelės pasižymi unikaliomis savybėmis (neįprastos reologinės savybės, mažas hidrodinaminis spindulys, termodinaminis stabilumas), kurias lemia hidrofiliinės ir hidrofobinės sudedamosios dalys [113].

Chitozano-MPEG skiepytieji amfifiliniai kopolimerai, gauti formaldehido pagalba MPEG prijungiant prie chitozano grandinės, dializės metu formuoja savaiminės agregacijos ND [145]. Chitozano-MPEG kopolimerų savaiminei agregacijai vandeninėje terpėje daugiausiai įtakos turi

tarpmolekuliniai vandeniliniai ryšiai tarp -NH-CO- ir -OH grupių kopolimero makromolekulėje. Taip pat įtakos turi ir hidrofobinė sąveika tarp kopolimero hidrofobinės liekanos, pvz., -CH₂CH₂-, acetilgrupės ir gliukopiranozės žiedo. PEG'inimas ne tik pagerina chitozano tirpumą, bet ir leidžia sumažinti kai kuriuos nepageidaujamus efektus, pvz., sumažina citotoksiškumą audiniams, suteikia atsparumą daugeliui vaistų, tokie dariniai tampa tinkami priešvėžinių vaistų pernašai [145].

N-ftaloilchitozano-poli(ε-kaprolaktono) kopolimeras pasižymi unikaliomis savybėmis, dideliu hidrofobinių vaistų, pvz., indometacino, kapsuliavimo efektyvumu (daugiau nei 26 %) [146]. Į šias savaiminės agregacijos būdu gautas daleles įkapsulius indometaciną, vaisto veiklioji medžiaga išlaisvinama po truputį (91,7 % vaisto atpalaiduojama per 22 val.) (1.7 pav.). Tokiu būdu veikimo laikas prailginamas ir vaisto nebereikia vartoti dažniais intervalais.



1.7 pav. Vaistų įkapsuliavimo ir atpalaidavimo schema [146]

Chitozano nanodalelės gali būti naudojamos kaip vaistų, polipeptidų, baltymų, vakcinų, nukleorūgščių ar genų pernašos sistemos, medikamentų sudedamųjų dalių priedai ir detergentai [147,148]. Susidomėjimas ND išaugo, nes nesunkiai galima reguliuoti jų dydį, formą, jos jau nėra labai brangios. Būdamos ypatingai mažos, gali prasiskverbti pro gyvų organizmų ląstelių sienelės. Priklausomai nuo dydžio, dalelės, įvestos injekcijos būdu, gali pakankamai ilgai cirkuliuoti kraujyje ir prailginti terapinį įnešamų vaistų efektą [111]. Jos didina bioaktyvių junginių, baltymų stabilumą, gali būti naudojamos vėžiniams susirgimams gydyti.

1.3.2. Katijonizuoto chitozano nanodalelės ir nanopluoštai

Yra nemažai informacijos ir apie katijonizuotų chitozano darinių panaudojimą nanopluoščių bei nanodalelių sintezei [102,149].

N-[(2-hidroksi-3-trimetilamonio)propil] chitozano chloridą (*N*-KChz) jungiant su natrio tripolifosfatu (NaTPF) joninio susiuvimo metodu, gaunamos 110-180 nm skersmens nanodalelės (ND) [149]. ND susidaro naudojant tik tam tikrų koncentracijų *N*-KChz ir NaTPF tirpalus. Priešingu atveju gaunamas tirpalas arba agregatai. Gautos *N*-KChz nanodalelės modifikuojamos PEG ar Na alginatu ir į jas kapsuliuojamas jaučio serumo albuminas. ND modifikavimas Na alginatu skatina įkapsuliavimą, didina kapsulių stabilumą, tuo tarpu modifikuojant su PEG gaunamas priešingas rezultatas [149].

Maišant *N*-katijonizuoto chitozano (*N*-KChz) ir PEG tirpalus, esant nedideliame kiekiui α - β -glicerolfosfato (α - β -GF), gaunamas termojautrus hidrogelis [90]. *O*-[(2-hidroksi-3-trimetilamonio)propil] chitozano chloridas (*O*-KChz) su NaTPF taip pat sudaro nanodaleles. Nustatyta, kad *O*-KChz formuoja didesnes ND: esant toms pačioms sąlygoms (NaTPF 2,0 mg/ml), *O*-KChz ND dydis yra apie 250 nm, o tuo tarpu gryno chitozano ND – apie 50-80 nm [102]. Dalelių dydis priklauso nuo NaTPF koncentracijos – mažėjant NaTPF koncentracijai, *O*-KChz dalelių dydis didėja. *O*-KChz nanodalelių susidarymo procese pasireiškia kelių tipų joninės sąveikos, iš kurių galima išskirti elektrostatinę sąveiką tarp protonizuotų chitozano amino grupių ir fosfato anijonų ir atostūmio jėgas tarp $-N^+(CH_3)_3$ grupių. Kai NaTPF koncentracija maža, $-N^+(CH_3)_3$ atostūmio jėgos yra stipresnės, todėl šiomis sąlygomis *O*-KChz ND struktūra laisvesnė ir dalelės yra didesnės, negu esant didesnei NaTPF koncentracijai [102].

Radikalinės polimerizacijos metu susintetintą chitozano-*N*-trimetilaminoetilmetakrilato chloridą veikiant PEG rūgštimi gaunamas kopolimeras, kuriame yra 44 % katijoninių grandžių ir apie 34 % PEG grandžių [150]. Joninio susiuvimo metu toks katijoninis kopolimeras sąveikauja su neigiamą krūvį turinčiu insulinu, susiformuojant nanodalelėms.

Kopolimero sudėtyje esantis PEG sumažina sąveiką tarp katijoninių polimerų ir insulino ląstelių membranų ir tokiu būdu apsaugo ląsteles nuo irimo.

J. Wu ir kt. [106] paruošė vienodo dydžio pH-jautrias katijonizuoto chitozano mikrosferas, kurios gali surasti tikslią „taikinio“ vietą ir padidinti naudojamų vaistų biopoveikį. Gautas *N*-katijonizuoto chitozano-polietilenglikolio-glicerolfosfato konjugatas yra tinkamas nosies vaistų pernašos sistemoms, ir naudojamas ypač įsisenėjusioms ligoms gydyti [90].

Vienas iš dažniausiai naudojamų būdų polimeriniams nanopluoštams gauti yra elektroverpimas [151,152]. Elektroverpimui naudojama aparatūra susideda iš aukštos įtampos elektros šaltinio, siurblio, graduoto švirkšto su kapiliaru ar vamzdeliu, per kurį iš švirkšto iššvirkščiamas tirpalas, ir laidaus, pvz., aliumininio, rinkiklio. Aukštos įtampos elektros lauku sudaromas elektros krūvį turintis polimero tirpalo ar lydalo srautas. Džiovinant gautą srautą, t.y., išgarinant tirpiklį, gaunamas nanopluoštas. Stipriai įkrautas pluoštas nukreipiamas į teigiamą krūvį turintį rinkiklį, kuriame jis surenkamas. Rinkiklis gali būti plokščios ar cilindrinės formos. Parinkus reikiamą polimerų ir tirpiklių sistemą, galima suformuoti 40-2000 nm storio nanopluoštą [152].

Elektroverpiamo pluošto morfologija ir skersmuo priklauso nuo šių parametrų: polimero cheminės sudėties, polimerinės grandinės konformacijos, tirpalo koncentracijos ir klamos, tirpiklio savitojo laidžio, poliškumo, paviršiaus įtempių. Pluošto savybės taip pat priklauso ir nuo elektroverpimo sąlygų: elektrinio lauko stiprio, atstumo tarp kapiliarų ir rinkiklių, tirpalo tiekimo greičio [153]. Geros kokybės ir vienodo storio pluoštas gaunamas naudojant chitozano tirpalus, kurių klampa 4,8-5,9 P. Tokia klampa pasižymi 106000 g/mol molekulinės masės 7-7,5 % chitozano tirpalai [154].

Nanopluoštai iš jonogeninių polimerų elektroverpimo būdu sėkmingai gaunami ir maišant jonogeninių ir nejonogeninių polimerų tirpalus. Tokiu būdu, naudojant katijonizuotą chitozaną (jonogeninis polimeras) ir polivinilalkoholį ar polivinilpirolidoną [153] (nejonogeniniai polimerai), gaunami nanopluoštiniai audiniai. Vidutinis pluošto, gauto elektroverpiant katijonizuoto chitozano ir polivinilalkoholio mišinį, skersmuo yra 60-200 nm,

tuo tarpu katijonizuoto chitozano – polivinilpirolidono atveju pluošto skersmuo yra 1530-2800 nm. KChz-polivinilalkoholio nanopluošto gijos dar paprastai turi susiuvančio agento trietilenglikolio diakrilato ir fotoiniciatoriaus, kuris švitinant UV spinduliais sudaro skersinius ryšius ir stabilizuoja pluoštą, padarant jį atspariu vandens ir vandens garų poveikiui [153].

Vienas iš svarbiausių polimerų nanopluoštų sudarymui yra poliakrilnitrilas (PAN), kuris dažnai pasirenkamas dėl savo tvirtumo, atsparumo nusidėvimui bei kenkėjams. PAN – *N*-(2-hidroksi)-propil-3-trimetilamonio chitozano chlorido pluoštas buvo gautas šlapiuoju verpimo būdu, tirpikliu naudojant vandeninį NaSCN tirpalą [98]. Pluoštas pasižymėjo geromis šiluminėmis, antistatinėmis, mechaninėmis savybėmis ir antibakteriniu aktyvumu.

Kaip jau minėta, susintetintas *N*-[(2-hidroksi-3-trimetilamonio)propil] chitozano chloridas (*N*-KChz) gali būti panaudotas nanodalelėms ar nanopluoštui gauti. Prie KChz prijungiant reaktingų grupių ir per jas sujungiant tam tikrą kiekį makromolekulių, padidinamas chitozano pluošto atsparumas plovimui. Tokios grupės gali būti įterpiamos su *N*-metilolakrilamidu (NMA). NMA ($\text{CH}_2=\text{CHCONHCH}_2\text{OH}$) yra dvi reaktingos grupės: *N*-metilolgrupė ir prie karbonilgrupės esantis dvigubasis ryšys. Jis dažnai naudojamas skersiniams ryšiams tarp celiuliozės makromolekulių sudaryti. Rūgštinėje terpėje jungiant NMA prie *N*-KChz, rūgštinio katalizatoriaus protonas perduodamas NMA hidroksigrūpei. Amonio chloridas naudojamas kaip rūgštinis katalizatorius, kuriam reaguojant su vandeniu susidaro HCl, galinti protonizuoti KChz antrinę aminogrupę ir neleisti jai elgtis kaip nukleofilui. Tokiu būdu, reakcija tarp NMA ir KChz C(6) hidroksigrupės yra dominuojanti. NMA modifikuotame KChz yra reaktingų dvigubųjų ryšių, reaguojančių su hidroksigrūpėmis šarminėje terpėje [155]. NMA-KChz dariniu padengus medvilninį pluoštą, jis naudojamas antimikrobiniam audiniui gauti. NMA-KChz taip pat gali būti naudojamas kaip medvilnės dažymą gerinantis agentas, tačiau NMA-KChz modifikuotas medvilninis audinys po dažymo praranda antimikrobinį aktyvumą.

1.4. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Siekiant praplėsti chitozano panaudojimo galimybes bei pagerinti savybes, atliekamas jo fizikinis, cheminis, fermentinis, genetinis, biocheminis modifikavimas. Daug dėmesio skiriama chitozano-polietilenglikolio kopolimerų sintezei. Susidomėjimas chitozano-MPEG skiepytaisiais kopolimerais susijęs su jų galimu panaudojimu prailginto veikimo vaistų gamyboje, biomedicinoje, genų inžinerijoje ir kitose srityse. Akivaizdžiai gero metodo chitozano-MPEG darinių sintezei nėra, nes kopolimerų gryninimas nuo nsureagavusio MPEG vis dar išlieka rimta problema. Siekiant sumažinti nsureagavusių pradinių medžiagų ir šalutinių produktų kiekį, kaip alternatyva chitozano-MPEG kopolimerų sintezei dažnai naudojamais redukciniu alkilimo ar karbodiimidiniu metodais galėtų būti panaudota „klik“ chemijos reakcija. Publikacijų, skirtų chitozano „klikinimui“, yra labai nedaug, o informacijos apie chitozano PEG'inimą „klik“ chemijos būdu išvis nerasta.

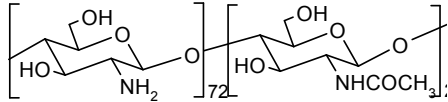
Prie chitozano prijungus katijoninių ketvirtinių amonio grupių turinčių pakaitų, jis įgauna nebūdingas gamtiniams polisacharidams savybes. Šie *N*-pakeisti chitozano dariniai yra tirpūs vandenyje, pasižymi antimikrobiniu, antivirusiniu aktyvumu ir kompleksuojančiomis savybėmis. Nors chitozano *N*-katijonizavimui skirta daug darbų, tačiau apie katijonizavimą per hidroksigrupę informacijos beveik nėra. Mūsų žiniomis, yra tik viena publikacija [102], kurioje aprašytas chitozano *O*-katijonizavimas naudojant tarpinį junginį *N*-benzilidenchitozaną. Chitozano dariniai, turintys PEG grandines ir katijonines grupes, yra labai perspektyvūs, nes jie paprastai tirpūs vandenyje ir, be to, pasižymi antimikrobiniu aktyvumu. Deja, duomenų apie chitozano-MPEG kopolimerų katijonizavimą nerasta.

Yra visa eilė publikacijų, kuriose aptariamos chitozano nanodalelių susidarymo sąlygos ir tokių nanodarinių savybės. Duomenų apie chitozano nanodalelių panaudojimą RAFT polimerizacijai inicijuoti kol kas nėra. Chitozano nanodalelės, prie jų prijungus RAFT grandinės perdavos agentus, galėtų tapti makroiniciatoriais norimo polimero sluoksniu „aprengtoms“ nanodalelėms gauti.

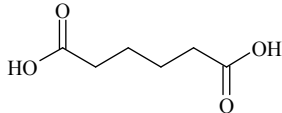
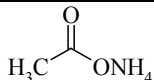
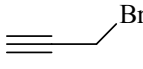
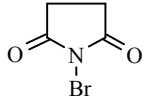
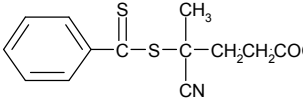
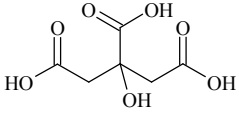
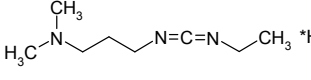
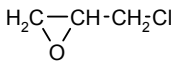
2. DARBO METODIKA

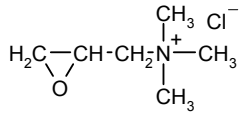
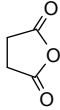
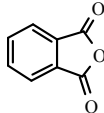
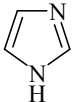
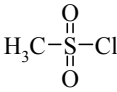
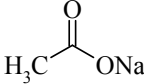
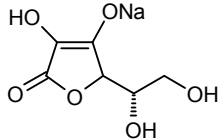
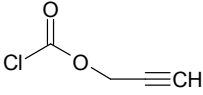
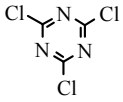
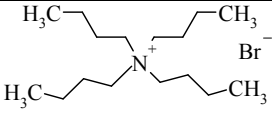
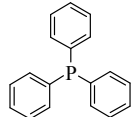
2.1. Naudotos medžiagos ir reagentai

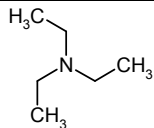
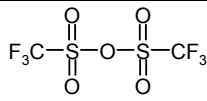
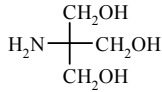
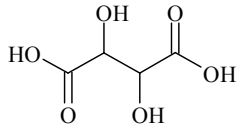
2.1.1. Polimerai ir oligomerai, naudoti kopolimerų sintezėje

Pavadinimas	Savybės	Formulė
Chitozanas, <i>Fluka</i> arba <i>Aldrich</i>	M_w 400 000; DL 0,72; $[\eta]=8,42$; drėgmė 10 %	
Metoksimoli- etilenglikolis, MPEG, <i>Fluka</i>	M_r 2000 (n=45); $T_{lyd.}$ 52-56 °C	$CH_3-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$
Polivinilalkoholis, <i>Aldrich</i>	M_w 146 000-186 000; hidrol. laipsn. 87-89 %; 4 % tirp. H ₂ O dinam. kl. 40-50 cP (20 °C)	$[-CH_2CHOH-]_n$

2.1.2. Organinės medžiagos

Pavadinimas	Savybės	Formulė
Adipo rūgštis, heksano dirūgštis, <i>Aldrich</i>	M_r 146,14; $T_{lyd.}$ 151- 154 °C	
Amonio acetatas, <i>Fluka</i>	M_r 77,08; $T_{lyd.}$ 110- 112 °	
3-Bromo-1-propinas, propargilbromidas, <i>Sigma- Aldrich</i>	M_r 118,96; d_4^{25} 1,335 g/ml	
<i>N</i> -Bromosukcinimidas, <i>Fluka</i> , perkristalinamas iš vandens	M_r 177,98; $T_{lyd.}$ 175- 180 °C	
(4-Cianpentano rūgšties)-4- ditiobenzenkarboksilatas, CPAD, <i>susintetintas VU PChK</i>	M_r 279,38	
Citrinų rūgštis, 2-hidroksi- 1,2,3-propantrikarboksirūgštis, <i>Standard</i>	M_r 192,12; $T_{lyd.}$ 153- 159 °C	
<i>N</i> -(3-Dimetilaminopropil)- <i>N'</i> - etilkarbodiimido hidrochloridas, EDC, <i>Aldrich</i>	M_r 191,7; $T_{lyd.}$ 113- 115 °C	
1-Chlor-2,3-epoksiopropanas, epichlorhidrinas, <i>Aldrich</i>	M_r 92,52; d_4^{25} 1,183 g/ml	

<i>N</i> -2,3-epoksipropil- <i>N,N,N</i> -trimetilamonio chloridas, EPTMAC, <i>Aldrich</i>	M_r 151,63; d_4^{20} 1,13 g/ml	
Butano dirūgšties anhidridas, gintaro rūgšties anhidridas, <i>Reachim</i>	M_r 100,07; $T_{lyd.}$ 118-120 °C	
Ftalio rūgšties anhidridas, 1,3-izobenzofurandionas, <i>Fluka</i>	M_r 148,12; $T_{lyd.}$ 131-134 °C	
Hidrazino monohidratas, <i>Fluka</i>	M_r 50,06; $T_{vir.}$ 118-122 °C; n_D^{20} 1,430; d_4^{20} 1,030 g/ml	$NH_2NH_2 \cdot H_2O$
Imidazolas, <i>Sigma</i>	M_r 68,08; $T_{vir.}$ 256 °C; d_4^{25} 1,23 g/ml	
4-Metilbenzensulfonilchloridas, tozilchloridas, <i>Fluka</i>	M_r 190,65; $T_{lyd.}$ 66-69 °C	$Cl-SO_2-C_6H_4-CH_3$
Metansulfonilchloridas, mezilchloridas, <i>Aldrich</i>	M_r 114,56; $T_{vir.}$ 161 °C; n_D^{20} 1,452; d_4^{20} 1,480 g/mL	
Natrio acetatas, <i>Reachim</i>	M_r 82,03	
Natrio dodecilsulfatas, <i>Aldrich</i>	M_r 288,38	$CH_3(CH_2)_{10}CH_2O-SO_3^- Na^+$
Natrio L-askorbatas, <i>Sigma-Aldrich</i>	M_r 198,11	
Propargilchlorformiatas, <i>Aldrich</i>	M_r 118,52; $T_{vir.}$ 118-122 °C; n_D^{20} 1,435; d_4^{25} 1,215 g/mL	
2,4,6-Trichloro- <i>s</i> -triazinas, <i>Aldrich</i> , perkristalintas iš heksano	M_r 184,41; $T_{vir.}$ 190 °C	
Tetrabutilamonio bromidas, <i>Reachim</i>	M_r 322,38	
Trifenilfosfinas, <i>Sigma-Aldrich</i>	M_r 262,29	


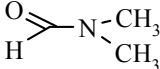
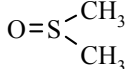

Trietilaminas, <i>Fluka</i>	M_r 101,19; $T_{vir.}$ 88,8 °C; n_D^{20} 1,401; d_4^{25} 0,726 g/ml;	
Trifluormetansulfonil-anhidridas, <i>Sigma-Aldrich</i>	M_r 282,14; d_4^{25} 1,677 g/ml	
Trishidroksimetilamino-metanas, TRIS, <i>Fluka</i>	M_r 157,60	
Vyno rūgštis, 2,3-dihidroksibutano dirūgštis, <i>Reachim</i>	M_r 150,09; $T_{lyd.}$ 172-174 °C	

2.1.3. Neorganinės medžiagos

Pavadinimas	Savybės	Formulė
Cinko chloridas, <i>Reachim</i>	M_r 136,32	ZnCl ₂
Ličio chloridas, <i>Fluka</i>	M_r 42,39	LiCl
Magnio sulfatas, <i>Sigma-Aldrich</i>	M_r 120,41	MgSO ₄
Natrio chloridas, <i>Fluka</i>	M_r 58,44	NaCl
Natrio hidroksidas, <i>Reachim</i>	M_r 40	NaOH
Natrio karbonatas, <i>Reachim</i>	M_r 105,99	Na ₂ CO ₃
Natrio azidas, <i>Sigma-Aldrich</i>	M_r 65,01	NaN ₃
Natrio hidridas (60 % mineralinėje alyvoje), <i>Aldrich</i>	M_r 24	NaH
Natrio nitritas, <i>Sigma-Aldrich</i>	M_r 69	NaNO ₂
Natrio vandenilio karbonatas, <i>Reachim</i>	M_r 84,01	NaHCO ₃
Natrio sulfatas, <i>Sigma-Aldrich</i>	M_r 142,04	Na ₂ SO ₄
Sidabro nitratas, <i>Reachim</i>	M_r 169,87; $T_{lyd.}$ 212 °C	AgNO ₃
Sulfonilchloridas (sulfurilo chloridas), <i>Sigma-Aldrich</i>	M_r 134,96; d_4^{20} 1,667 g/ml	SO ₂ Cl ₂
Vandenilio chlorido rūgštis, 37%, <i>Reachim</i>	M_r 36,46; $T_{vir.}$ 48 °C; d_4^{20} 1,18 g/ml	HCl
Vario(II) sulfato pentahidridas, <i>Reachim</i>	M_r 249,68	CuSO ₄ ·5H ₂ O

2.1.4. Tirpikliai

Pavadinimas	Savybės	Formulė
Acetonas, <i>Penta</i>	M_r 58,08; $T_{vir.}$ 56,2 °C; n_D^{20} 1,3588; d_4^{20} 0,798 g/ml	CH ₃ COCH ₃
Acto rūgštis, <i>Reachim</i>	M_r 60,05; $T_{vir.}$ 117-118 °C; n_D^{20} 1,371; d_4^{20} 1,050 g/ml	CH ₃ COOH

Acto rūgšties chloranhidridas, <i>Reachim</i>	M_r 78,50; d_4^{20} 1,104 g/ml	<chem>CH3COCl</chem>
Amonio hidroksidas, 25 %, <i>Aldrich</i>	M_r 35,05; d_4^{25} 1,049 g/ml	<chem>NH4OH</chem>
Acetonitrilas, <i>Aldrich</i>	M_r 41,05; n_D^{20} 1,344; d_4^{25} 0,786 g/ml	<chem>CH3CN</chem>
Chloroformas, <i>Aldrich</i>	M_r 119,37; $T_{vir.}$ 61 °C; n_D^{20} 1,4460; d_4^{20} 1,492 g/ml	<chem>CHCl3</chem>
Etanolis, <i>Kemetyl</i> , 96%	M_r 46,07; $T_{vir.}$ 78 °C; n_D^{20} 1,36; d_4^{25} 0,789g/ml	<chem>C2H5OH</chem>
Etilacetatas, <i>Reachim</i>	M_r 88,11; $T_{vir.}$ 76,5-77,5 °C; n_D^{20} 1,372; d_4^{25} 0,902 g/ml	<chem>CH3COOC2H5</chem>
Dietileteris, <i>Penta</i>	M_r 74,12; $T_{vir.}$ 34,6 °C; n_D^{20} 1,353; d_4^{25} 0,706 g/ml	<chem>(CH3CH2)2O</chem>
1,4-Dioksanas, <i>Aldrich</i>	M_r 88,11; $T_{vir.}$ 100-102 °C; n_D^{20} 1,422; d_4^{25} 1,034 g/ml	<chem>C4H8O2</chem>
<i>N,N</i> -Dimetilacetamidas, DMA, <i>Fluka</i>	M_r 87,12; $T_{vir.}$ 165-167 °C; n_D^{20} 1,437; d_4^{20} 0,942 g/ml	
<i>N,N</i> -Dimetilformamidas, DMF, <i>Aldrich</i>	M_r 73,09; $T_{vir.}$ 180-184 °C; n_D^{20} 1,430; d_4^{20} 0,944 g/ml	
Dimetilsulfoksidas, DMSO, <i>Aldrich</i>	M_r 78,13; $T_{vir.}$ 189 °C; n_D^{20} 1,479; d_4^{20} 1,100 g/ml	
Metileno chloridas, <i>Aldrich</i>	M_r 84,93; $T_{vir.}$ 39,8-40 °C; n_D^{20} 1,424; d_4^{25} 1,325 g/ml	<chem>CH2Cl2</chem>
Metanolis, <i>Penta</i>	M_r 32,04; $T_{vir.}$ 64,5 °C; n_D^{20} 1,33; d_4^{20} 0,792 g/ml	<chem>CH3OH</chem>
Piridinas, Py, <i>Fluka</i>	M_r 79,10; $T_{vir.}$ 115 °C; n_D^{20} 1,509; d_4^{25} 0,978 g/ml	
2-Propanolis, <i>i</i> -PrOH, <i>Penta</i>	M_r 60,10; $T_{vir.}$ 82 °C; n_D^{20} 1,377; d_4^{25} 0,785 g/ml	<chem>(CH3)2CHOH</chem>
Tetrahidrofuranas, <i>Aldrich</i>	M_r 72,11; $T_{vir.}$ 65-67 °C; n_D^{20} 1,407; d_4^{25} 0,889 g/ml	<chem>C4H8O</chem>
Toluenas, <i>Fluka</i>	M_r 92,14; $T_{vir.}$ 110,6 °C; n_D^{20} 1,496; d_4^{25} 0,865 g/ml	<chem>C6H5CH3</chem>

2.1.5 Fermentai

Pavadinimas/šaltinis	Savybės
Celulazė iš <i>Trichoderma reesei</i> , 1,4-(1,3:1,4)- β -D-gliukan 4- gliukano hidrolazė	T_{opt} 37 °C, pH_{opt} 5,0-5,5, aktyvumas ≥ 1 V/mg
Pektinazė iš <i>Aspergillus niger</i>	T_{opt} 47 °C, pH_{opt} 3,0, aktyvumas. 0,65 V/mg

2.2. Sintezių metodikos

2.2.1. Metoksi polietilenglikolio „aktyvavimas“

2.2.1.1. Metoksi polietilenglikolio alkino sintezė

5 g (2,5 mmol) MPEG ištirpinama 20 ml metileno chlorido ir į gaurą tirpalą maišant 0 °C temperatūroje suberiama 0,15 g NaH (60 % suspensija mineralinėje alyvoje, 6,25 mmol). Mišinys 30 min. maišomas magnetine maišykle, tada lėtai sulašinama 0,4 ml propargilbromido (80 % tirpalas toluene, 2,75 mmol). Reakcija vykdoma 2 val. 0 °C temperatūroje ir dar 22 val. kambario temperatūroje, maišant magnetine maišykle. Reakcijai pasibaigus, įpilama 75 ml distiliuoto vandens ir produktas išskiriamas ekstrahuojant metileno chloridu. Metileno chlorido ekstraktas koncentruojamas, likutis tirpinamas 20 ml benzeno ir produktas išsodinamas į 200 ml dietileterio. Produktas nufiltruojamas, kelis kartus plaunamas dietileteriu ir džiovinamas vakuuminėje krosnyje kambario temperatūroje. Gauta 4,6 g (išeiga 80 %).

2.2.1.2. Metansulfonilmetoksi polietilenglikolio sintezė

2 g (1 mmol) MPEG ištirpinama 10 ml piridino, gautas tirpalas atšaldomas ledo vonioje iki 0 °C temperatūros ir į jį, intensyviai maišant magnetine maišykle, sulašinama 0,2 ml (2,5 mmol) metansulfonilchlorido, ištirpinto 15 ml metileno chlorido. Reakcijos mišinys šildomas iki kambario temperatūros ir maišomas 18 val. Pasibaigus reakcijai, mišinys koncentruojamas rotaciniu garintuvu iki 30 % pradinio tūrio, liekana plaunama sočiu NaHCO₃ tirpalu ir ekstrahuojama metileno chloridu. Organinis sluoksnis džiovinamas Na₂SO₄, produktas išsodinamas į dietileterį, filtruojamas, plaunamas dietileteriu ir džiovinamas. Išeiga 1,76 g (85 %).

2.2.1.3. Metoksi polietilenglikolio azido sintezė

1,5 g (0,65 mmol) *O*-metansulfonilmetoksi polietilenglikolio ištirpinama 10 ml DMF. Į gautą tirpalą suberiama 0,11 g (1,6 mmol) natrio azido. Reakcija vykdoma 4 val. 105 °C temperatūroje ir dar 18 val. kambario temperatūroje inertinėje atmosferoje maišant magnetine maišykle. Reakcijos mišinys

koncentruojamas rotaciniu garintuvu, liekana tirpinama 20 ml benzeno. Produktas išsodinamas į dietileterį (200 ml), filtruojamas, kelis kartus plaunamas dietileteriu ir džiovinamas ore. Išeiga 1,13 g (56 %).

2.2.1.4. Metoksipolietilenglikolio sukcinato sintezė

15 g (7,5 mmol) MPEG ištirpinama 80 ml 1,4-dioksano. Į gautą tirpalą suberiama 2,25 g (22,5 mmol) gintaro rūgšties anhidrido ir įpilama 4,1 ml piridino (apie 5 % v/v). Reakcija vykdoma azoto atmosferoje 70 °C temperatūroje 72 val. maišant magnetine maišykle. Reakcijos produktas išsodinamas į didelį kiekį dietileterio, filtruojamas, ištirpinamas metileno chloride ir persodinamas į dietileterį, taip kartojant 3 kartus. Gautas produktas džiovinamas 40 °C temperatūroje. Išeiga 11,4 g (73%).

2.2.2. Chitozano aminograpių apsauga

2.2.2.1. N-ftaloilchitozano sintezė [156]

12,9 g (87 mmol) ftalio rūgšties anhidrido ištirpinama 110 ml sauso DMF. Į gautą tirpalą suberiama 5 g (29 mmol) chitozano. Reakcija vykdoma 120-130 °C temperatūroje inertinėje atmosferoje maišant mechanine maišykle 6-7 val. Tada tirpalas filtruojamas, filtratas pilamas į ledinį vandenį. Iškritusios nuosėdos nufiltruojamos, ekstrahuojamos etanoliu Soksleto aparate ir džiovinamos ore. Išeiga 7,95 g (99,6 %).

2.2.2.2. Chitozano/dodecilsulfato kompleksu ruošimas [157]

3 g (17 mmol) chitozano ir 4,9 g (17 mmol) natrio dodecilsulfato ištirpinama atitinkamai 200 ml ir 70 ml 2 % CH₃COOH. Natrio dodecilsulfato tirpalas lėtai supilamas į intensyviai maišomą chitozano tirpalą, ir gautas mišinys kambario temperatūroje lėtai maišomas 2 val. Gautos nuosėdos (chitozano/dodecilsulfato kompleksas, CDK) filtruojamos, kelis kartus praplaunamos distiliuotu vandeniu ir džiovinamos vakuuminėje krosnyje kambario temperatūroje. Išeiga 6,2 g (98 %).

2.2.3. Chitozano C(6) hidroksigrupės „aktyvavimas“

2.2.3.1. N-ftaloilchitozano C(6)-tozilinimas

0,5 g (1,88 mmol) *N*-ftaloilchitozano ištirpinama 50 ml DMA, gautas tirpalas atšaldomas iki 4-8 °C temperatūros ir į jį lėtai sulašinama 9,5 ml (68 mol) trietilamino bei 3,6 g (18,8 mmol) 4-metilbensulfonilchlorido, ištirpinto 20 ml DMA. Reakcija vykdoma 8 °C temperatūroje maišant magnetine maišykle 12 val. Pasibaigus reakcijai, produktas išsodinamas į ledinį vandenį, filtruojamas, praplaunamas chloroformu ir išdžiovinamas. Išeiga 0,63 g (79 %).

2.2.3.2. N-ftaloilchitozano C(6)-azidinimas

1 g (2,4 mmol) *C(6)-O*-(4-metilbensulfonil)-*N*-ftaloilchitozano ištirpinama 35 ml DMF ir 10 ml vandens mišinyje. Į gautą tirpalą suberiama 0,78 g (12 mmol) natrio azido. Reakcija vykdoma 100 °C temperatūroje maišant magnetine maišykle 24 val. Reakcijai pasibaigus, produktas išsodinamas į ledinį vandenį, filtruojamas, kelis kartus praplaunamas lediniu vandeniu, etanoliu ir džiovinamas 40 °C temperatūroje. Išeiga 0,55 g (73 %).

2.2.3.3. N-ftaloilchitozano C(6)-propargilinimas

0,8 g (3,0 mmol) *N*-ftaloilchitozano ištirpinama 30 ml DMF. Tirpalą atšaldžius ledo vonioje iki 0 °C, įdedama 0,27 g (9,0 mmol) NaH (60 % mineralinėje alyvoje). Mišinys maišomas magnetine maišykle 30 min., tada lėtai sulašinama 0,65 ml (4,5 mmol) propargilbromido (80 % tirpalas toluene). Reakcija vykdoma 2 val. 0 °C temperatūroje ir dar 22 val. 60 °C temperatūroje. Po to įpilama 10 ml vandens, reakcijos produktas išsodinamas į acetoną, filtruojamas, kelis kartus praplaunamas acetonu ir džiovinamas 40 °C temperatūroje. Išeiga 0,77 g (84 %).

2.2.4. CDK esančio chitozano C(6) hidroksigrupės „aktyvavimas“

2.2.4.1. CDK esančio chitozano C(6)-tozilinimas

1,5 g (4,1 mmol) chitozano/dodecilsulfato komplekso (CDK) ištirpinama 150 ml 4 % LiCl tirpale DMA ir į jį lėtai sulašinama 37,8 ml (133 mmol) trietilamino. Gautas mišinys atšaldomas ledo vonioje iki 4 °C ir į jį sulašinama 13,0 g (66,5 mmol) 4-metilbensulfonilchlorido, ištirpinto 30 ml DMA. Reakcija vykdoma ledo vonioje 0-4 °C temperatūroje 24 val. maišant magnetine maišykle. Reakcijai pasibaigus, reakcijos produktas išsodinamas į ledinį vandenį. Susidariusios nuosėdos filtruojamos, praplaunamos chloroformu ir džiovinamos 40 °C temperatūroje. Išeiga 1,08 g (51 %).

2.2.4.2. CDK esančio chitozano C(6)-brominimas

1,5 g (4,1 mmol) CDK ištirpinama 150 ml 4 % LiCl tirpale DMA. Tirpalas atšaldomas ledo vonioje iki 4 °C ir į jį suberiama 7,12 g (40 mmol) *N*-bromsukcinimido ir 10,5 g (40 mmol) trifenilfosfino, ištirpinto 40 ml DMA. Maišant magnetine maišykle, reakcija 15 min. vykdoma 4 °C temperatūroje ir dar 2 val. 80 °C temperatūroje. Produktas išsodinamas į vandeninį Na₂CO₃ tirpalą, filtruojamas, kelis kartus plaunamas vandeniu, etanoliu ir džiovinamas 40 °C temperatūroje. Išeiga 0,72 g (42 %).

2.2.4.3. CDK esančio chitozano modifikavimas trichlortriazinu

1,5 g (4,1 mmol) CDK ištirpinama 150 ml 4 % LiCl tirpale DMA, tirpalas atšaldomas ledo vonioje iki 4 °C temperatūros, į jį suberiama 3,61 g (34,1 mmol) Na₂CO₃ ir 4,4 g (34,1 mmol) 2,4,6-trichlor-1,3,5-triazino, ištirpinto 30 ml DMA. Reakcija vykdoma 80 °C temperatūroje 40 val. maišant magnetine maišykle. Gautas produktas išsodinamas į acetoną, filtruojamas, kelis kartus plaunamas vandens-acetono mišiniu (1/1, v/v), vandeniu ir džiovinamas 40 °C temperatūroje. Išeiga 1,0 g (73 %).

2.2.4.4. CDK esančio chitozano C(6)-azidinimas

0,5 g *C(6)*-bromchitozano, įeinančio į CDK, ištirpinama 50 ml DMSO ir į gautą tirpalą suberiama 0,5 g (7,7 mmol) natrio azido. Reakcija vykdoma

100 °C temperatūroje maišant magnetine maišykle 24 val. Reakcijai pasibaigus, tirpalas kelias paras dializuojamas vandenyje naudojant Visking (*SERVA*, MWCO 12000-14000) dializės žarną, koncentruojamas rotaciniu garintuvu ir džiovinamas džiovinimo krosnyje 40 °C temperatūroje. Išeiga 0,25 g (56 %).

C(6)-azidintas chitozanas, įeinantis į CDK, naudojant kitus *C(6)* hidroksigrupės „aktyvavimo“ būdus, sintetinamas pagal tą pačią metodiką.

2.2.5. Chitozano azidinio reagentų sintezė

2.2.5.1. Chlorhidrino azido (CHA) sintezė [158]

16,0 g (0,25 mmol) NaN_3 ištirpinama 40 ml vandens, kuriame yra 0,196 g (0,6 mmol) tetrabutilamonio bromido. Į gautą tirpalą sulašinama 20 ml (0,25 mol) epichlorhidrino. Reakcija vykdoma tamsoje, 27 °C temperatūroje 18 val. maišant magnetine maišykle. Reakcijai pasibaigus, įpilama 50 ml metileno chlorido, organinis sluoksnis atskiriamas ir džiovinamas bevandeniu Na_2SO_4 . Metileno chloridas pašalinamas rotaciniu garintuvu. Išeiga 30,6 g (90 %).

2.2.5.2. Trifluormetansulfonilazido (TFA) sintezė [159]

0,55 g (8,38 mmol) NaN_3 ištirpinama 1,37 ml vandens, įpilama 1,37 ml tolueno. Gautą mišinį atšaldžius ledo vonioje iki 0 °C, sulašinama 0,896 ml (4,19 mmol) trifluormetansulfonilanhidrido. Reakcija vykdoma 30 min. 0 °C temperatūroje ir dar 2 val. kambario temperatūroje maišant magnetine maišykle. Reakcijai pasibaigus, lašinamas sotus NaHCO_3 vandeninis tirpalas, kol nustoja skirtis dujos. Vandeninis sluoksnis 2 kartus ekstrahuojamas 1,37 ml tolueno. Gautas trifluormetansulfonilazido tirpalas toluene džiovinamas bevandeniu Na_2SO_4 ir iškart naudojamas azidinio reakcijoje.

2.2.5.3. Imidazol-1-sulfonilazido hidrochlorido (ISA) sintezė [160]

16,1 ml (0,2 mol) sulfonilchlorido sulašinama į iki 0 °C atšaldytą NaN_3 (13,0 g, 0,2 mol) suspensiją 200 ml acetonitrilo. Reakcija vykdoma 18 val. kambario temperatūroje. Po to, reakcijos mišinį ledo vonioje atšaldžius iki 0 °C

temperatūros, į jį dalimis suberiama 25,9 g (0,38 mol) imidazolo. Reakcijos mišinys maišomas magnetine maišykle 3 val. kambario temperatūroje, tada praskiedžiamas 400 ml etilacetato, ekstrahuojamas 2 kartus 400 ml vandens, 2 kartus 400 ml sočiojo NaHCO_3 tirpalo. Gautas organinis sluoksnis džiovinamas MgSO_4 , nufiltruojamas. Filtratas atšaldomas iki $0\text{ }^\circ\text{C}$ ir į jį sulašinamas paruoštas HCl tirpalas etilacetate, gautas 21,3 ml (0,3 mol) acto rūgšties chloranhidrido sulašinus į 75 ml etanolio. Nuosėdos tuoj pat filtruojamos, 3 kartus plaunamos 100 ml etilacetato ir džiovinamos $40\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje. Išeiga 26,4 g (63 %).

2.2.6. *N*-azidinto chitozano sintezių metodikos

2.2.6.1. N-azidinto chitozano sintezė, naudojant chlorhidrino azidą [158]

1,2 g (8,67 mmol) chitozano ištirpinama 75 ml 5 % acto rūgšties ir 75 ml 5 % HCl mišinyje. Į gautą tirpalą sulašinama 7,8 ml (72,4 mmol) CHA. Reakcija vykdoma tamsoje $27\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje 24 val. maišant magnetine maišykle. Reakcijai pasibaigus, produktas išsodinamas į 40 % amoniako tirpalą metanolyje, nuosėdos filtruojamos, kelis kartus plaunamos metanoliu, vandeniu, acetonu ir džiovinamos džiovinimo krosnyje $40\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje. Produktas iki naudojimo laikomas tamsoje eksikatoriuje. Išeiga 1,08 g (90 %).

2.2.6.2. N-azidinto chitozano sintezė, naudojant NaN_3 ir NaNO_2

1 g (0,578 mmol) chitozano ištirpinama 50 ml 1 % HCl. Tirpalas atšaldomas ledo vonioje iki $0\text{ }^\circ\text{C}$ ir maišant per 5 min. į jį sulašinama 0,47 g (6,97 mmol) NaNO_2 , ištirpinto 2 ml vandens. Į gautą mišinį įpilama 0,42 g (6,38 mmol) NaN_3 , ištirpinto 2 ml vandens. Produktas išsodinamas į 50 ml 1 % NaOH vandeninį tirpalą. Nuosėdos nufiltruojamos, plaunamos vandeniu iki neutralios terpės ir džiovinamos $40\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje. Išeiga 0,51 g (50 %).

2.2.6.3. N-azidinto chitozano sintezė, naudojant trifluormetansulfonilazidą

0,5 g (2,89 mmol) chitozano ištirpinama 20 ml 0,5 M HCl. Į gautą tirpalą, intensyviai maišant, supilama 0,78 g (9,3 mmol) NaHCO_3 , 0,022 g (0,09 mmol) $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, kiekvienas atskirai ištirpintų 10 ml vandens, 4,9 ml

(5,95 mmol) TFA ir 15 ml metanolio. Gautas melsvas mišinys magnetine maišykle maišomas 5 dienas kambario temperatūroje. Produktas išsodinamas į acetoną, filtruojamas, kelis kartus plaunamas acetonu, ištirpinamas 0,2 % acto rūgštyje ir dializuojamas vandeniu 48 val., naudojant Visking (SERVA, MWCO 12000-14000) dializės žarną. Dializatas koncentruojamas rotaciniu garintuvu ir produktas džiovinamas vakuuminėje džiovykloje kambario temperatūroje. Išeiga 0,35 g (65 %).

2.2.6.4. N-azidinto chitozano sintezė, naudojant imidazol-1-sulfonilazido hidrokloridą

1,0 g (5,92 mmol) chitozano ištirpinama 40 ml 0,1 M HCl, įdedama 0,336 g (4,0 mmol) NaHCO₃ ir 30 min. energingai maišoma magnetine maišykle. Į gautą mišinį suberiama 12,3 g (59,2 mmol) ISA, 4,97 g (59,2 mmol) NaHCO₃, supilama 0,146 g (0,59 mmol) CuSO₄·5H₂O, ištirpinto 1 ml vandens, pridedama 10 ml metanolio. Reakcija vykdoma kambario temperatūroje 24 val. energingai maišant magnetine maišykle. Produktas išsodinamas į acetoną, filtruojamas, kelis kartus plaunamas vandeniu ir acetonu ir džiovinamas 40 °C temperatūroje. Išeiga 0,96 g (87 %).

2.2.7. Chitozano skiepytųjų kopolimerų sintezė

2.2.7.1. Chitozano-N-TMPEG skiepytųjų kopolimerų sintezė “klik” chemijos metodu

0,16 g (0,63 mmol) N-azidinto chitozano (AL 27 %), paruošto pagal 2.2.6.1. metodiką, ištirpinama 40 ml 0,05 M HCl. Į gautą tirpalą supilama 5,2 mg (0,021 mmol) CuSO₄·5H₂O, ištirpinto 3 ml vandens, 8,4 mg (0,042 mmol) natrio askorbato, ištirpinto 3 ml vandens, ir 0,51 g (0,25 mmol) O-propargilmetoksipolietilenglikolio, ištirpinto 40 ml metileno chlorido. Reakcija vykdoma 40 °C temperatūroje 24 val. maišant magnetine maišykle. Reakcijai pasibaigus, metileno chloridas pašalinamas rotaciniu garintuvu, o likęs mišinys 18 val. dializuojamas 0,1 % acto rūgšties tirpale ir 48 val. vandenyje, naudojant Visking (SERVA, MWCO 12000-14000) dializės žarną,

koncentruojamas rotaciniu garintuvu ir džiovinamas vakuuminėje džiovykloje kambario temperatūroje. Išeiga 0,52 g (65 %, kai PL 26 %).

Chitozano-*N*-TMPEG skiepytųjų kopolimerų, kuriuose yra triazolilfragmentas, sintezė, naudojant kitais būdais gautą *N*-azidintą chitozaną, vykdoma pagal tą pačią metodiką.

2.2.7.2. Chitozano-*C*(6)-TMPEG skiepytųjų kopolimerų sintezė “klik” chemijos metodu

0,12 g (0,37 mmol) *C*(6)-azidinto *N*-ftaloilchitozano, paruošto pagal 2.2.3.2. metodiką, ištirpinama 15 ml DMSO. Į gautą tirpalą supilama 4,6 mg (0,012 mmol) CuSO₄·5H₂O, ištirpinto 2 ml vandens, 7,3 mg (0,037 mmol) natrio askorbato, ištirpinto 2 ml vandens, ir 0,75 g (0,37 mmol) *O*-propargil-metoksipolietilenglikolio, ištirpinto 10 ml vandens. Reakcija vykdoma 55 °C temperatūroje 24 val. maišant magnetine maišykle. Reakcijai pasibaigus, vanduo pašalinamas rotaciniu garintuvu. Į likusį reakcijos mišinį įpilama 1 ml hidrazino monohidrato ir mišinys kaitinamas 80 °C temperatūroje 2 val. Po to tirpalas 18 val. dializuojamas 0,1 % acto rūgšties tirpale ir 48 val. vandenyje, naudojant Visking (SERVA, MWCO 12000-14000) dializės žarną, koncentruojamas rotaciniu garintuvu ir džiovinamas 40 °C temperatūroje. Išeiga 0,39 g (50 %, kai PL 50 %).

Chitozano-*C*(6)-MPEG kopolimerai iš *C*(6)-azidinto CDK sintetinami pagal tą pačią metodiką. Natrio dodecilsulfatas iš kopolimero pašalinamas naudojant stiprią bazę TRIS, kuri veikia kaip deblokuojantis reagentas.

2.2.7.3. Chitozano-*N*-MPEG skiepytųjų kopolimerų sintezė, naudojant MPEG sukcinatą

3,6 g (1,71 mmol) MPEG sukcinato ir 0,67 g (3,49 mmol) EDC ištirpinama 20 ml vandens. Gautas tirpalas sumaišomas su 75 ml 1,0 % chitozano (0,75 g, 4,3 mmol) tirpalu 0,25 % vandeninėje acto rūgštyje. Reakcija vykdoma 50 °C temp. 24 val. maišant magnetine maišykle. Gautas polimero tirpalas keturias paras dializuojamas vandenyje naudojant Visking

(SERVA, MWCO 12000-14000) dializės žarna, koncentruojamas rotaciniu garintuvu ir liofilizuojamas. Išeiga 2,6 g (62 %).

2.2.8. Chitozano katijonizavimas *N*-2,3-epoksi-propil-*N,N,N*-trimetilamonio chloridu

2.2.8.1. Chitozano katijonizavimas EPTMAC rūgštinėje terpėje [91]

1 g (5,78 mmol) chitozano ištirpinama 50 ml 1 % acto rūgšties, ir į gautą tirpalą sulašinama 2,52 g (16,6 mmol) *N*-2,3-epoksi-propil-*N,N,N*-trimetilamonio chlorido (EPTMAC). Reakcija vykdoma 70 °C temp. 24 val. Reakcijai pasibaigus, produktas išsodinamas į šaltą acetoną, filtruojamas, plaunamas kelis kartus acetonu ir džiovinamas 40 °C temperatūroje. Išeiga 1,49 g (91 %).

2.2.8.2. Chitozano katijonizavimas EPTMAC neutralioje terpėje [89]

1 g (5,78 mmol) chitozano disperguojama 10 ml vandens. Į gautą suspensiją supilama 2,52 g (16,6 mmol) EPTMAC, ištirpinto 7 ml vandens. Reakcija vykdoma 80 °C temp. 4 val. maišant magnetine maišykle. Reakcijos mišinys supilamas į šaltą acetoną ir per naktį maišomas 6 °C temp. šaldytuve. Gautos nuosėdos nufiltruojamos, plaunamos keletą kartų acetonu ir džiovinamos 40 °C temperatūroje. Išeiga 1,53 g (94 %).

2.2.8.3. Chitozano katijonizavimas EPTMAC šarminėje terpėje

1,75 g (11,6 mmol) EPTMAC ištirpinama 5 ml vandens ir supilama į chitozano (1 g, 5,78 mmol) dispersiją 20 ml 1 % NaOH tirpalo. Reakcija vykdoma 70 °C temperatūroje 24 val. Reakcijos mišinys atvėsina iki kambario temperatūros, įpilama 20 ml metanolio ir 3 val kambario temp. maišoma magnetine maišykle. Reakcijos produktas išsodinamas į šaltą acetoną, kelis kartus plaunamas acetonu, filtruojamas, 5 val. ekstrahuojamas metanoliumi Soksleto aparate ir džiovinamas 40 °C temperatūroje. Išeiga 1,08 g (58 %).

2.2.9. CDK esančio chitozano O-katijonizavimas

2,1 g (13,5 mmol) EPTMAC ištirpinama 20 ml vandens (arba 2-propanolio) ir supilama į CDK (1 g, 2,7 mmol) tirpalą 70 ml DMSO. Reakcija vykdoma 70 °C temp. 24 val. maišant magnetine maišykle. Reakcijos mišinys 72 val. dializuojamas 15 % TRIS tirpale, po to 3 paras vandenyje, naudojant Visking (SERVA, MWCO 12000-14000) dializės žarną, koncentruojamas rotaciniu garintuvu ir džiovinamas 40 °C temperatūroje. Išeiga 0,74 g (84 %).

2.2.10. Chitozano-N-MPEG skiepytųjų kopolimerų katijonizavimas

0,5 g (0,5 mmol) chitozano-N-MPEG (PL 40 %) kopolimero ištirpinama 60 ml 0,25 % vandeninės acto rūgšties ir į gautą tirpalą supilama 0,3 g (2,0 mmol) EPTMAC, ištirpinto 5 ml vandens. Reakcija vykdoma 50 °C temp. 24 val. maišant magnetine maišykle. Gautas polimero tirpalas keturias paras dializuojamas vandenyje naudojant Visking (SERVA, MWCO 12000-14000) dializės žarną, koncentruojamas rotaciniu garintuvu ir liofilizuojamas. Išeiga 0,39 g (76 %).

2.2.11. Katijonizuoto chitozano fermentinė hidrolizė

0,24 g pektinazės iš *Aspergillus niger* arba celiulazės iš *Trichoderma reesi*, ištirpintos 5 ml vandens, įpilama į 100 ml 4 % *N*-[(2-hidroksi-3-trimetilamonio)propil]chitozano (*N*-KChz) tirpalą acetatiniame buferyje (pH 4,6) ir maišoma 37 °C temperatūroje 24 val. Reakcijos produktas išsodinamas į acetoną, filtruojamas, plaunamas kelis kartus acetonu ir džiovinamas 40 °C temperatūroje. Išeiga 2,7 g (67 %).

2.2.12. Katijonizuoto chitozano destrukcija UV spinduliais

Paruošiama 100 ml 7 % katijonizuoto chitozano tirpalo 0,5 % CH₃COOH ir supilama į 150 ml talpos kvarcinį mėgintuvėlį. Homogeninis tirpalas kambario temperatūroje maišomas mechanine maišykle ir švitinamas 250 W UV lempa, esančia 24 ar 30 cm atstumu nuo ampulės. Katijonizuoto chitozano destrukcija įvertinama matuojant tirpalo dinaminę klampą.

2.2.13. Chitozano *N*-modifikavimas di- arba trikarboksirūgštimis

2.2.13.1. Chitozano *N*-modifikavimas adipo rūgštimi

0,023 g (0,157 mmol) adipo rūgšties ištirpinama 5 ml H₂O ir 0,1 M NaOH tirpalu pašarminama iki pH 6,5. Atšaldžius ledo vonioje iki 4 °C temp., įdedama 0,09 g (0,47 mmol) EDC. Į gautą mišinį lėtai sulašinamas chitozano tirpalas, gautas 0,25 g (1,45 mmol) chitozano ištirpinus 250 ml 0,5 % acto rūgšties ir 0,1 M NaOH pašarminus iki pH 6,5. Reakcija vykdoma 24 val. kambario temperatūroje maišant magnetine maišykle. Reakcijai pasibaigus, tirpalas 72 val. dializuojamas vandenyje naudojant Visking (*SERVA*, MWCO 3500) dializės žarną ir liofilizuojamas. Išeiga 0,2 g (78 %, kai PL 10 %).

Chitozano *N*-modifikavimas vyno arba citrinų rūgštimi vykdomas pagal tą pačią metodiką.

2.2.13.2. Adipo rūgštimi modifikuoto chitozano *N*-modifikavimas CPAD

0,27 g (0,097 mmol) (4-cianpentano rūgšties)-4-ditiobenzenkarboksilato (CPAD) ištirpinama 10 ml 1,4-dioksano ir 0,1 M NaOH tirpalu pašarminama iki pH 6,5. Atšaldžius ledo vonioje iki 4 °C temp., įdedama 0,074 g (0,39 mmol) EDC. Į gautą mišinį lėtai sulašinama 0,1 g (0,54 mmol) adipo rūgštimi modifikuoto chitozano (PL 10 %), ištirpinto 10 ml 0,5 % acto rūgšties, ir tirpalo pH 0,1 M NaOH tirpalu padidinamas iki 6,5. Reakcija vykdoma 24 val. kambario temperatūroje maišant magnetine maišykle. Reakcijai pasibaigus, tirpalas 72 val. dializuojamas vandenyje, naudojant Visking (*SERVA*, MWCO 3500) dializės žarną ir liofilizuojamas. Išeiga 0,09 g (72 %, kai PL 18 %).

2.3. Analizių metodikos

2.3.1. Pirminių aminograpių, karboksigrapių, epoksigrapių ir azoto kiekio nustatymas

Pirminių aminograpių, karboksigrapių, epoksigrapių ir azoto kiekis nustatytas pagal žinomas metodikas [161]. Kaiser testas atliktas pagal žinomą metodiką [51].

2.3.2. Joninėje formoje esančio chloro kiekio nustatymas

Analizuojamas mišinys potenciometriškai titruojamas AgNO_3 (0,1 M) tirpalu, indikatoriniu elektrodu naudojant Ag, o palyginamuoju – AgCl/KCl elektrodus. Į tirpalą lašinama po 0,1-0,4 ml AgNO_3 tirpalo ir užrašomos celės potencialų skirtumo tarp elektrodų vertės (mV). Grafiniu būdu suradus ekvivalentinį tašką, bendras chloro kiekis bandinyje apskaičiuojamas pagal formulę:

$$Cl = \frac{V \cdot C \cdot M_{Cl}}{m \cdot 1000} \cdot 100,$$

- čia: C – AgNO_3 tirpalo koncentracija, mol/l;
V – titravimui sunaudotas AgNO_3 tirpalo tūris, ml;
m – bandinio masė, g;
 M_{Cl} – chloro atominė masė, 35,453.

2.3.3. Chitozano azidinio laipsnio nustatymas

2.3.3.1. Iš aminogrupių kiekio

Chitozano azidinio laipsnis (AL, %) N-azidintame chitozane apskaičiuojamas iš eksperimentiškai nustatytų pirminių aminogrupių (NH_2 , %) kiekio pagal formulę:

$$AL = \frac{1152 - 173 \cdot \text{NH}_2}{(M - 16) \cdot \text{NH}_2 + 1600} \cdot 100,$$

kuri išvesta iš formulės, naudojamos apskaičiuoti teorinį aminogrupių kiekį azidintame chitozane:

$$\text{NH}_2 = \frac{16 \cdot (72 - AL)}{161 \cdot (72 - AL) + (161 + M - 16) \cdot AL + 203 \cdot 28} \cdot 100,$$

- čia: 16 – pirminės aminogrupės molekulinė masė;
72 – chitozano deacetilimo laipsnis, %;
161 – monosacharidinės grandies, C(2) padėtyje turinčios aminogrupę, molekulinė masė;
M – azidą turinčios liekanos molekulinė masė ($-\text{N}_3$ arba $-\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{N}_3$);

- 203 – *N*-acetilintos monosacharidinės grandies molekulinė masė;
 28 – chitozano acetilinimo laipsnis, %.

2.3.3.2. Iš azoto kiekio

Chitozano azidavimo laipsnis (AL, %) *N*-azidintame chitozane apskaičiuojamas iš eksperimentiškai nustatyto azoto kiekio (N, %) pagal formulę:

$$AL = \frac{N - 8,19}{\frac{14 \cdot n}{145 + M} - 0,0870} \cdot 100,$$

kuri išvesta iš formulės, naudojamos apskaičiuoti teorinį azoto kiekį azidintame chitozane:

$$N = \frac{14 \cdot n}{(161 - 16 + M)} \cdot AL + \frac{14}{161} \cdot (72 - AL) + \frac{14}{203} \cdot 28,$$

- čia: 14 – azoto santykinė atominė masė;
 n – azoto atomų skaičius azidintoje grandyje.

2.3.3.3. Iš FT-IR spektrų

Chitozano azidavimo laipsnis (AL, %) nustatomas bazinės linijos metodu, lyginant būdingųjų sugerties juostų intensyvumus – azido grupės (I₁) ties 2286-2085 cm⁻¹ ir acetamido grupės (I₂) ties 1720-1595 cm⁻¹. Kalibracijai naudoti ekvimolinio chitozano ir natrio azido mišinio spektrai. AL (%) apskaičiuojamas pagal formulę:

$$AL = \frac{I_1}{I_2} \cdot 23 \cdot 100,$$

- kur: 23 – kalibracinė konstanta, kai chitozano deacetilinimo laipsnis yra 72%.

2.3.4. Chitozano pakeitimo laipsnio jo kopolimeruose skaičiavimas

Pakeitimo laipsnis (PL, %) parodo, kiek vidutiniškai MPEG grandinių yra prijungta prie 100 chitozano grandžių.

2.3.4.1. Chitozano-*N*-TMPEG kopolimeruose

Chitozano pakeitimo laipsnis (PL, %) chitozano-*N*-TMPEG skiepytuosiuose kopolimeruose apskaičiuojamas iš eksperimentiškai nustatytų pirminių aminogrupių (NH₂, %) kiekio pagal formulę:

$$PL = \frac{1152 - 173 \cdot NH_2}{(M_1 + M_2) \cdot NH_2 + 1600} \cdot 100,$$

kuri išvesta iš formulės, naudojamos apskaičiuoti teorinį aminogrupių kiekį chitozano-*N*-TMPEG kopolimeruose:

$$NH_2 = \frac{16 \cdot (72 - PL)}{161 \cdot (72 - PL) + (161 + M_1 + M_2 - 16) \cdot PL + 203 \cdot 28} \cdot 100,$$

čia: M₁ – MPEG molekulinė masė;

M₂ – skiepą jungiančios grandies molekulinė masė (64 arba 137).

2.3.4.2. Chitozano-*O*-TMPEG kopolimeruose

Chitozano pakeitimo laipsnis (PL, %) chitozano-*O*-TMPEG skiepytuosiuose kopolimeruose apskaičiuojamas iš eksperimentiškai nustatytų pirminių aminogrupių (NH₂, %) kiekio pagal formulę:

$$PL = \frac{(6,66 - NH_2) \cdot 173}{NH_2 \cdot 2063} \cdot 100,$$

čia: 6,66 – aminogrupių kiekis chitozane (DL 72%), %;

173 – chitozano monosacharidinės grandies molekulinė masė (DL 72 %);

2063 – MPEG, turinčio triazolo liekaną, molekulinė masė.

2.3.4.3. Chitozano katijonizavimo laipsnio nustatymas

Chitozano katijonizavimo EPTMAC laipsnis (KL, %) apskaičiuojamas iš eksperimentiškai nustatytų pirminių aminogrupių (NH₂, %) kiekio pagal formulę:

$$KL = \frac{1152 - 173 \cdot NH_2}{M \cdot NH_2 + 1600} \cdot 100,$$

čia: M – EPTMAC molekulinė masė (151,63).

Katijonizavimo laipsnis iš eksperimentiškai nustatyto chloro kiekio gali būti apskaičiuojamas ir pagal formulę:

$$KL = \frac{173 \cdot Cl}{3550 - 151,63 \cdot Cl} \cdot 100,$$

kuri išvesta iš formulės, naudojamos apskaičiuoti teorinį chloro kiekį katijonizuoto chitozano dariniuose:

$$Cl = \frac{35,5 \cdot KL}{161 \cdot (72 - KL) + 312,63 \cdot KL + 203 \cdot 28} \cdot 100,$$

čia: Cl – chloro kiekis katijonizuotame chitozane, %;

312,63 – katijonizuoto chitozano molekulinė masė.

2.3.4.4. Naudojant 1H BMR spektrus

Chitozano pakeitimo laipsnis (PL, %) jo dariniuose apskaičiuojamas iš 1H BMR spektrų, lyginant priskiepytai grandinei būdingų protonų ir chitozano acetilgrupės ties 1,8-1,9 ppm signalų plotus pagal formulę:

$$PL = \frac{H/n}{A/3} \cdot 0,28 \cdot 100,$$

čia: H – analitinio protonų signalo priskiepytoje grandinėje smailės plotas;

n – analitinio signalo protonų, esančių priskiepytoje grandinėje, skaičius;

A – acetatinės grupės signalo plotas.

2.3.5. Vario kiekio chitozano-N-TMPEG kopolimeruose nustatymas

Vario kiekis chitozano-N-TMPEG kopolimeruose nustatomas liepsnos atominės absorbcijos spektrometrijos metodu, naudojant atominį absorbcinį spektrometrą Hitachi 170-50. Nustatymo sąlygos: Cu analizės linija – 324,8 nm, srovės stipris – 10 mA. Kalibracinei kreivei gauti imama tam tikras kiekis etaloninio vario tirpalo bei 5 ml 2 M HCl ir skiedžiama bidistiliuotu H₂O iki 100 ml. Gaunama serija tirpalų, kuriuose Cu koncentracija kinta nuo 0,05 iki 1,6 µg/ml.

Siekiant nustatyti vario kiekį chitozano-*N*-TMPEG kopolimeruose, 30-50 mg 105 °C temp. išdžiovinto mėginio 0,5 val. kaitinama 250 °C temperatūroje ir po to 0,5 val. deginama 500-550 °C temperatūroje. Gauti pelenai sušlapinami bidistiliuotu H₂O, sumaišomi su 5 ml praskiestos HCl (1:1), mišinys švelniai virinamas, atvėsintas iki kambario temperatūros, supilamas į 10 ml matavimo kolbutę ir iki žymės praskiedžiamas bidistiliuotu vandeniu. Matuojama Cu atominė absorbcija ir iš kalibracinės kreivės nustatomas Cu kiekis.

2.3.6. Spektroskopinis chitozano darinių tyrimas

FT-IR spektrai užrašyti *PERKIN ELMER Spectrum BX* spektrometru sausame ore 20 °C temperatūroje, naudojant KBr tabletes. Skenavimo parametrai: ribos 520-3600 cm⁻¹, skiriamoji geba 2 cm⁻¹. ¹H-BMR spektrai užrašyti *UNITY INOVA VARIAN* 300 MHz spektrometru 5 mm BMR ampulėse 29 °C temperatūroje. Kopolimerų tirpalai buvo ruošiami DMSO-d₆, D₂O, arba D₂O, turinčiame 1 lašą DCl arba acto rūgšties-d₄.

2.4. Chitozano skiepytųjų kopolimerų savybių tyrimas

2.4.1. Ribinio klampos skaičiaus nustatymas

Paruošiamas 0,5-2,0 dL/g koncentracijos polimero tirpalas buferiniame tirpale (0,2 M CH₃COOH/0,1 M CH₃COONa). Chitozano darinių tirpalų klampa buvo matuojama Ubelodės viskozimetru 25 °C temperatūroje (kapiliaro diametras 0,56 mm). Praskiedimams viskozimetre naudojama tiek tirpiklio, kad susidarančiame tirpale pradinio polimero tirpalo būtų apie 2/3, 1/2, 1/3 ir 1/4. $[\eta]$ nustatoma η_{red} ir η_{ln} ekstrapoliacijos į nulinę koncentraciją būdu.

Tiriamųjų tirpalų redukuota klampa matuojama Ostwald'o viskozimetru 25 °C temperatūroje (kapiliaro diametras 0,56 mm).

2.4.2. Dinaminės klampos nustatymas

Katijonizuotų chitozano darinių dinaminė klampa matuojama Brookfield'o DV-II viskozimetru 18 °C temperatūroje.

2.4.3. Kopolimerų molekulinės masės nustatymas molekulių sietų chromatografijos metodu

Kopolimerų molekulinė masė buvo nustatoma, naudojant molekulių sietų chromatografijos įrangą: izokratinį siurblių (Watrex), automatinio bandinių paėmimo modulį *Midas* (Spark Instruments, Olandija), dvi koloneles Aquagel MIXED (8 μm), skirtas junginiams, kurių molekulinė masė 100-1·10⁶ g/mol. Eliuentas – acetatinis buferis (0,15 M CH₃COONH₄/0,2 M CH₃COOH), eliuento tėkmės greitis – 0,75 ml/min. Matavimai atliekami naudojant trigubą (lūžio rodiklio, šviesos sklaidos ir klampos) jutiklių sistemą. Duomenys kaupiami ir apdorojami naudojant Astra ir tri-SEC programinę įrangą.

2.4.4. Dinaminė šviesos sklaida

Dalelių hidrodinaminis spindulys nustatomas dinaminės šviesos sklaidos pagalba. Paruošiami 1 % bandiniai acetatiniame buferyje (0,15 M CH₃COONH₄/0,2 M CH₃COOH), filtruojami pro 22 μm dydžio filtrus. Kalibravimui naudojamas toluenas, kuris pasižymi dideliu šviesos išbarstymu. Tyrimas atliekamas 25 °C temperatūroje. Pirmiausiai matuojamas tirpiklio, o tik paskui tiriamo tirpalo šviesos išbarstymas. Kiuvetė su tiriamu mėginiu įstatoma į specialią celę taip, kad lazerio šviesa gerai praeitų. Eksperimento metu naudojamos lazerio bangos ilgis – 632 nm, o lazerio šviesos sklaidimo kampas – 90°. Matuojami intensyvumų fliuktuacijos/svyravimai, kurie perskaičiuojami į intensyvumų koreliacijų funkcijas – laiko priklausomybes nuo išsklaidytos šviesos intensyvumo. Duomenys kaupiami ir apdorojami naudojant ALV programinę įrangą. Gaunama koreliacijos funkcija, reikalinga difuzijos koeficientui surasti (D). Tiriamų dalelių hidrodinaminis spindulys (R_h) apskaičiuojamas pagal lygtį:

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot M \cdot \eta \cdot R_h}$$

čia: k – Bolcmano konstanta, 1,38·10⁻¹⁶ erg/K

T – absoliučioji temperatūra, K

η – tirpiklio klampa

2.4.5. Potenciometrinis titravimas

0,025 g medžiagos ištirpinama 5 ml 0,01 M HCl/0,1 M NaCl ir potenciometriškai titruojama 0,05 M NaOH/0,1 M NaCl tirpalu, kiekvieną kartą sulašinant po 0,05 ml 0,05 M NaOH/0,1 M NaCl. Įpylus šarmo, tirpalas apie 1 min. maišomas ir tik tuomet užrašomi pH-metro *CyberScan pH6000* rodmenys. Titruojama tol, kol pH vertė pasiekia 11-12. Nubrėžus potenciometrinio titravimo kreivę, grafiniu būdu nustatomas visiško neutralizavimo (ekvivalentinis) taškas. Nustačius ekvivalentinį tašką, apskaičiuojamas polielektrolito jonizacijos laipsnis α kiekvienam potenciometrinės kreivės taškui. Susitarta, kad visiško neutralizavimo taške jonizacijos laipsnis $\alpha=1$, o pradiniam tirpale (prieš neutralizaciją) – $\alpha=0$. Pasinaudojant polielektrolito titravimo kreive, surandamos pH vertės, atitinkančios jonizacijos laipsnį 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 ir 0,9. Iš gautų duomenų brėžiama priklausomybė Henderson'o ir Hazelbalch'o lygties koordinatėse [161], t.y. tirpalo pH priklausomybė nuo $\lg[\alpha/(1-\alpha)]$.

2.4.6. Liofilizavimas

Liofilizavimas – tai džiovinimo būdas, kuomet užšaldytas tirpalas vakuumuojamas, ir tirpiklis sublimuojasi, iš kietos fazės pereidamas į dujinę. Medžiagos buvo liofilizuotos -40 °C temperatūroje naudojant *Christ ALPHA 2-4 LSC* liofilizatorių. Tirpiklis pilnai pašalinamas per 72 val. Medžiagos džiovinimas vyksta keliais etapais: pirma tirpalas užšaldomas, tuomet žemoje temperatūroje vykdomas pagrindinis džiovinimas. Tirpikliui sublimuojantis polimero masė išsipučia ir palengva įgauna vatos pavidalą. Likę 5-10 % tirpiklio pašalinama liekamojo džiovinimo metu, temperatūrą palaipsniui keliant iki kambario ar truputį aukštesnės.

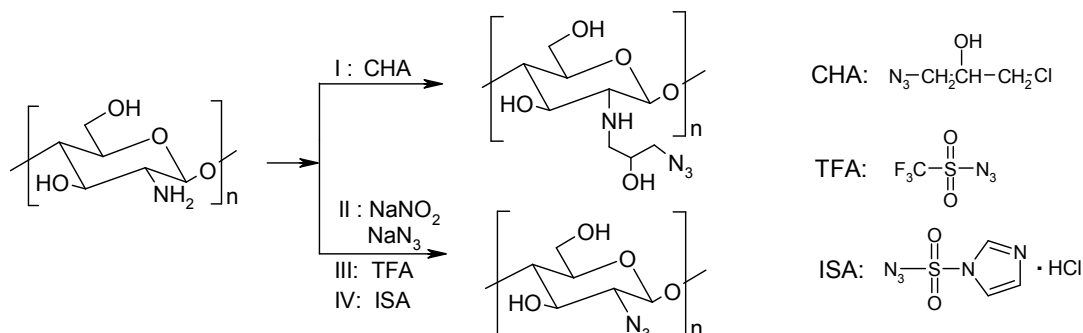
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Chitozano ir MPEG „aktyvavimas“

3.1.1. Chitozano *N*-azidinimas

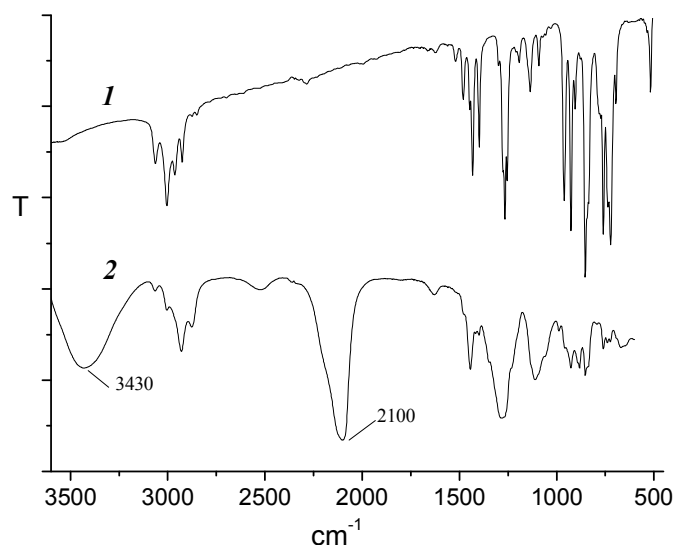
Siekiant panaudoti CuAAC reakciją chitozano-metoksipolietilenglikolio kopolimerų sintezei, vienas iš komponentų turi turėti azido liekaną, o kitas – alkino. Chitozaną modifikuojant per jo aminogrupę, CuAAC reakcijoje buvo naudojamas *N*-azidintas chitozanas.

Chitozano *N*-azidinimas buvo atliekamas keturiais skirtingais būdais: naudojant azidintą chlorhidriną – 1-chloro-2-hidroksi-3-azidopropaną (CHA) (I), natrio azidą su natrio nitritu (II), trifluormetansulfonilazidą (TFA) (III) ir imidazol-1-sulfonilazido hidrokloridą (ISA) (IV) (3.1 schema). Siekiant užtikrinti didesnę azidavimo laipsnį, beveik visose metodikose buvo naudotas azidinančios medžiagos perteklius (1,2-10 kartų).



3.1 schema. Chitozano *N*-azidinimo schema

Pirmas *N*-azidinto chitozano gavimo būdas paremtas chitozano reakcija su azidintu chlorhidrinu. CHA gaunamas tipinio bimolekulinio pakeitimo metu azido jonams atakuojant epoksido žiedą. Epoksigrupė yra labai reaktiva, todėl daugelis nukleofilų pajėgūs atidaryti epoksido žiedą [158]. Reakcija atliekama vandenyje, esant tarpfazinio katalizatoriaus tetrabutilamonio bromido. Reakcijos metu naudojami stechiometriniai epichlorhidrino ir natrio azido kiekiai, tačiau to pakako pasiekti dideliame azidavimo laipsniui (AL, %). Iš likusių epoksigrupių kiekio (1,42 %) apskaičiuota, kad chlorhidrino AL siekia 96 %.



3.1 pav. Epichlorhidrino (1) ir azidinto chlorhidrino (2) FT-IR spektrai

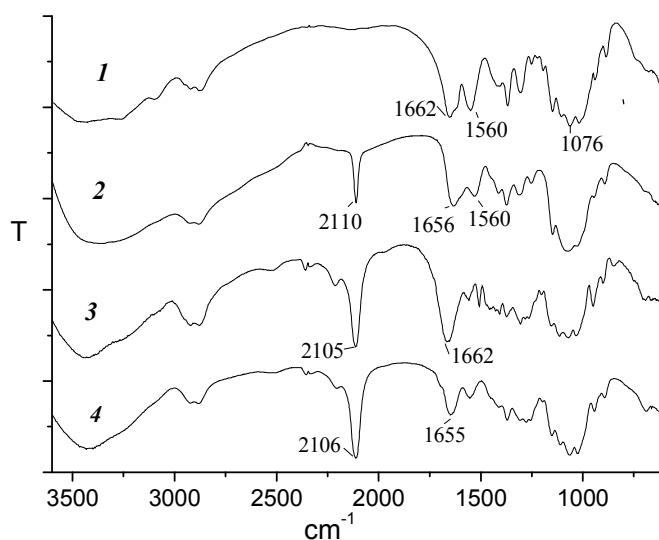
CHA FT-IR spektre (3.1 pav.) matyti stiprios sugerties juostos ties 2100 ir 3430 cm^{-1} , priskiriamos atitinkamai azido ir hidroksigrupėms. Atsiradusi intensyvi sugerties juosta ties 3430 cm^{-1} rodo, kad reakcijos metu atsiradė epoksido žiedas.

Chitozano reakcija su CHA vykdoma rūgštinėje terpėje, saugant nuo tiesioginės šviesos ir naudojant daugkartinį azidinančios medžiagos perteklių. Chitozanui reaguojant su CHA, gaunamas parūgštintame vandenyje tirpus azidintas chitozano darinys. Apie sėkmingą azidavimo reakciją sprendžiama iš FT-IR spektrų (3.2 pav.), kuriuose matoma azidui būdinga sugerties juosta ties 2110 cm^{-1} .

CHA azidinto chitozano azidavimo laipsnis, apskaičiuotas remiantis cheminės analizės duomenimis bei FT-IR spektrų analize, skiriasi nežymiai ir yra apie 27 % (3.1 lentelė). Deja, net ir naudojant azidinančios medžiagos perteklių, gauti chitozano darinio su dideliu AL nepavyko.

3.1 lentelė. Chitozano azidavimo rezultatai

Azidinta:	N, %	NH ₂ , %	AL (N), %	AL (NH ₂), %	AL (FT-IR), %
CHA	11,5	3,53	25,7	27,4	28,4
TFA	13,7	2,71	40,1	41,1	40,3



3.2 pav. Chitozano (1), chitozano, azidinto CHA (AL 27 %) (2), chitozano, azidinto TFA (AL 41 %) (3) ir chitozano, azidinto ISA (AL 65 %) (4), FT-IR spektrai

Nepavykus gauti didelio AL chitozano darinio, buvo mėginami kiti azidinantys reagentai. Chitozano *N*-azidinimas antruoju būdu paremtas chitozano reakcija su NaN_3 , dalyvaujant NaNO_2 . Tokia sistema taikoma mažamolekulių organinių junginių azidiniui [162]. Nors NaNO_2 yra žinomas oksidatorius, skaidantis chitozano glikozidinius ryšius [163], buvo tikimasi, kad, pasirinkus gerokai švelnesnes sąlygas, destrukcija bus lėta ir neturės didelės įtakos produktui. Nepaisant švelnių reakcijos sąlygų (maža NaNO_2 koncentracija, 0 °C temperatūra, trumpa reakcijos trukmė (~10 min)), chitozanas destrukavo. Tą įrodo ribinio klampos skaičiaus matavimai (3.2 lentelė). Lyginant su pradiniu chitozanu, azidinto darinio ribinis klampos skaičius sumažėjo daugiau nei 4 kartus, t.y., nuo 8,42 dL/g iki 2,07 dL/g. Remiantis cheminės analizės duomenimis nustatyta, kad šiuo atveju AL tesiekia 8 %.

Žinoma [164], kad pereinamųjų metalų druskos yra efektyvūs katalizatoriai aminų-azidų pernašos reakcijose. Azidavimo reakcijai pamėginus katalizatoriumi panaudoti Zn^{2+} (ZnCl_2), AL padidėjo iki 15 % (3.2 lentelė), tačiau buvo gautas vandeninėje terpėje netirpus produktas. Dėl mažo AL ir

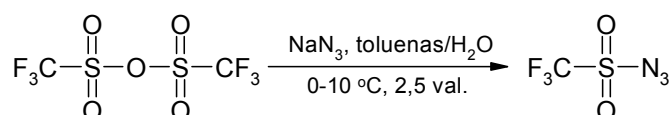
dalinės destrukcijos modifikavimo metu šiuo būdu gautas azidintas chitozanas nebuvo naudojamas „klikinimo“ reakcijose.

3.2 lentelė. Chitozано azidinimo NaN_3 ir NaNO_2 rezultatai

Nr	Medžiaga	N, %	NH_2 , %	AL (N), %	AL (NH_2), %	AL (FT-IR), %	$[\eta]$, dL/g
1	Chz	8,21	6,66	-	-	-	8,42
2	NaN_3 ir NaNO_2	8,93	5,82	5,2	8,6	8,4	2,07
3*	azidintas Chz	9,91	-	13,1	-	15,1	-

3* – azidinimo reakcijai naudotas katalizatorius ZnCl_2

Trečiasis chitozано azidinimo būdas – azidinimas trifluormetansulfonilazidu (TFA). Azidas į organines molekules dažniausiai įvedamas pakeitimo reakcijų metu, tam tikras nueinančias grupes pakeičiant azido jonais [160]. Kaip alternatyva neorganiniams azidams gana plačiai naudojama diazopernaša nuo TFA į pirminį aminą [159,160]. TFA buvo gautas tolueno/vandens mišinyje, trifluormetansulfonilanhidridui reaguojant su natrio azidu, naudojant dvigubą NaN_3 perteklių (3.2 schema).



3.2 schema. TFA sintezės schema

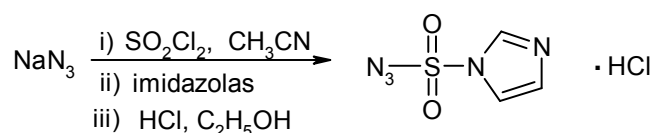
Ankstesniuose darbuose [164] TFA sintezė buvo vykdoma naudojant bifazinę $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ sistemą. Nustačius [159], kad tokiame reakcijos mišinyje susidaro pavojingi šalutiniai produktai, pvz., diazidometanas ir azidochlormetanas, vietoje metileno chlorido pasiūlyta naudoti tolueną. Tokiomis sąlygomis (0-10 °C) toluenas yra inertiškas natrio azido atžvilgiu.

Literatūroje rasta duomenų [51] apie sėkmingą TFA panaudojimą chitozано, kurio deacetilavimo laipsnis >99,5 %, azidinimui. Reakciją atliekant per keletą tarpinių stadijų: aminogrūpių apsaugojimą ftalio rūgšties anhidridu, tritilinimą ir deftalilinimą, buvo gautas didelio azidinimo laipsnio (95 %) chitozanas. Deja, autoriai nieko neužsimena apie gautų produktų molekulinės

mases. Žinoma [165,166], kad aminogrupę apsaugant ftalio rūgšties anhidridu, o apsaugai pašalinti naudojant hidraziną, skyla chitozано pagrindinė grandinė ir gaunami mažos molekulinės masės produktai. Trečiasis chitozано azidavimo metodas buvo suplanuotas siekiant išvengti aminogrupių apsaugojimo-apsaugos pašalinimo procedūrų.

Chitozано azidavimui buvo panaudotas šviežiai paruoštas TFA tirpalas toluene. Reakcija buvo vykdoma tolueno/metanolio/vandens mišinyje, naudojant 2-kartinį molinį TFA perteklių. Nors chitozanas prieš reakciją buvo ištirpintas 0,5 M HCl, į reakcijos mišinį pridėjus Cu(II) druskų ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ir bazės (NaHCO_3), kambario temperatūroje žymiai pagreitinančių reakciją, chitozanas išsėdo ir buvo gautas heterogeninis mišinys. Nepaisant heterogeninių sąlygų, azidavimas vyko pakankamai gerai. TFA azidinto chitozано FT-IR spektruose, lyginant su CHA azidintu chitozanu, matoma didesnio intensyvumo azidui būdinga sugerties juosta ties 2105 cm^{-1} (3.2 pav.). Azidavimo laipsnis, apskaičiuotas iš azoto, aminogrupių kiekių bei FT-IR spektrų, siekė apie 40-41 % (3.1 lentelė). TFA sintezei naudojamas trifluormetansulfonilanhidridas yra labai brangus, todėl išmėginti daugiau chitozано azidavimo TFA variacijų nebuvo galimybių. Gautas TFA azidintas chitozanas buvo tirpus parūgštintame vandenyje, todėl panaudotas kopolimerų sintezei.

Chitozано *N*-azidavimui naudotas ir imidazol-1-sulfonilazido hidrochloridas (ISA). ISA galima nesunkiai pasigaminti dideliais kiekiais iš imidazolo, sulfonilchlorido ir natrio azido (3.3 schema) [160].



3.3 schema. Imidazol-1-sulfonilazido hidrochlorido sintezė

ISA, kaip ir TFA, naudojamas diazopernašos reakcijose, kurių metu pirminė aminogrupė pakeičiama į azidą. Imidazol-1-sulfonato (imidazilato) grupė yra puikus nukleofugas (*nukleofugas – atskylanti nukleofilinė grupė*,

anijonas) ir pasižymi panašiu reakingumu kaip ir trifluormetansulfonatas. ISA, kaip ir TFA, yra geras diazopernašos reagentas, tačiau, skirtingai nei TFA, jo sintezė daug pigesnė, lengviau pašalinami pašaliniai produktai. Be to, priešingai nei CHA ar TFA, yra kristalinės būsenos, lengvai dozuojuama medžiaga.

Chitozano azidinimas su ISA vykdomas vandens/metanolio mišinyje, reakciją katalizuojant $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ir greitinant baze. Nustatyta, kad chitozano azidinimo ISA rezultatai priklauso nuo reagentų santykio, o taip pat ir nuo naudojamos bazės prigimties bei kiekio (3.3 lentelė).

3.3 lentelė. Chitozano azidinimas, naudojant ISA

Nr	Bazė	Medžiagų molinis santykis				t, dienos	Išeiga %	AL* %
		Chz	Bazė	ISA	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$			
1	Et_3N	1	1,62	3,01	0,03	8	91,3	13,8
2	Na_2CO_3	1	2,66	1,20	0,01	16	96,0	59,2
3	NaHCO_3	1	11,63	10,2	0,10	1	86,7	64,4
4	NaHCO_3	1	5,79	5,10	0,04	2	96,3	61,3
5	NaHCO_3	1	14,29	10,0	0,10	2	54,4	49,7

* - AL nustatytas iš FT-IR spektrų duomenų.

Azidinimo procedūra šiuo būdu buvo vykdoma tol, kol aminograpių azidintame produkte liko mažiau nei 0,5 % (aminograpių kiekis buvo vertinamas atliekant Kaiser testą [51]).

Chitozano azidinimas, naudojant 3-kartinį ISA perteklių ir mišinį šarminant trietilaminu (Et_3N), nebuvo sėkmingas. Gauta produkto AL siekė vos 13 %. Trietilaminą pakeitus Na_2CO_3 ir naudojant 1,2-kartinį ISA perteklių, reakcija buvo lėtesnė, bet pasiektas žymiai didesnis azidinimo laipsnis – 59 %. Deja, gautas produktas buvo netirpus rūgštinėje terpėje. Naudojant 10-kartinį ISA perteklių ir kaip bazę pasirinkus NaHCO_3 , reakcijos trukmė sumažėjo iki vienos dienos, tačiau produktas, nors ir didelio AL (3.3 lentelė, Nr. 3), taip pat buvo netirpus. Akivaizdu, kad azidinimo reakcijos greitį įtakoja ne tik didelis ISA, bet ir didelis NaHCO_3 perteklius, dėl kurio reakcijos terpė tampa neutralia

ar net silpnai šarminė. Kaip matyti iš 3.3 lentelės, maksimalus chitozano azidavimo laipsnis šiuo būdu yra apie 59-64,4 %.

Reikia pastebėti, kad chitozano azidavimas, terpę šarminant Na_2CO_3 ar NaHCO_3 , vyko heterogeninėmis ar pusiauheterogeninėmis sąlygomis. Siekiant įvertinti azidavimo galimybes pilnai heterogeninėmis sąlygomis, chitozanas prieš reakciją buvo disperguotas metanolyje ir azidintas esant dideliame ISA bei NaHCO_3 pertekliui (3.3 lentelė, Nr. 5). Gauti blogesni rezultatai: mažesnis AL bei išeiga, be to, produktas taip pat buvo netirpus.

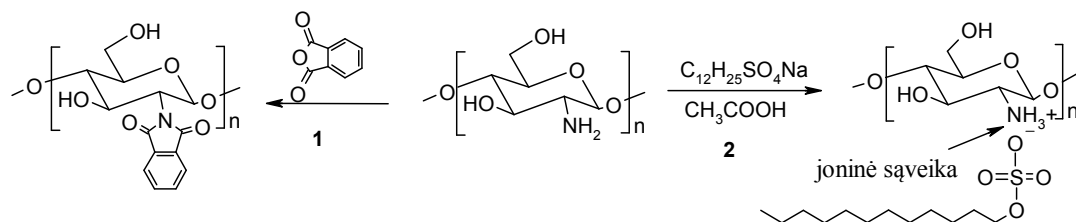
Analizuojant gautus produktus nustatyta, kad efektyviausias chitozano azidantis reagentas yra ISA. Naudojant ISA, gauti didžiausio azidavimo laipsnio (AL 65 %) produktai, tačiau jie, deja, buvo netirpūs nei vandeninėje terpėje, nei įprastuose organiniuose tirpikliuose. Manoma, kad netirpumas galėjo atsirasti dėl kelių priežasčių. Pirmiausia, esant dideliame azidavimo laipsniui (apie 65 %), azidinti chitozano dariniai gali netirpti vandeninėje terpėje dėl per mažo aminogrupių kiekio (jų liko tik apie 7 %, nes chitozano deacetilavimo laipsnis yra 72 %). Taip pat įtakos gali turėti azidavimo reakcijoje naudojamas $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Sulfato jonai ir chitozano aminogrupės gali sudaryti joninius ryšius, dėl kurių susidariusios kompaktiškos struktūros gali tapti neprieinamos vandens molekulėms. Įdomiausia tai, kad ISA azidintus chitozano darinius pavyko ištirpinti 5 % LiCl tirpale *N*-metil-2-pirolidone. Kaip žinoma [167], tai yra vienas iš nedaugelio tirpiklių, galinčių ištirpinti chitiną. Remiantis šiais duomenimis galima manyti, kad: 1) azidintas chitozanas tampa netirpus ne dėl susiuvimo ar azidavimo metu vykstančių pašalinių reakcijų; 2) kai AL yra apie 60 %, azidinto chitozano grandinės konformacija ir tarpmolekulinės sąveikos tampa panašios į chitino, todėl ir jų tirpumas panašus.

Taigi, iš visų išmėgintų azidavimo metodų labiausiai tinkamu galima laikyti azidavimą trifluormetansulfonilazidu. Naudojant TFA, susidaro tirpūs vandeninėje terpėje pakankamai didelio azidavimo laipsnio (AL 40 %) chitozano dariniai, kurie yra tinkami „klinikimo“ reakcijai.

3.1.2. Chitozano aminogrupių apsauga

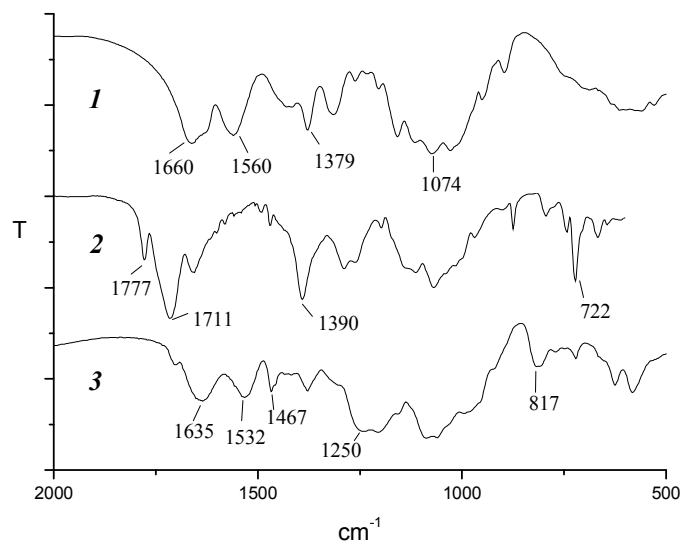
Norint selektyviai modifikuoti chitozaną per *C*(6) hidroksigrupę, pirmiau reikia apsaugoti reaktingesnes aminogrupes, kurios taip pat dalyvauja reakcijose, būdingose chitozano hidroksigrupėms. Diazopernašos arba azidinimo reakcijoje aminogrupė taip pat yra žymiai reaktingesnė nei *C*(6) hidroksigrupė, todėl, norint gauti *O*-modifikuotą chitozaną, aminogrupę būtina apsaugoti.

Chitozano aminogrupių apsaugai dažniausiai naudojami aldehidai ir anhidridai [166,167]. Pagrindinis apsaugančiai grupei keliamas reikalavimas – ji turi būti lengvai ir pilnai pašalinama, susintetinus numatytą junginį. Ftalio rūgšties anhidridas yra vienas iš patikimiausių ir patogiausių reagentų aminogrupėms apsaugoti (3.4 schema, 1). Gautas *N*-ftaloilchitozanas yra tirpus daugelyje įprastų organinių tirpiklių (piridine, DMF, DMSO, DMA), o tai yra labai svarbu tolimesniam chitozano modifikavimui. Be to, ftaloilgrupė lengvai pašalinama, vėl gaunant laisvas aminogrupes [167].



3.4 schema. Chitozano aminogrupių apsaugojimas ftalio rūgšties anhidridu (1) ir dodecilsulfatu (2)

Chitozano ftalinimo reakcija buvo vykdoma aukštoje temperatūroje (120-130 °C) sausame DMF, esant trigubam ftalio rūgšties anhidrido pertekliui. Reakcijos metu susidaręs *N*-ftaloilchitozanas ištirpsta reakcijos terpėje. *N*-ftaloilchitozanas buvo identifikuotas iš FT-IR spektro (3.3 pav.), kuriame matyti sugerties juostos ties 1711 ir 1777 cm^{-1} , priskiriamos karbonilgrupei, bei sugerties juostos ties 722 cm^{-1} , priskiriamos ftaloilgrupės aromatiniam žiedui. Sugerties juostos ties 1390 ir 1287 cm^{-1} gali būti priskirtos deformaciniams -CH_2 grupės virpesiams.



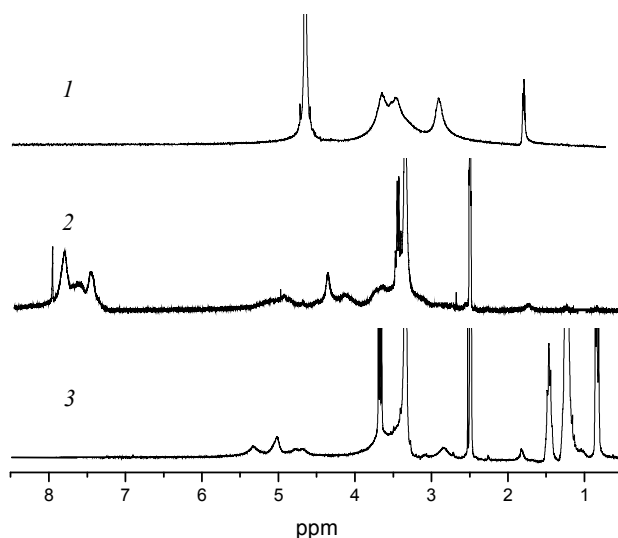
3.3 pav. Chitozano (1), *N*-ftaloilchitozano (2) ir chitozano/dodecilsulfato komplekso (3) FT-IR spektrai

Kjeldalio būdu nustatius azoto kiekį *N*-ftaloilchitozane apskaičiuota, kad chitozano aminogrupių apsaugos laipsnis siekia 104-110 %. Kadangi apsaugos laipsnis >100 %, galima įtarti, kad reakcijoje su ftalio rūgšties anhidridu dalyvavo ir dalis chitozano hidroksigrupių.

Nors ftalio rūgšties anhidridas ir yra vienas iš dažniausiai naudojamų būdų aminogrupių apsaugai, tačiau žinoma [165,166], kad ftalinimo-deftalinimo metu skaldoma pagrindinė chitozano grandinė, reakcija vyksta agresyviomis sąlygomis, ir tuo pačiu gaunami mažos molekulinės masės dariniai. Be to, kai kuriuose šaltiniuose teigiama [168], kad deftalinimas hidrazino monohidratu vyksta sunkiai, ir galutiniame produkte gali likti iki 20 % ftaloilgrupių. Dėl šių priežasčių kaip alternatyvą aminogrupių apsaugai panaudojome chitozano kompleksavimą natrio dodecilsulfatu. Tai vienas iš paprasčiausių būdų gauti organiniuose tirpikliuose tirpius tarpinius chitozano darinius.

Polielektrolitams kompleksuojantis su priešingą krūvį turinčiomis medžiagomis, jų tirpumas įprastuose organiniuose tirpikliuose gali žymiai padidėti. Chitozano/dodecilsulfato kompleksas (CDK) buvo gautas sumaišant chitozano ir natrio dodecilsulfato vandeninius tirpalus 2 % acto rūgštyje,

naudojant ekvimolinius medžiagų kiekius. CDK paruošimas gana išsamiai aprašytas [157], todėl kitokie chitozано-natrio dodecilsulfato santykiai nebuvo naudoti. Žinoma, kad kompleksas pradeda tirpti DMSO, kai natrio dodecilsulfato/chitozано molinis santykis yra 0,25.



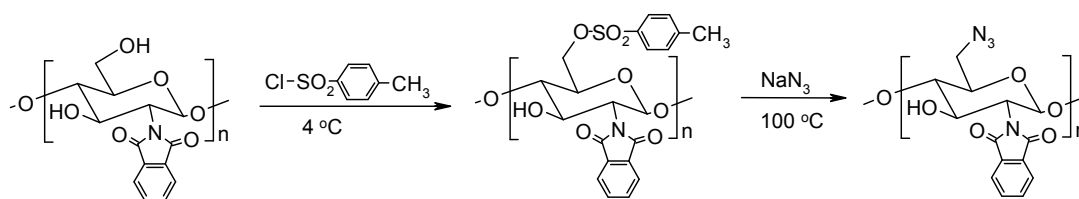
3.4 pav. Chitozано (D_2O /acto rūgštis- d_4) (1), *N*-ftaloilchitozано ($DMSO-d_6$) (2) ir CDK ($DMSO-d_6$) (3) 1H BMR spektrai

CDK susidarymas buvo patvirtintas FT-IR ir 1H BMR spektrų pagalba. FT-IR spektre (3.3 pav.) be chitozано būdingų sugerties juostų galima matyti ir dodecilsulfatui būdingas sugerties juostas ties 1250 cm^{-1} (S=O) ir 817 cm^{-1} (C-O-S). 1H -BMR spektre (3.4 pav.) taip pat matomi dodecilsulfatui būdingi signalai: 0,85 ppm (CH_3), 1,25 ppm ($-(CH_2)_9-$), 1,49 ppm ($-\underline{CH_2}CH_2-O$), 3,69 ppm ($-\underline{CH_2}CH_2-O$). Lyginant CDK metilgrupės (0,85 ppm) dodecilsulfato liekanoje ir chitozано H-2 (2,85 ppm) signalų intensyvumus nustatyta, kad aminogrupių apsaugos laipsnis yra 72 %, t.y., visos aminogrupės apsaugotos.

Aminogrupių apsaugojimas tiek ftalio rūgšties anhidridu, tiek ir natrio dodecilsulfatu vyksta pilnai, t.y., visos aminogrupės apsaugomos. Abiem atvejais gauti produktai tirpūs organiniuose tirpikliuose ir gali būti sėkmingai naudojami tolimesniam modifikavimui.

3.1.3. C(6)-funkcionalizuotų N-apsaugoto chitozano darinių sintezė

C(6)-azidintas N-ftaloilchitozanas gaunamas per dvi stadijas. Pirmiausia atliekamas N-ftaloilchitozano tozilinimas, o toliau gautas 6-O-(4-metilbenzensulfonil)-N-ftaloilchitozanas azidinamas NaN_3 . 4-Metilbenzensulfonilgrupė (tozil-) yra viena efektyviausių nueinančių grupių ir yra plačiai naudojama angliavandenių chemijoje [169]. Naudojant tozilchloridą, angliavandenių esterinimą galima atlikti regioselektyviai, kadangi pirminės hidroksigrupės reakcijoje dalyvauja lengviau nei antrinės. Tozilinimo reakcija vykdoma dalyvaujant trietilaminui, kuris reikalingas susidarančiai druskos rūgščiai neutralizuoti. Kadangi chitino ir chitozano piranozės grandys yra sujungtos eteriniais ryšiais, kuriuos lengvai ardo rūgštys, todėl tozilinimo reakciją vykdant be trietilamino pagrindinė šių polisacharidų grandinė galėtų skilti. Didelę įtaką tozilinimo reakcijai turi reakcijos temperatūra, trukmė ir naudojamų medžiagų santykis. N-ftaloilchitozaną veikiant 10-kartiniu tozilchlorido pertekliumi dimetilacetamido (DMA) tirpale, gautas didelio tozilinimo laipsnio 6-O-(4-metilbenzensulfonil)-N-ftaloilchitozanas, pasiekiant geras išeigas (68 %) (3.5 schema). Tozilinimo laipsnis, apskaičiuotas iš azoto kiekio ($N = 3,38\%$), siekia 99 %.



3.5 schema. 6-O-(4-Metilbenzensulfonil)-N-ftaloilchitozano ir C(6)-azido-N-ftaloilchitozano sintezė

C(6)-Azidintas chitozanas gaunamas nukleofilinio pakeitimo reakcijos metu, kuomet nueinanti tozilgrupė pakeičiama azidogrupe (3.5 schema). Reakcija vykdoma DMF/vandens mišinyje, naudojant 5-kartinį natrio azido perteklių. Chitozano azidinimo laipsnis, apskaičiuotas iš Kjeldalio metodu nustatyto azoto kiekio, buvo 57 % (3.4 lentelė). Sėkmingą azidinimo reakciją

patvirtina ir FT-IR spektras, kuriame matyti azidui būdinga intensyvi sugerties juosta ties 2110 cm^{-1} . 6-*O*-tozil-*N*-ftaloilchitozано azidinimą vykdant šarminėje terpėje (3.4 lentelė, Nr. 2), reakcija vyksta labai sunkiai ir ftaloilchitozано azidinimo laipsnis tesiekia 6 %.

3.4 lentelė. *N*-Ftaloilchitozано azidinimo rezultatai

Nr.	Azidinimui naudotas chitozано darinys	Molinis santykis		N, %	AL _N , %	Išeiga, %
		Chz**	NaN ₃			
1	6- <i>O</i> -tozil- <i>N</i> -ftaloilchitozanas	1	5	11,6	57	73
2*	6- <i>O</i> -tozil- <i>N</i> -ftaloilchitozanas	1	5	5,18	6	61
3	6- <i>O</i> -mezil- <i>N</i> -ftaloilchitozanas	1	5	11,46	50	54

2* – azido sintezė, naudojant 10-kartinį NaOH perteklių;

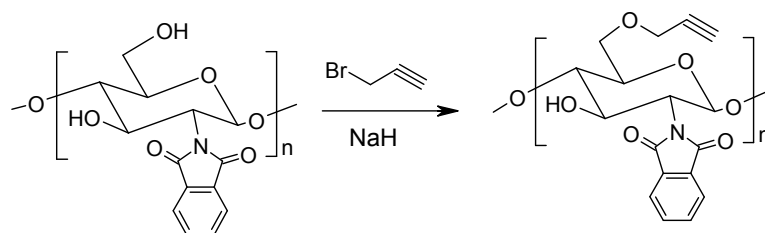
Chz** – azidinimui naudojamas chitozано darinys.

Buvo bandoma azidinti ir mezilintą *N*-ftaloilchitozано darinį. Metansulfonilgrupė (mezil-), kaip ir tozil-, yra labai reaktinga nueinanti grupė, todėl taip pat gali būti plačiai taikoma pakeitimo reakcijoms. 6-*O*-mezil-*N*-ftaloilchitozanas gaunamas pagal tą pačią metodiką kaip ir 6-*O*-tozil-*N*-ftaloilchitozanas, vietoj tozilchlorido naudojant metansulfonilchloridą. Azidinant mezilintą chitozано darinį, buvo pasiektas ne didesnis kaip 50 % AL, todėl „klik“ reakcijai jis nebuvo naudojamas.

Alkino grupę turintis *C*(6)-propargil-*N*-ftaloilchitozanas gaunamas *N*-ftaloilchitozaną veikiant propargilbromidu, reakciją katalizuojant natrio hidridu (3.6 schema). *N*-ftaloilchitozано alkilinimo laipsnio nustatymas iš ¹H BMR spektrų yra problematiškas, nes propargilgrupės signalai persikloja su plačiu chitozано grandinės ar naudojamo tirpiklio (DMSO) signalu. Atsižvelgiant į tai, kad propargilhalogenidas lengvai reaguoja su hidroksigrupe [170], buvo priimta prielaida, kad *N*-ftaloilchitozано alkilinimo laipsnis taip pat yra aukštas ir viršija 90 %.

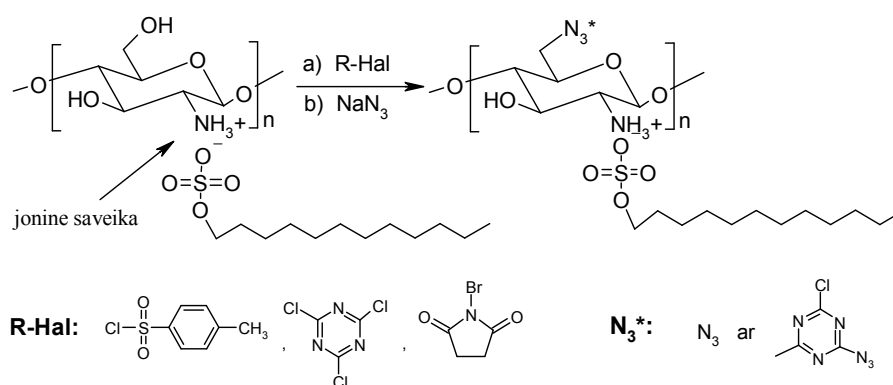
Kaip jau minėta, ftalinimo-deftalinimo metu vyksta chitozано grandinės destrukcija. Norint gauti didesnės molekulinės masės chitozано *O*-modifikuotus kopolimerus, būtina naudoti chitozано junginius, aminogrupių

apsaugai naudojant kitus būdai. Kaip alternatyva ftalinimui pasirinktas chitozano/dodecilsulfato kompleksas.



3.6 schema. *N*-Ftaloilchitozano *O*-alkilinimas

Buvo išmėginti trys CDK „aktyvavimo“ būdai, kuriais pavyko gauti azidintą chitozaną, įeinantį į CDK. CDK „aktyvavimas“ buvo vykdomas 4 % LiCl/DMA tirpale, veikiant *N*-bromosukcinimido, 4-metilbenzensulfonilchlorido (tozilchlorido) ar trichlorotriazino pertekliumi (3.7 schema).



3.7 schema. CDK azidinimas

Sėkminga chitozano, įeinančio į CDK, „aktyvacija“ (aktyvių halogenidų įterpimas) įrodyta elementinės analizės duomenimis, FT-IR ir ^1H BMR spektrais. CDK brominimo laipsnis (%), apskaičiuotas iš kovalentiškai prisijungusio bromo kiekio, siekė 91 % (3.5 lentelė). Tozilinimo laipsnis, apskaičiuotas iš ^1H BMR spektro, lyginant tozilgrupės ties 7,5-7,8 ppm ir chitozano H-2 ties 2,9 ppm protonų signalus, buvo 98 %. Dichlorotriazino liekanos kiekis, kiekybiškai įvertintas iš chloro kiekio, siekė tik 23 %. FT-IR spektre (3.5 pav., 2) matoma silpna triazinui būdinga sugerties juosta ties 1548 cm^{-1} taip pat patvirtino mažą chitozano „aktyvavimo“ laipsnį.

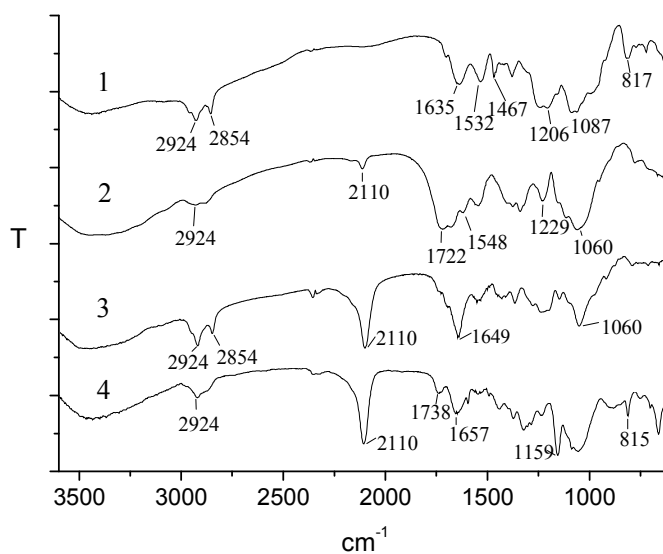
3.5 lentelė. CDK „aktyvavimo“ rezultatai

Nr.	„Aktyvuojantis“ reagentas R-Hal	Molinis santykis *		Hal, %	„Aktyvavimo“ laipsnis, %
		CDK	R-Hal		
1	<i>N</i> -bromsukcinimidas	1	10	16,6	91
2	Tozilchloridas	1	16	-	98**
3	Trichlortriazinas	1	8	4,04	23

* – chitozano/dodecilsulfato ir „aktyvuojančio“ reagento molinis santykis;

** – tozilinimo laipsnis buvo apskaičiuotas iš ^1H BMR duomenų.

„Aktyvuotas“ į CDK įeinantis chitozanas buvo azidinamas natrio azidu DMSO tirpale pagal tą pačią metodiką, kaip ir vykdant *N*-ftaloilchitozano azidinimą. Vertinant pagal azido sugerties juostų intensyvumus FT-IR spektruose (3.5 pav.), galima daryti prielaidą, kad geriausiai vyksta CDK, „aktyvuoto“ tozilchloridu, azidinimo reakcija.



3.5 pav. CDK (1), CDK, azidinto naudojant trichlortriazina (2), *N*-bromsukcinimida (3) ir tozilchloridą (4), FT-IR spektrai

Azidinant tozilchloridu „aktyvuotą“ kompleksą, gautas rudos spalvos DMSO tirpus produktas. Jo FT-IR spektre (3.5 pav, 4) atsiranda intensyvi azidui būdinga sugerties juosta ties 2110 cm^{-1} , tačiau išlieka ir tozilgrupės signalai ties 1159 ir 815 cm^{-1} . Iš to galima spręsti, kad CDK azidinimas vyko nepilnai. Be to, sumažėjęs signalas ties 2924 cm^{-1} ir beveik išnykęs ties

2854 cm⁻¹, priskiriami dodecilsulfatui, rodo, kad modifikavimo metu nuo aminograpių dalinai pašalinama apsauga.

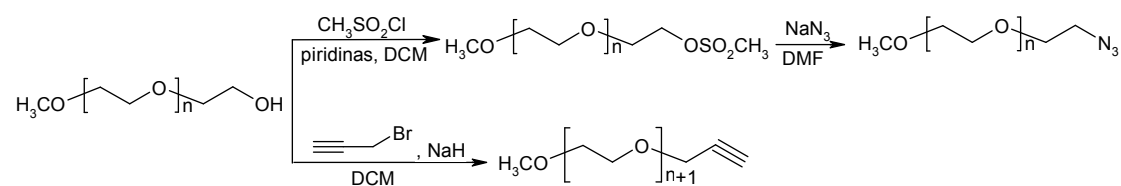
Apibendrinant C(6)-funkcionalizuotų chitozano darinių sintezę galima teigti, kad pavyko gauti C(6) padėtyje azido ar alkino grupes turinčius N-apsaugotus chitozano darinius, kurie gali būti naudojami chitozano-MPEG kopolimerų sintezei „klik“ chemijos būdu.

3.1.4. Metoksi polietilenglikolio „aktyvavimas“

Labai svarbu pasiekti kuo didesnę MPEG „aktyvavimo“ laipsnį. Beveik vienodos pradinio MPEG ir jo darinių molekulinės masės (ypač jei naudojamas gana didelės molekulinės masės (≥2000) MPEG) bei vienodi tirpumai įvairiuose tirpikliuose ir tirpiklių mišiniuose labai apsunkina gryninimą – „aktyvuoto“ MPEG atskyrimas nuo pradinio beveik neįmanomas.

Norint MPEG panaudoti „klik“ reakcijoje, jį taip pat reikia „aktyvuoti“, t.y., į MPEG įvesti arba azido, arba alkino grupes. N-„klikinimo“ atveju buvo naudotas MPEG azidas, tuo tarpu O-„klikinimo“ – tiek azidas, tiek alkinas.

MPEG alkinas gaunamas, MPEG veikiant propargilbromidu, reakciją katalizuojant natrio hidridu (3.8 schema). MPEG alkilinimas buvo vykdomas tetrahidrofurane, tetrahidrofurano/metileno chlorido mišinyje bei metileno chloride (3.6 lentelė).



3.8 schema. MPEG azido (viršuje) ir MPEG alkino (apačioje) sintezės schema

Yra žinoma [170], kad reakcijos tarp propargilbromido ir hidroksigrapių dažnai vykdomos tetrahidrofurane (THF). Deja, žemoje temperatūroje MPEG-2000 netirpsta THF, ir tai apsunkina reakciją. Siekiant tirpumą pagerinti, THF buvo maišomas su metileno chloridu.

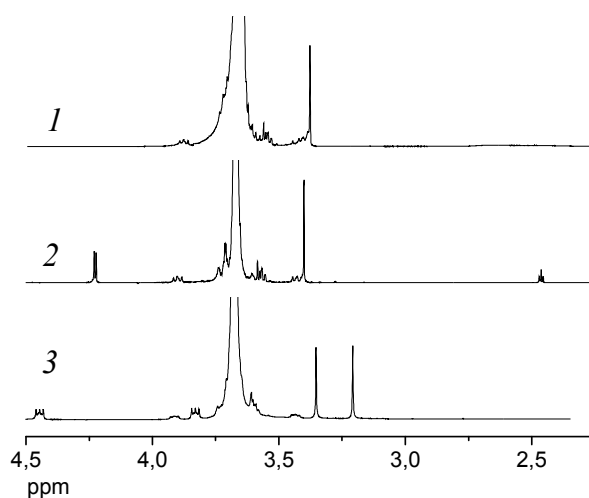
3.6 lentelė. MPEG alkino sintezės rezultatai

Nr.	Molinis santykis		Tirpiklis	PL, %	Išeiga, %
	MPEG	Propargil-*			
1	1	2,2	THF	69	83
2	1	2,2	THF/metileno chloridas (v/v, 10/1)	77	88
3	1	2,2	Metileno chloridas	96	80
4	1	1,2	Metileno chloridas	53	77

* propargilbromidas (Nr. 1-3) arba propargilchlorformiatas (Nr. 4)

Reakcija geriausiai vyko metileno chloride, kuriame tirpsta tiek MPEG, tiek propargilbromidas, tiek ir reakcijos produktai. Lyginant pradinio ir alkilinto MPEG ^1H BMR spektrus matyti (3.6 pav.), kad atsiranda nauji signalai ties 4,22 ir 2,46 ppm, priskiriami propargilo grupės atitinkamai - $\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ir $-\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ protonams. MPEG pakeitimo laipsnis (%), apskaičiuotas iš acetileno grupės protonams priskiriamų signalų ties 2,46 ar 4,22 ppm ir metoksigrupės protonų signalo ties 3,38 ppm integralų santykio, siekia 96 %.

MPEG alkilinimui buvo išbandytas ir propargilchlorformiatas. Reakcija buvo vykdoma metileno chloride, baze naudojant trietilaminą. Šiuo būdu pasiektas alkilinimo laipsnis (53 %) buvo mažesnis, nei naudojant propargilbromidą.



3.6 pav. MPEG (1), MPEG alkino (2) ir MPEG azido (3) ^1H BMR spektrai (CDCl_3)

MPEG alkinas, kuris kambario temperatūroje yra kieta medžiaga, yra tirpus vandenyje bei daugelyje organinių tirpiklių, išskyrus dietileterį, tetrahidrofuraną ir heksaną.

Paprastai MPEG azido sintezei naudojami tarpiniai MPEG dariniai, turintys lengvai nueinančias grupes, dažniausiai tozil- bei mezilgrupes [171]. MPEG azidas buvo gautas vykdant dvistadijinę reakciją (3.8 schema). Pirmiausia MPEG buvo mezilinamas metansulfonilchloridu, katalizatoriumi naudojant piridiną (šios stadijos išeiga $\approx 98\%$). Sekančioje stadijoje vykdant nukleofilinio pakeitimo reakciją tarp monomezilinto MPEG ir natrio azido susidarė MPEG azidas. MPEG azido susidarymas buvo įrodytas spektroskopiniais metodais: FT-IR spektre atsirado sugerties juosta ties 2105 cm^{-1} , būdinga azido grupės virpesiams, o ^1H BMR spektre atsirado signalas ties 3,2 ppm, priskiriamas MPEG azido CH_2N_3 protonų signalams. MPEG azidinimo laipsnis, nustatytas iš elementinės analizės duomenų (azoto kiekio), yra 65 % (3.7 lentelė).

Buvo bandoma mezilinti MPEG tetrahidrofurane, naudojant metansulfonilchlorido ir trietilamino perteklių. Mezilintą MPEG azidinant NaN_3 , gautas MPEG azidas, tačiau AL siekė tik 26 %. Azidiniui naudojant tozilitą MPEG, AL buvo didesnis (50 %), bet ne maksimalus.

3.7 lentelė. MPEG azidinimo rezultatai

Nr	Tarpinė stadija	Tirpiklis*	Molinis santykis**		N, %	AL, %	Išeiga %
			MPEG	NaN_3			
1	Mezilinimas	Py/ CH_2Cl_2	1	2,5	1,35	65	56
2	Mezilinimas	THF	1	1,5	0,54	26	58
3	Tozilinimas	CH_2Cl_2	1	5	1,03	50	53

* Tirpiklis mezilinimo (tozilinimo) reakcijoje;

** MPEG ir NaN_3 molinis santykis reakcijos mišinyje.

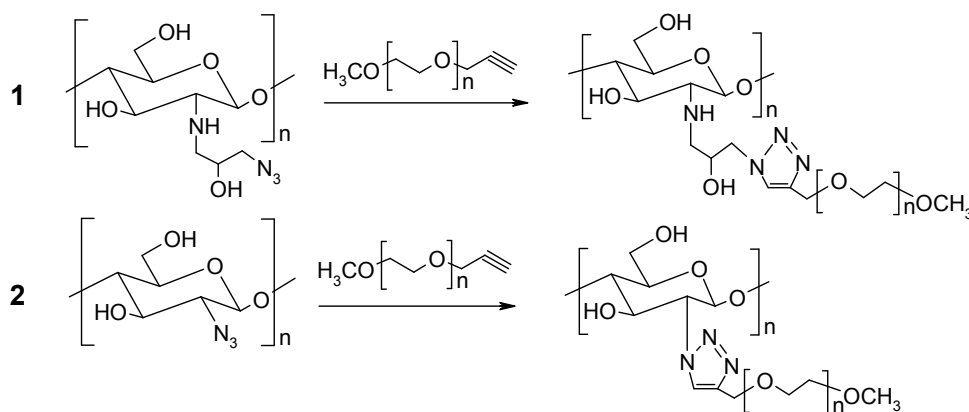
Apibendrinant MPEG „aktyvavimo“ rezultatus galima konstatuoti, kad „klinikiniam“ reikalingi MPEG dariniai, ypač MPEG alkinas, gaunami nesunkiai, pasiekiant pakankamai didelį „aktyvavimo“ laipsnį.

3.2. Chitozano-MPEG kopolimerų sintezė „klik“ chemijos metodu

Chitozano-MPEG skiepytieji kopolimerai perspektyvūs juos panaudojant medicinos, farmacijos, genų inžinerijos ir kt. srityse. Tokių kopolimerų gryninimas nuo nesureagavusio MPEG vis dar išlieka rimta problema, nes įprastais gryninimo metodais, pvz., išsodinimu, dialize, gel-filtracija, gerų rezultatų nepasiekama. Siekiant sumažinti nesureagavusių pradinių medžiagų ir šalutinių produktų kiekį, chitozano-MPEG kopolimerų sintezei panaudota „klik“ chemijos reakcija. Yra žinoma, kad „klik“ reakcijoms priskiriamos Cu(I) katalizuojamos Huisgen 1,3-dipolinės azido-alkino ciklizacijos (CuAAC) metu nesusidaro šalutinių produktų, gaunamos didelės pagrindinių produktų išeigos, juos lengva išskirti, todėl ir buvo nuspręsta šią reakciją pritaikyti chitozano-MPEG kopolimerų sintezei.

3.2.1. Chitozano-*N*-TMPEG kopolimerų sintezė ir savybės

MPEG alkiną prijungiant prie azidinto chitozano Cu(I) katalizuojamos Huisgen 1,3-dipolinės azido-alkino ciklizacijos būdu, gauti skirtingo pakeitimo laipsnio triazolilgrupę turintys chitozano-*N*-TMPEG kopolimerai (3.9 schema).



3.9 schema. Chitozano-*N*-TMPEG kopolimerų sintezės schema: 1 – iš CHA azidinto chitozano; 2 – iš TFA azidinto chitozano

Nors chitozanas buvo azidinamas 4-iais būdais, kopolimerų sintezei naudoti tik epichlorhidrino azidu (CHA) bei trifluormetansulfonilazidu (TFA)

azidinti chitozano dariniai. Tiek CHA, tiek TFA azidintas chitozanas yra tirpus parūgštintame vandenyje, jų azidavimo laipsnis (AL) atitinkamai 27 ir 40 %. CuAAC reakcijoms katalizuoti reikiamas Cu(I) kiekis gaunamas natrio askorbatu redukuojant Cu(II), esantį $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

„Klikinimo“ reakcija buvo vykdoma vandens ir metileno chlorido mišinyje. Yra žinoma [31], kad reakcijos trukmė šioje terpėje, lyginant su kitomis *ko*-tirpiklių sistemomis, žymiai sutrumpėja, gaunamos geros produktų išeigos, nereikia naudoti bazinių priedų. *N*-„klikinimo“ rezultatai pateikti 3.8 lentelėje. Keičiant pradinių reagentų santykius pasiekta, kad chitozano pakeitimo metoksipolietilenglikoliu laipsnis (PL) kito nuo 13 iki 40 %.

3.8 lentelė. Chitozano-*N*-TMPEG kopolimerų sintezės rezultatai

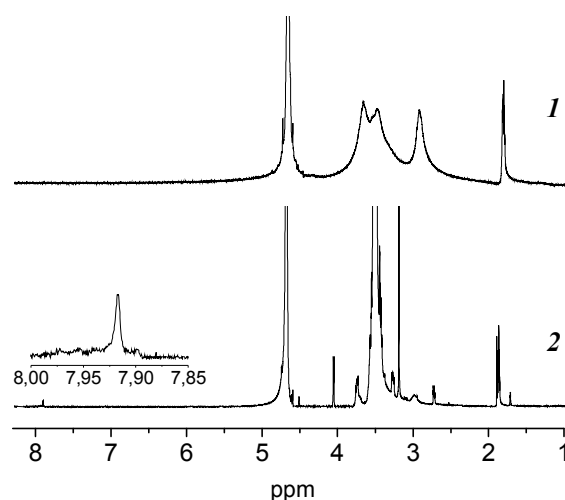
Nr	Chitozaną azidinti medžiaga	Molinis santykis*		NH ₂ , %	PL, % (NH ₂)	PL, % (BMR)	[η], dL/g
		Chz	MPEG				
1	CHA	1	0,2	1,82	15	13	1,52
2		1	0,3	1,42	21	20	1,41
3		1	0,4	0,91	28	26	0,58
4	TFA	1	0,2	1,64	17	15	1,59
5		1	0,4	0,68	35	32	0,77
6		1	0,5	0,47	41	40	0,49

* - chitozano azido ir MPEG alkinio molinis santykis reakcijos mišinyje

Buvo pastebėta, kad azidintam chitozanui reaguojant su MPEG alkinu, esant ekvimoliniam santykiui ar net MPEG trūkumui, dalis MPEG lieka nesureagavusio ar dalyvauja pašalinėse reakcijose. Panaši tendencija jau anksčiau pastebėta modifikuojant kitus polisacharidus: didelio pakeitimo laipsnio azidinta celiuliozė reagavo su alkinu grupę turinčiais reagentais tik esant dideliame pastarųjų pertekliui [32]. Reikalingas MPEG alkinio perteklius priklauso nuo chitozano azidavimo metodikos ir buvo didesnis, naudojant CHA azidintą chitozaną. Naudojant 20-40 % MPEG alkinio perteklių, buvo susintetinti skiepytieji chitozano-*N*-TMPEG kopolimerai, kuriuose PL lygus naudojamo chitozano azidavimo laipsniui (3.8 lentelė, Nr. 3 ir 6). Taigi,

pasinaudojus „klik“ chemijos metodu, buvo pasiektas maksimalus (pagal azidavimo laipsnį galimas) chitozano pakeitimo laipsnis.

^1H BMR spektrai patvirtino chitozano-*N*-TMPEG kopolimerų susidarymą ir buvo panaudoti kopolimerų sudėčiai skaičiuoti (3.7 pav.). Silpnas signalas ties 7,9 ppm, priskiriamas triazolo žiedo protonui, patvirtina, kad MPEG prie pagrindinės chitozano grandinės prijungiamas per triazolildarinį.

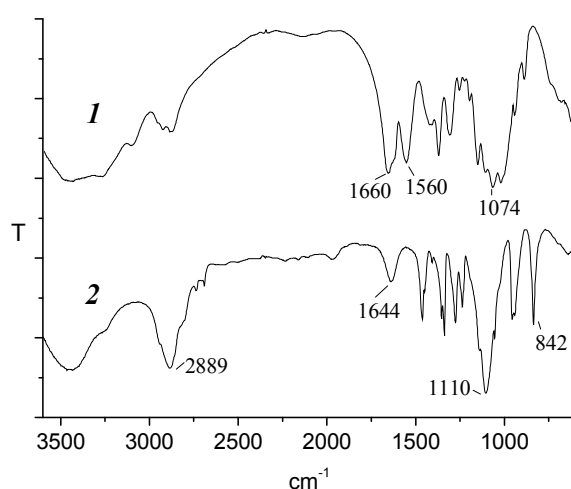


3.7 pav. Chitozano (1) ir chitozano-*N*-TMPEG kopolimero (PL 26 %) (2) ^1H BMR spektrai ($\text{D}_2\text{O}/\text{acto rūgštis-}d_4$)

^1H BMR spektre taip pat matomas stiprus MPEG oksimetilengrupių protonų signalas ties 3,2-3,8 ppm, kuris persikloja su chitozano grandinės H 3-6 protonų signalais. Signalas ties 2,9-3,1 ppm priskiriamas chitozano grandinės H-2 protonams. Kopolimerų BMR spektre išlikę propargilgrupės signalai (dažnai silpni) ties 4,05 ($\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$) ir 2,68 ppm ($\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$) rodo, kad yra likusio nesureagavusio MPEG alkino. Be to, tai patvirtina, kad dializė nėra veiksmingas kopolimerų gryninimo nuo nesureagavusio oligomerinio MPEG alkino būdas.

Chitozano PL jo kopolimeruose galima apskaičiuoti iš ^1H BMR spektrų. Skaičiavimas remiasi chitozano acetilgrupės signalo ties 1,7-1,9 ppm ir signalo ties 3,3 ppm, priskiriamo MPEG metoksigrupės protonams, santykiu. ^1H BMR analizės duomenys gerai sutampa su cheminės analizės rezultatais (3.8 lentelė).

Chitozano-*N*-TMPEG kopolimerų FT-IR spektruose matyti tiek chitozanui, tiek ir MPEG būdingos sugerties juostos (3.8 pav.). Skiepytųjų kopolimerų spektruose matomos MPEG būdingos sugerties juostos ties 1110 cm^{-1} (C-O virpesiai), 2889 cm^{-1} (C-H) ir 842 cm^{-1} (metileno grupės virpesiai). Chitozano sugerties juostos ties 1660 ir 1560 cm^{-1} , priskiriamos amidiniams ryšiams, esant dideliame PL, išnyksta. Kopolimeruose nelieka azido grupei būdingos sugerties juostos ties 2110 cm^{-1} .



3.8 pav. Chitozano (1) ir chitozano-*N*-TMPEG kopolimero (PL 26 %) (2) FT-IR spektrai

Dauguma chitozano-*N*-TMPEG kopolimerų, nepriklausomai nuo PL ir nuo reakcijai naudoto chitozano azidavimo būdo, buvo netirpūs vandenyje, tačiau tirpo acetatiniame buferyje (pH 3,7). Toks neįprastas kopolimerų elgesys gali būti susijęs su 1,4-pakeisto 1,2,3-triazolo žiedo, kuris gali pasižymėti kompleksuojančiomis savybėmis ir padidinti vandenilinių ryšių tinklą, susidarymu „klikinimo“ reakcijos metu.

Chitozano-*N*-TMPEG kopolimerų ribinis klampos skaičius acetatiniame buferyje yra santykinai didelis, o tai leidžia tikėtis, kad jų molekulinė masė didelė [172]. Ribinis klampos skaičius mažėja didėjant PL: PL kintant nuo 15 iki 28 %, $[\eta]$ sumažėja nuo 1,52 iki 0,58 dL/g (3.8 lentelė). Nepaisant to, chitozano darinių molekulinę sietų chromatografijos (MSC) matavimai parodė, kad „klikinimo“ metu vyksta žymi chitozano grandinės destrukcija:

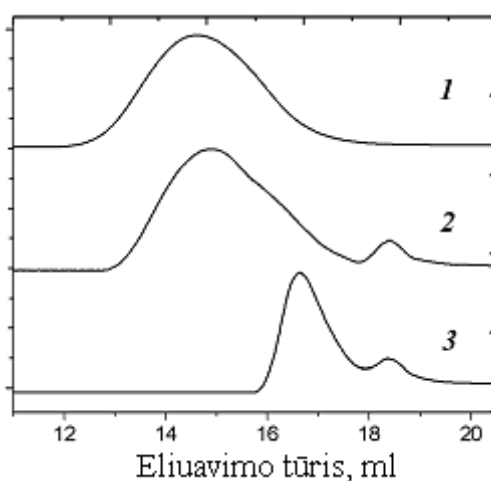
chitozano-*N*-TMPEG kopolimerų M_w yra apie $20 \cdot 10^3$ - $40 \cdot 10^3$, o M_n – apie $10 \cdot 10^3$ (3.9 lentelė). Šios vertės yra viena – dviem eilėmis mažesnės, nei tikėtasi iš chitozano, kurio M_w $305 \cdot 10^3$, darinių.

3.9 lentelė. Chitozano-*N*-TMPEG kopolimerų tyrimo rezultatai

Nr*	Polimeras	PL, % (NH ₂)	$M_w \cdot 10^{-3}$	$M_n \cdot 10^{-3}$	M_w/M_n	Cu, ppm
	Chitozanas	-	305	218	1,40	-
2	Chz- <i>N</i> -TMPEG	21	21,2	8,9	2,38	157±3
3	Chz- <i>N</i> -TMPEG	28	18,9	7,9	2,39	86±1
5	Chz- <i>N</i> -TMPEG	35	44,8	10,5	4,27	75±2

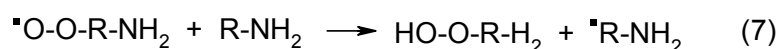
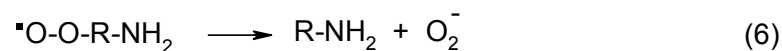
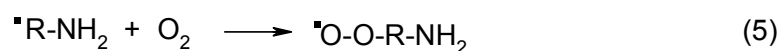
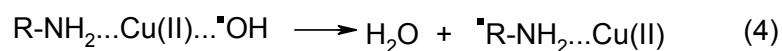
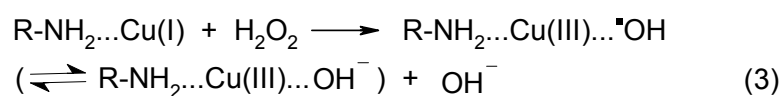
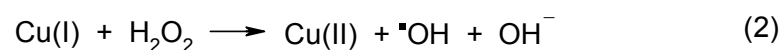
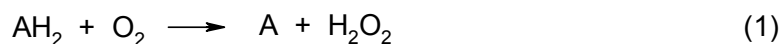
* Nr atitinka medžiagų eiliškumą 3.8 lentelėje

Chitozano-*N*-TMPEG kopolimerų eliuavimo kreivės MSC yra bimodalinės (3.9 pav.). Antroji smailė, atitinkanti apie 18,5 ml eliuavimo tūrį, priskiriama kopolimero frakcijai, kurios molekulinė masė yra $5 \cdot 10^3$ - $7 \cdot 10^3$. Chitozano-*N*-TMPEG kopolimerų gryninimui dializės būdu naudota membrana 12-14 kDa, todėl dalis mažamolekulės frakcijos galėjo pasišalinti. Taigi, galima manyti, kad Cu katalizuojamo „klikinimo“ metu chitozano destrukcija vyksta dar intensyviau, negu nustatyta MSC.



3.9 pav. Chitozano (1) ir chitozano-*N*-TMPEG kopolimerų (2,3) MSC eliuavimo kreivės. Kopolimerai gauti naudojant: 2 – TFA azidintą chitozaną (3.8 lentelė, Nr. 5); 3 – CHA azidintą chitozaną (3.8 lentelė, Nr. 3)

Chitozano grandinės destrukcija „klikinimo“ metu, katalizatoriumi naudojant Cu(II)/askorbato sistemą, aiškinama hidroksiradikalų ($\cdot\text{OH}$) susidarymu *in situ* [52]. $\cdot\text{OH}$ radikalai gali būti gaunami Fenton reakcijos metu, pereinamųjų metalų redukuotai formai sąveikaujant su H_2O_2 (3.10 schema, 2). H_2O_2 susidaro Cu(II) katalizuojamos O_2 redukcijos Na askorbato (AH_2) metu (3.10 schema, 1).



3.10 schema. Cu(II) katalizuojamo chitozano „klikinimo“ metu vykstančios depolimerizacijos mechanizmas [173]

Chitozano destrukcija aiškinama kompleksų tarp vario jonų ir chitozano aminogrupių susidarymu vandeniniuose tirpaluose [173]. Pagrindinė cheminė reakcija, vykstanti $\cdot\text{OH}$ sąveikaujant su polisacharidais, yra vandenilio abstrakcija (*abstrakcijos reakcija – bimolekulinė reakcija, kurios metu viena molekulė iš kitos atima atomus, elektronus, protonus*). $\cdot\text{OH}$ pritraukia protoną iš vario–aminogrupių komplekso ir jį prisijungia, susidarant vandeniui (3.10 schema, 4); tuo metu prie anglies atomo lieka nesuporuotas elektronas. Karbograndis radikalas prijungia oro deguonį, susidarant peroksiradikalams (5). Peroksiradikalai yra aktyvūs, tačiau nestabilūs, todėl dalyvauja įvairiose prijungimo, skilimo ir persigrupavimo reakcijose.

Tai, kad chitino destrukcija analogiškose sąlygose nevyksta, rodo, kad chitozano depolimerizacijai turi įtakos jo aminogrupės. Todėl chitozanas su mažesniu deacetilinimo laipsniu yra atsparesnis destrukcijai [173]. Šiame

darbe kopolimerų sintezei buvo naudojamas pakankamai didelio deacetilinimo laipsnio chitozanas (DL 72 %), todėl destrukcijos nebuvo išvengta.

Nustatyta [52], kad „klikinimo“ būdu gautuose kopolimeruose lieka didelis Cu kiekis (nuo 200 iki 600 ppm). Chitozано-*N*-TMPEG kopolimeruose buvo rastas gerokai mažesnis Cu kiekis (3.9 lentelė). Tačiau net ir toks Cu kiekis yra nepageidaujamas, ypač jei chitozано-*N*-TMPEG kopolimerai naudojami biotechnologijoje ar medicinoje.

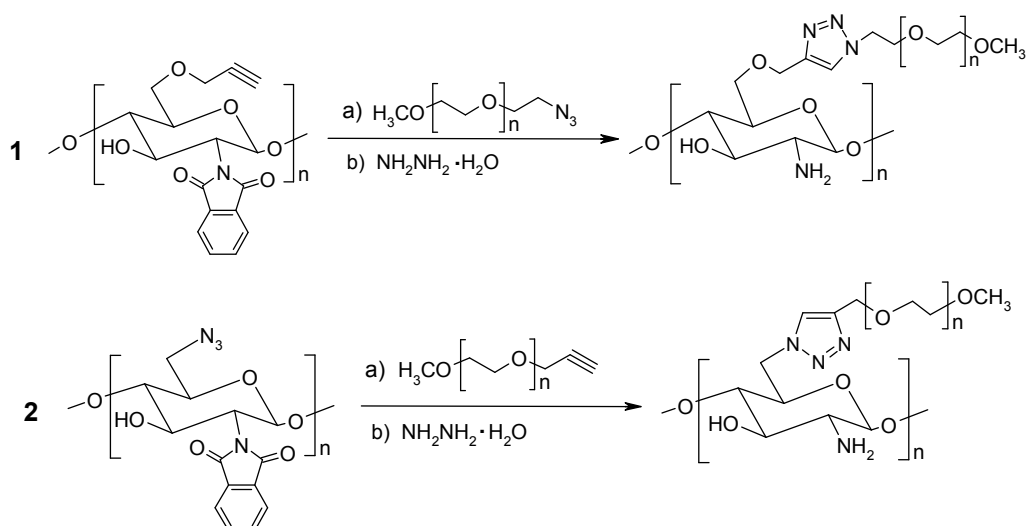
Naudojant vandeninėje terpėje netirpius didelio AL chitozано darinius, „klik“ reakciją buvo bandoma atlikti 5 % LiCl tirpale *N*-metil-2-pirolidone. Deja, produktų FT-IR spektruose neaptikta jokių kopolimerams būdingų sugerties juostų, o išgryninus gautos tik pradinės medžiagos, t.y. azidintas chitozanas ir MPEG alkinas. Nesėkmingo „klikinimo“ priežastis galėjo būti didelė Li(I) koncentracija. Reakcijos metu Li(I) galėjo konkuruoti su Cu(I), ir tokiu būdu žymiai sumažinti jo katalitinį aktyvumą.

Apibendrinant chitozано-*N*-MPEG kopolimerų sintezės „klik“ chemijos būdu rezultatus matyti, kad reakcija pakankamai gerai valdoma, pasiekiamas toks chitozано PL, kokį turi azidinti chitozано dariniai. Deja, „klikinimo“ reakciją katalizuojant Cu(II)/askorbato sistema, vyksta chitozано grandinės destrukcija, todėl gautų darinių molekulinė masė viena – dviem eilėmis mažesnė, negu tikėtasi. „Klikinimo“ būdu gauti chitozано dariniai tirpūs tik rūgštinėje vandeninėje terpėje.

3.2.2. Chitozано-*C*(6)-TMPEG kopolimerų sintezė naudojant *N*-ftaloil-chitozaną

„Klik“ chemijos būdu buvo susintetinti skirtingo pakeitimo laipsnio šepečio struktūros chitozано-*C*(6)-TMPEG kopolimerai. Kopolimerai buvo gauti *C*(6)-azidochitozано ir MPEG alkino arba *C*(6)-propargilchitozано ir MPEG azido 1,3-dipolinės ciklizacijos metu (3.11 schema).

„Klikinimo“ reakcijai vykstant tarp *C*(6)-propargilchitozано ir azidinto MPEG (3.11 schema, 1), o taip pat tarp *C*(6)-azidochitozано ir MPEG alkino (3.11 schema, 2), gaunami labai panašūs rezultatai (3.10 lentelė).



3.11 schema. Chitozano-*C(6)*-TMPEG kopolimerų sintezė “klik” chemijos metodu: 1 – iš *C(6)*-propargilchitozano; 2 – iš *C(6)*-azidochitozano

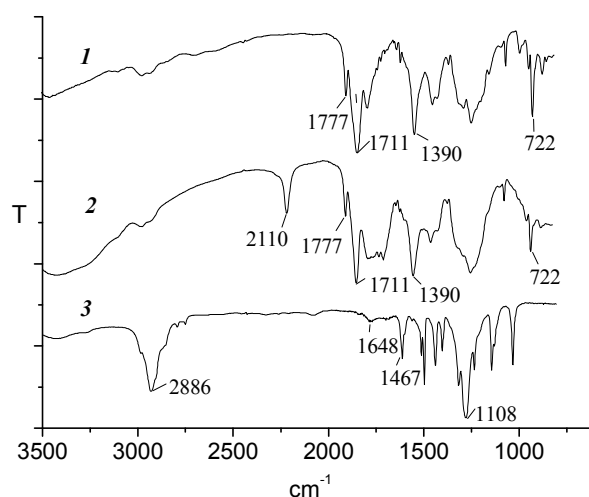
Kaip ir *N*-klikinimo atveju, reakcijai reikalingas Cu(I) kiekis gaunamas Na askorbatu redukuojant $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Nors žinoma [31], kad CuAAC reakcija efektyviau vyksta vandens/metileno chlorido mišinyje, „klikinimas“ per *C(6)*-OH grupę buvo vykdomas vandens/DMSO (1:1, v/v) mišinyje dėl geresnio junginių tirpumo.

3.10 lentelė. Chitozano-*C(6)*-TMPEG kopolimerų tyrimo rezultatai

Nr	Molinis santykis		NH_2 , %	PL_{NH_2} , %	PL_{BMR} , %	$[\eta]$, dL/g
	<i>C(6)</i> -AzidoChz (AL 57%)	MPEG alkinas (PL 93%)				
1	1	0,5	1,10	42	39	0,126
2	1	0,8	0,89	54	50	0,117
3	1	1	0,80	61	59	0,109
	<i>C(6)</i> -Propargil Chz (PL ~90%)	MPEG azidas (AL 65%)				
4	1	0,4	1,72	24	20	0,132
5	1	0,6	1,15	40	36	0,128
6	1	1	0,75	66	64	0,102

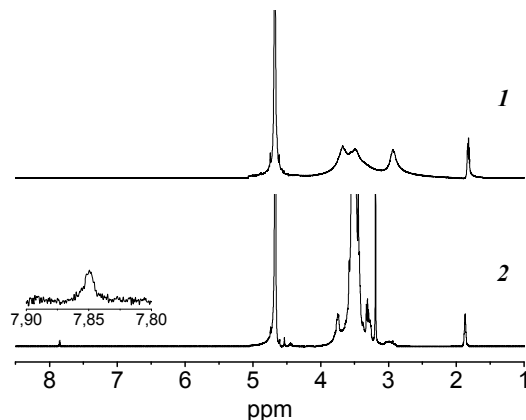
C(6)-azidochitozanui reaguojant su MPEG alkinu, priklausomai nuo pradinių reagentų santykio, chitozano PL skiepytuosiuose kopolimeruose kinta nuo 39 iki 59 %. Šių kopolimerų ribinis klampos skaičius yra mažas ir kinta nuo 0,126 iki 0,109 dL/g. Sintzei naudojant *C(6)*-propargilchitozaną, PL kinta nuo 20 iki 64 %, o ribinis klampos skaičius, didėjant PL, mažėja nuo 0,132 iki 0,102 dL/g. Reikia pastebėti, kad gautų produktų savybės labai panašios ir nepriklauso nuo pradinių medžiagų „aktyvavimo“ būdo.

Chitozano-*C(6)*-TMPEG kopolimerų FT-IR spektre (3.10 pav.) matomos intensyvios būdingos MPEG sugerties juostos ties 1108 cm⁻¹ (C-O) ir 2886 cm⁻¹ (C-H), bei chitozano amidiniams ryšiams priskiriama sugerties juosta ties 1648 cm⁻¹. Azido sugerties juosta ties 2110 cm⁻¹ po „klikinimo“ išnyksta.



3.10 pav. *N*-ftaloilchitozanas (1), *N*-ftaloil-*C(6)*-azidochitozanas (2) ir chitozano-*C(6)*-TMPEG kopolimeras (3) FT-IR spektrai

Kaip ir *N*-„klikinimo“ atveju, ¹H BMR spektrai patvirtino chitozano-MPEG kopolimerų susidarymą ir buvo panaudoti kopolimerų sudėties skaičiavimui (3.11 pav.). Atsiradęs silpnas signalas ties 7,85 ppm, priskiriamas triazolo žiedo protonui, patvirtina, kad MPEG prijungiant prie pagrindinės chitozano grandinės susidaro triazolildarinys. Chitozano pakeitimo laipsnis kopolimeruose buvo apskaičiuotas iš acetilgrupės protonų signalo ties 1,7-1,9 ppm ir MPEG metoksigrupės protonų signalo ties 3,3 ppm santykio.



3.11 pav. Chitozano (1) ir chitozano-*C*(6)-TMPEG kopolimerio (PL 64 %) (2) ¹H BMR spektrai (D₂O/acto rūgštis-d₄)

O-modifikuotų chitozano darinių sintezei naudojant *N*-ftaloilchitozaną, didžiausia problema yra aminogrupių deftalinimas. Chitozano aminogrupių apsaugai naudojant *N*-ftalinimo metodą, chitozano grandinė daugiau ar mažiau skyla. Siekiant parinkti optimalias chitozano-*O*-dekstrano kopolimerų aminogrupių apsaugos sąlygas ir kiek galima sumažinti chitozano grandinės skilimą, buvo ištirtos aminogrupių deftalinimo reakcijos gryname hidrazino monohidrate ir jo tirpaluose DMSO, formamide ir vandenyje [166]. Chitozano-*C*(6)-TMPEG kopolimerus, gautus “klik” chemijos būdu, taip pat buvo bandoma deftalinti hidrazino monohidrato tirpalais DMF, DMSO, formamide, piridine ir vandenyje. Pastebėta, kad kopolimerų ribinis klampos skaičius šiek tiek priklauso nuo aminogrupių apsaugos pašalinimo sąlygų. Mažiausia $[\eta]$ vertė gaunama, deftalinimą atliekant hidrazino monohidrato/vandens mišinyje. Geriausi rezultatai gauti apsaugos pašalinimui naudojant 1,5 M hidrazino tirpalą piridine. Šiuo atveju ribinis klampos skaičius $[\eta]$, lyginant su produktais, gautais naudojant kitas tirpiklių sistemas, buvo apie 1,5 karto didesnis.

Chitozano ir jo “klikintų” darinių deftalinimui buvo naudotas ir metilaminas. Žinoma, kad metilaminas ir dimetilaminopropilaminas buvo sėkmingai panaudoti *N*-aminoftalimido, azetidionų [174] darinių ir dervų aminogrupių deftalinimui. Deja, mūsų tyrimuose aminogrupių apsaugos

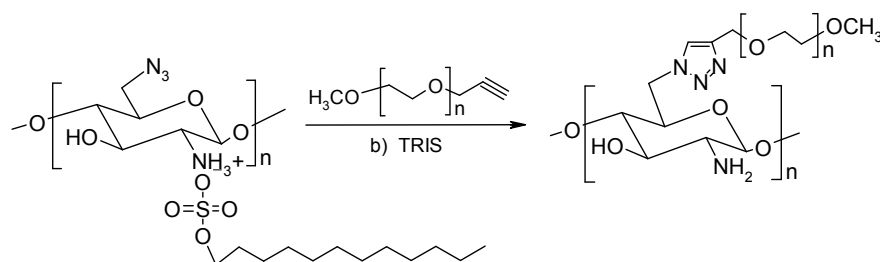
pašalinimas metilaminu nepasiteisino, nes tiek FT-IR, tiek ir ^1H BMR spektruose ftaloilgrupei būdingi signalai išliko, o tai įrodo, kad apsaugos pašalinimas buvo nepilnas.

Sprendžiant iš ribinio klampos skaičiaus $[\eta]$ vertės acetatiniame buferyje, chitozano-*C(6)*-TMPEG kopolimerai yra mažos molekulinės masės produktai. Deja, nepriklausomai nuo PL, kopolimerai, kurių išskyrimui buvo naudotas rotacinis išgarinimas ir vakuuminis džiovinimas, vandenyje buvo netirpūs. Kopolimerų išskyrimui panaudojus liofilizavimą $-40\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje, gautas vandenyje tirpus produktas. Visi mėginiai buvo tirpūs acetatiniame buferyje (pH 3,7).

Apibendrinant chitozano-*C(6)*-TMPEG kopolimerų sintezės „klik“ chemijos būdu rezultatus galima teigti, kad pasiekiamas norimas didelis chitozano PL, tačiau kopolimerai, sprendžiant iš mažo ribinio klampos skaičiaus, yra mažos molekulinės masės dariniai.

3.2.3. Chitozano-*C(6)*-TMPEG kopolimerų sintezė, naudojant dodecilsulfato-chitozano kompleksą

Perspektyvūs ir palyginti mažai tyrinėti yra per *C(6)*-hidroksigrupę modifikuoti chitozano dariniai. Ypač dominantys būtų didelės molekulinės masės chitozano kopolimerai, kuriuose būtų likę laisvos aminogrupės. Siekiant išvengti destruktinių procesų ir gauti didesnės molekulinės masės chitozano-MPEG darinius, „klikinimo“ reakcijai vietoje *N*-ftaloilchitozano buvo panaudotas chitozano/dodecilsulfato kompleksas (CDK). DMSO tirpus azidintas CDK, gautas per tarpinę tozilinimo stadiją, buvo panaudotas „klikinimui“ su MPEG alkinu (3.12 pav).



3.12 pav. Chitozano-*C(6)*-TMPEG sintezė naudojant CDK

Reakcija buvo vykdoma DMSO/vandens mišinyje pagal tą pačią metodiką kaip ir *N*-ftaloilchitozono atveju. Kadangi TRIS gali būti naudojamas dodecilsulfato pašalinimui, „klikinimo“ produkto tirpalas buvo dializuojamas 15 % TRIS tirpale.

Deja, „klik“ reakcija, naudojant chitozono/dodecilsulfato kompleksą, buvo nesėkminga. Analizuojant reakcijos produktą FT-IR, ¹H BMR spektrus, kopolimerams būdingų signalų nerasta. Tai gali būti susiję su daliniu dodecilsulfato anijonų „atsikabinimu“ nuo CDK „klikinimo“ metu. Šie anijonai sąveikauja su tirpale ir katalizatoriuje esančiais Cu katijonais, ir tokiu būdu suardomas katalizatorius ar apsaugomi jo aktyvūs centrai; dėl to „klikinimas“ nevyksta.

3.3. Chitozono katijonizavimas

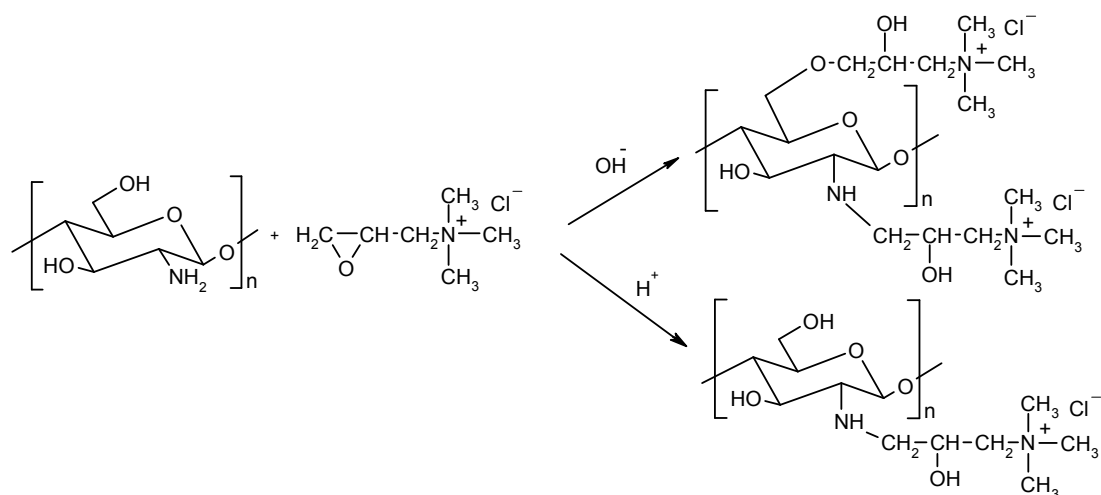
3.3.1. Chitozono katijonizavimas EPTMAC

Katijonizuojančiu reagentu chitozono katijonizavimui pasirinktas *N*-2,3-epoksipropil-*N,N,N*-trimetilamonio chloridas (EPTMAC). Priklausomai nuo terpės, EPTMAC gali reaguoti tiek su amino, tiek ir su hidroksigrupėmis. Rūgštinėje ar neutralioje terpėje su EPTMAC paprastai reaguoja chitozono aminogrupė, o tuo tarpu šarminėje terpėje su EPTMAC, tikėtina, gali reaguoti ir amino, ir hidroksigrupė [90], susidarant *N*- ir *O*-pakeistam chitozanui.

Šiame darbe, naudojant skirtingus reagentų santykius, chitozanas buvo katijonizuojamas *N*-2,3-epoksipropil-*N,N,N*-trimetilamonio chloridu neutralioje, rūgštinėje bei šarminėje terpėse (3.12 schema). Reakcijai vykstant tiek neutralioje, tiek ir rūgštinėje terpėse gaunamas tas pats produktas – *N*-[(2-hidroksi-3-trimetilamonio)propil]chitozono chloridas (*N*-KChz).

Chitozaną ištirpinus 1 % acto rūgštyje ir katijonizuojant EPTMAC, priklausomai nuo pradinio reagentų santykio, chitozono katijonizavimo laipsnis (KL) (KL parodo, kiek chitozono aminogrupių buvo pakeista EPTMAC) kinta nuo 36 iki 72 % (3.11 lentelė). Chitozono KL, apskaičiuotas iš aminogrupių kiekio, pakankamai gerai sutapo su KL, apskaičiuotu iš Cl⁻ kiekio. Kai kurių pavyzdžių KL nustatytas ir iš ¹H BMR spektrų. Tačiau nustatyti KL iš ¹H

BMR spektrų yra sudėtinga, nes trimetilamonio grupės protonų signalai persikloja su chitozано C(2) padėtyje esančio protono signalu. Dėl šios priežasties iš ^1H BMR spektrų nustatytas KL yra nepatikimas, dažnai gana žymiai skiriasi nuo cheminės analizės duomenų (3.11 lentelė).



3.12 schema. Chitozано katijonizavimas EPTMAC

Žinoma, kad katijonizavimo laipsnis priklauso nuo reakcijos sąlygų: reakcijos trukmės, temperatūros, EPTMAC ir chitozано aminogrupių molinio santykio [96]. Nustatyta, kad optimalus EPTMAC/chitozано aminogrupių molinis santykis yra 4, nes toliau didinant katijonizuojančio agento koncentraciją, KL didėja nežymiai. Katijonizavimo rūgštinėje terpėje metu pasiektas maksimalus KL (KL $\sim 70\%$) yra panašus į gautą ankstesniame darbe [96].

Chitozано katijonizavimas neutralioje vandeninėje terpėje taip pat buvo sėkmingas, buvo pasiektas pakankamai didelis chitozано KL (3.11 lentelė). Didelis KL, reakciją vykdant neutralioje terpėje heterogeninėmis sąlygomis, buvo šiek tiek netikėtas. Buvo akcentuojama [95], kad šią reakciją palanku vykdyti rūgštinėje terpėje, nes acto rūgštis yra katalizatorius, aktyvuojantis EPTMAC epoksižiedą reakcijai su aminogrupėmis. Reakciją vykdant neutralioje terpėje ir esant keturgubam EPTMAC pertekliui, KL siekė apie 61 %.

3.11 lentelė. Chitozano katijonizavimo EPTMAC rezultatai

Nr	Chz, terpė	EPTMAC: Chz, mol	NH ₂ , %	KL _{NH₂} , %	Cl ⁻ , %	KL _{Cl} , %	KL _{BMR} , %	η _{red} [*] , dL/g
1	Chz, rūgštinė terpė	-	6,00	-	-	-	-	14,6
2		1	2,65	35	5,61	36	-	10,4
3		2	1,34	51	7,52	54	37	8,95
4		4	0,32	67	8,98	71	55	5,87
5		6	0,24	68	9,06	72	69	3,69
6	Chz, neutrali terpė	1	3,04	30	4,86	29	57	11,4
7		2	1,48	49	6,86	47	-	9,36
8		4	0,61	62	8,16	61	81	6,32
9		6	0,47	64	8,58	66	84	4,61
10	MMM	-	5,66	-	-	-	-	3,01
11	Chz, neutrali terpė	1	3,11	30	5,12	32	28	2,46
12		4	0,55	63	8,50	65	-	1,38
13		6	0,22	68	8,82	69	76	1,27

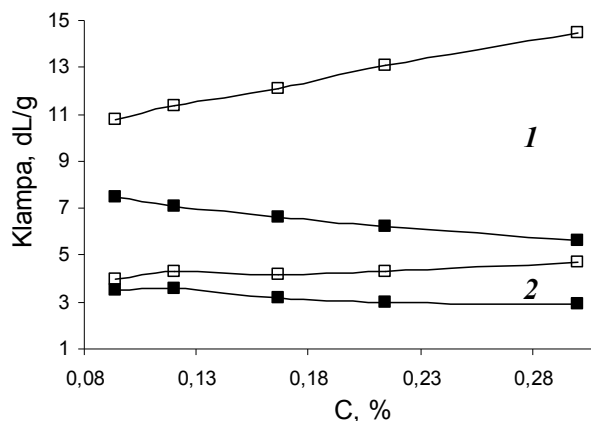
* – C = 0,3 %

MMM Chz – mažamolekulis chitozanas (po fermentinės destrukcijos, [η] = 2,31)

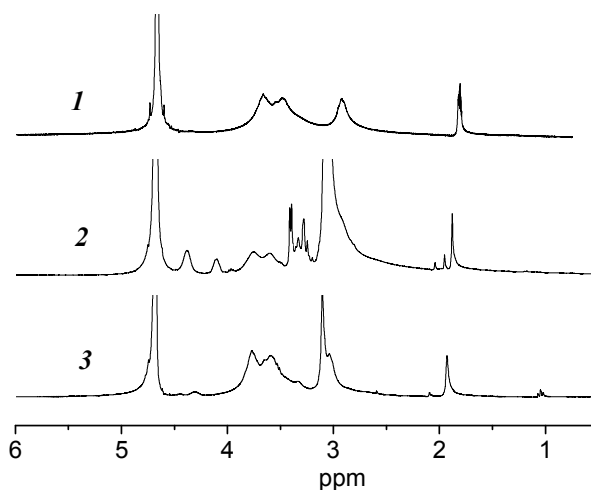
Katijonizavimui buvo panaudotas ir mažos molekulinės masės chitozanas, gautas fermentinės destrukcijos metu. Chitozano destrukcijai buvo naudojamas fermentas pektinazė iš *Aspergillus niger*, kuris efektyviai mažina chitozano molekulinę masę švelniose sąlygose [175]. Teigiama, kad mažos molekulinės masės chitozanas dėl silpnos kristalinės struktūros lengviau reaguoja su katijonizuojančiais reagentais pasiekiant didesnį KL [90]. Nepaisant to, naudojant mažos molekulinės masės chitozaną, gaunamas beveik identiškas KL, kaip ir komercinio chitozano atveju.

Katijonizuotų chitozano darinių klampa, lyginant su pradiniu chitozanu, yra mažesnė. N-KChz redukuota klampa kinta priklausomai nuo KL ir mažėja nuo 11,4 iki 3,69 dL/g (3.11 lentelė). Atitinkamai mažėja ir katijonizuoto chitozano ribinis klamos skaičius (3.13 pav.). Tirpalų klamos mažėjimas didėjant chitozano katijonizavimo laipsniui gali būti siejamas su vandenilinių

ryšių tinklo, būdingo chitozano tirpalams, ardymu. Nors, didėjant KL makromolekulių krūvis didėja, tačiau krūviai buferiniame tirpale ekranuojami, todėl makromolekulių hidrodinaminis tūris nepadidėja, o atvirkščiai, sumažėja.



3.13 pav. Katijonizuoto chitozano (1 – KL 30 %, 2 – KL 67 %) redukuotos (□) ir logaritminės (■) klampos priklausomybė nuo polimero koncentracijos. $[\eta]_{\text{KL30}} = 8,68 \text{ dL/g}$; $[\eta]_{\text{KL67}} = 3,76 \text{ dL/g}$.

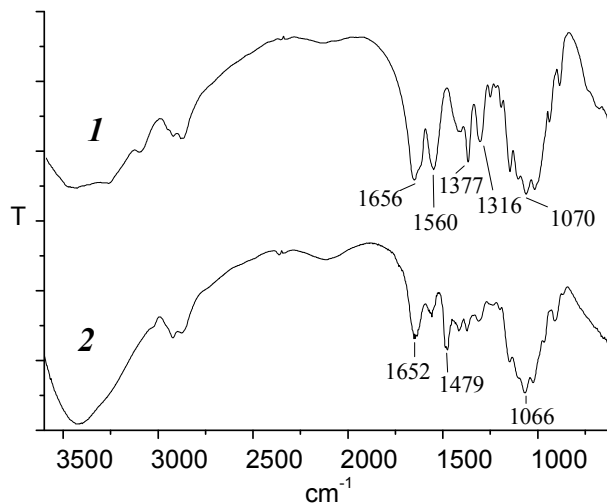


3.14 pav. Chitozano (1), rūgštinėje terpėje gauto *N*-KChz (KL 66 %) (2) ir šarminėje terpėje katijonizuoto chitozano (KL 10 %) (3) ^1H BMR spektrai ($\text{D}_2\text{O}/\text{acto}$ rūgštis- d_4)

Gautieji junginiai buvo identifikuoti remiantis cheminės analizės, ^1H BMR bei FT-IR spektroskopijos duomenimis. Lyginant pradinio chitozano (1) ir katijonizuoto chitozano (2) ^1H BMR spektrus matyti (3.14 pav.), kad

atsiranda naujas signalas ties 4,4 ppm, kuris priskiriamas CH grupei, esančiai EPTMAC liekanoje. Signalų intensyvumo padidėjimas ties 2,9-3,2 ppm rodo, kad chitozano protonų, esančių ties C(2), signalas persikloja su trimetilamonio grupės metilprotonų signalu.

Katijonizuoto chitozano FT-IR spektruose (3.15 pav.) ties 1479 cm^{-1} esanti sugerties juosta rodo prisijungusią trimetilamonio grupę iš EPTMAC. Taip pat matyti, kad sumažėja pirminėms aminogrupėms būdinga sugerties juosta ties 1560 cm^{-1} . Tai įrodo, kad reakcijoje dalyvauja aminogrupė, ir tuo pačiu patvirtina, kad katijonizavimas vyksta sėkmingai.



3.15 pav. Chitozano (1) ir N-KChz (KL 66 %) (2) FT-IR spektrai

Žinoma, kad šarminėje terpėje EPTMAC gali reaguoti ir su hidroksi-, ir su aminogrupėmis [95]. Pvz., esant didelėms terpės pH vertėms, EPTMAC efektyviai reaguoja su krakmolu [60,61]. Deja, katijonizuojant chitozaną šarminėje terpėje pavyko pasiekti tik kiek didesnę nei 10 % katijonizavimo laipsnį (3.12 lentelė).

Mažas KL gali būti dėl to, kad chitozanas netirpus šarminėje terpėje. Be to, šarminėje terpėje intensyviau vyksta šalutinė EPTMAC reakcija – jis naudojasi ne katijonizavimo reakcijoje, o hidrolizuoja. Gali būti, kad 24 val. yra per trumpas laikas didesniai KL pasiekti. Didesnio KL nepavyko pasiekti

nei naudojant didesnės koncentracijos NaOH, nei metanolinį amoniako tirpalą, kuriame chitozanas yra labai smulkiai disperguotas.

3.12 lentelė. Chitozano katijonizavimo EPTMAC šarminėje terpėje rezultatai

Nr	EPTMAC: Chz	Reakcijos terpė	NH ₂ , %	KL _{NH2} %	KL _{BMR} %	Cl ⁻ , %	KL _{Cl} , %	[η], dL/g
1	2	0,3 % NaOH	5,24	10	25	1,79	10	8,14
2	2	NH ₃ / MeOH, pH~9	5,37	9	-	0,52	2,6	5,53
3	2	0,8 % NaOH	5,61	7	19	0,22	5,1	7,20
4	4	0,8 % NaOH	5,08	11	-	0,94	4,8	4,22
5*	4	0,5 % NaOH	-	-	194	14,5	185	3,41
6*	4	NaOH/ <i>i</i> -PrOH (v/v 1/1)	-	-	94	9,9	84	4,68

5* Papildomai katijonuotas *N*-KChz (3.11 lentelė, Nr.5)

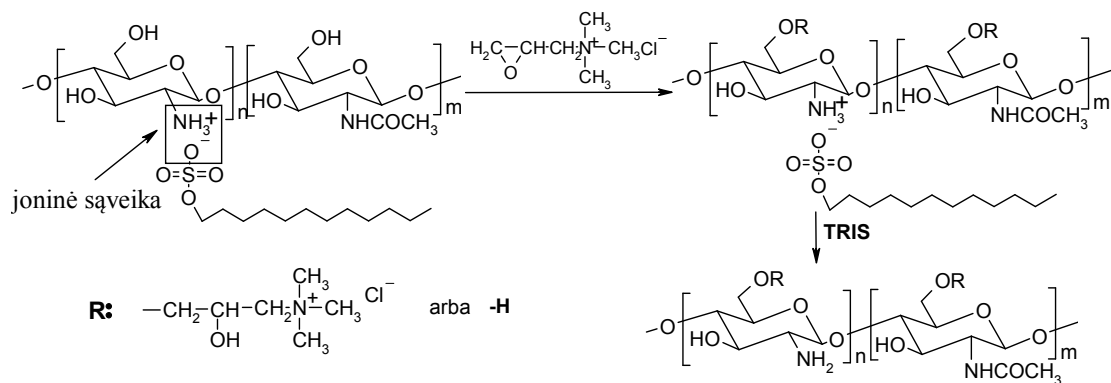
6* Papildomai katijonuotas *N*-KChz (3.11 lentelė, Nr.8)

Siekiant padidinti chitozano KL, *N*-KChz, gautas rūgštinėje ar neutralioje terpėje, buvo papildomai katijonizuojamas. Papildomam katijonizavimui EPTMAC šarminėje terpėje buvo pasirinktas *N*-KChz, kurio KL 68 % ir 62 % (3.11 lentelė, Nr. 5 ir 8). Kadangi chitozano deacetilavimo laipsnis yra 72 % (mažai skiriasi nuo KL, pasiekto rūgštinėje ar neutralioje terpėje), tai papildomo katijonizavimo metu reakcijoje dalyvavo ir hidroksigrupė, susidarant *N,O*-[(2-hidroksi-3-trimetilamonio)propil]chitozano chloridui (*N,O*-KChz) (3.12 lentelė, Nr. 5 ir 6). Nors tarp ¹H BMR spektroskopijos ir elementinės analizės (Cl⁻ kiekio) rezultatų vėl yra tam tikras nesutapimas (3.12 lentelė, Nr. 5 ir 6), tačiau neabejojant galima teigti, kad papildomo katijonizavimo šarminėje terpėje metu galima labai ženkliai padidinti chitozano KL. Chitozano KL, siekiantis apie 190 % (3.12 lentelė, Nr.5) rodo, kad prie kiekvienos gliukozamino grandies gali būti prijungtos dvi katijoninės grupės. Taigi, *N*-KChz papildomas katijonizavimas šarminėje terpėje yra efektyvus metodas, norint gauti didesnio KL chitozano darinius.

3.3.2. CDK esančio chitozano katijonizavimas

Chitozano katijonizavimas per hidroksigrupę, lyginant su *N*-katijonizavimu, turi keletą pranašumų: chitozano dariniai, gauti katijonizavimo per hidroksigrupę metu, turėtų didesnę krūvio tankį, taip pat tokiuose dariniuose greta ketvirtinių amonio grupių būtų ir pirminių aminogrupių.

Siekiant, kad katijonizavimo reakcijoje dalyvautų tik hidroksigrupė, reikia apsaugoti daug aktyvesnę chitozano aminogrupę. Amino grupėms apsaugoti naudojant *N*-benzilidenchitozaną [101], buvo susintetintas *O*-(2-hidroksi)propil-3-trimetilamonio chitozano chloridas (*O*-KChz), kurio KL 33 %. Žinoma [165,166], kad chitozano *O*-darinių sintezei naudojant *N*-benziliden- ir *N*-ftaloilchitozaną, aminogrupių apsaugojimo-apsaugos pašalinimo procedūrų metu neišvengiamai vyksta pagrindinės chitozano grandinės destrukcija. Be to, problemų kelia ir nepakankamas produktų tirpumas. Siekiant išvengti pagrindinės chitozano grandinės destrukcijos, *O*-katijonizuotų chitozano darinių sintezė buvo vykdoma pagal naują schemą, būtent, aminogrupių apsaugai naudojant dodecilsulfato/ chitozano kompleksą (CDK) (3.13 schema).



3.13 schema. Chitozano *O*-katijonizavimas, reakcijai naudojant chitozano/ dodecilsulfato kompleksą

Chitozano *O*-katijonizavimo reakcija buvo vykdoma DMSO/vandens ar DMSO/2-propanolio mišiniuose naudojant skirtingą EPTMAC kiekį. Literatūros duomenimis [101], *N*-benzilidenchitozano katijonizavimo reakcija

sėkmingai buvo vykdoma būtent DMSO/2-propanolio mišinyje, todėl šių tirpiklių mišinys panaudotas ir chitozano, esančio CDK, katijonizavimui. Katijonizuoto chitozano kompleksas su dodecilsulfatu buvo ardomas, pridodant stiprios bazės TRIS, kuri veikia kaip dekompleksavimo agentas [157].

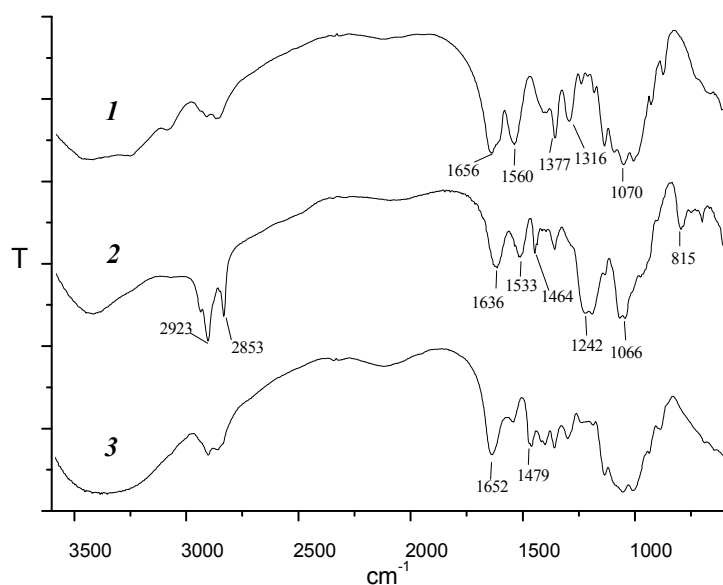
O-katijonizavimo, naudojant chitozano/dodecilsulfato kompleksą, rezultatai pateikti 3.13 lentelėje. Remiantis produktų BMR spektrais galima teigti, kad katijonizavimas šarminėje terpėje vyksta sunkiau, gaunami mažesnio KL produktai. Tiek DMSO/H₂O, tiek DMSO/2-propanolio mišinyje katijonizavimas vyko labai panašiai, ir didesnę KL (42 %) antrojoje terpėje pavyko pasiekti tik dėl to, kad buvo naudojamas didesnis EPTMAC perteklius.

3.13 lentelė. Į CDK įeinančio chitozano katijonizavimo EPTMAC rezultatai

Nr	Reakcijos terpė	EPTMAC: CDK, mol	Cl ⁻ , %	KL _{Cl} , %	KL _{BMR} , %	[η], dL/g
1	DMSO/H ₂ O*	2	0,18	0,9	12	2,45
2	(1:0,8 v/v)	4	0,21	1,1	21	1,39
3	DMSO/H ₂ O	2	2,21	11	18	4,22
4	(1:0,8 v/v)	4	3,33	19	37	4,01
5	DMSO/	2	2,30	12	16	4,20
6	2-propanolis	4	3,34	19	32	4,03
7	(1:0,8 v/v)	6	4,59	28	42	3,88

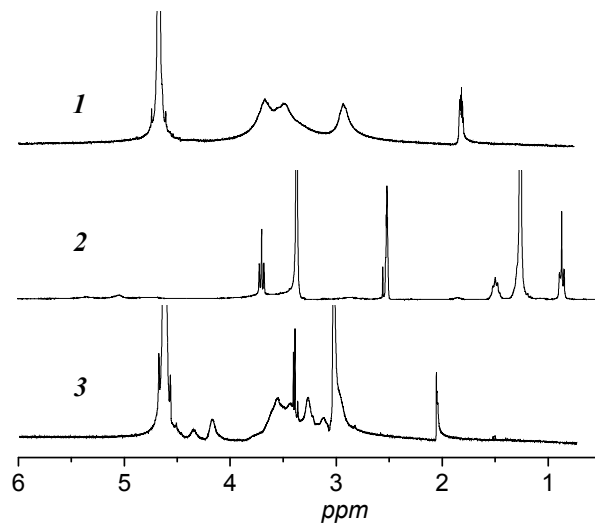
* - Reakcijos mišinys pašarminintas natrio šarmu: EPTMAC:NaOH=1:1,25, mol

O-katijonizavimo, naudojant chitozano/dodecilsulfato kompleksą, vyksmas įrodytas FT-IR ir ¹H BMR spektroskopijos duomenimis. Lyginant chitozano ir *O*-KChz FT-IR spektrus (3.16 pav.) matyti, kad katijonizavimo metu sumažėja amidams priskiriama sugerties juosta ties 1560 cm⁻¹, taip pat išnyksta sulfato grupės sugerties juostos ties 1242 ir 815 cm⁻¹, tačiau atsiranda metilgrupėms būdinga sugerties juosta ties 1479 cm⁻¹, patvirtinanti, kad prisijungė ketvirtinės amonio grupės.



3.16 pav. Chitozano (1), CDK (2) ir *O*-KChz (KL 28 %) (3) FT-IR spektrai

O-KChz ^1H BMR spektre (3.17 pav.) išnyko dodecilgrupei būdingi signalai ties 0,86, 1,25, 1,49 ir 3,69 ppm, priskiriami atitinkamai (CH_3), ($-(\text{CH}_2)_9-$), ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}$) ir ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}$) protonams, o tai rodo, kad dodecilsulfato anijonai buvo sėkmingai pašalinti iš katijonizuoto darinio. Kartu atsirado šiek tiek pasislinkęs stiprus ketvirtinio amonio metilgrupių signalas ties 2,8-3,0 ppm, rodantis, kad chitozanas buvo sėkmingai katijonizuotas per hidroksigrupę. ^1H BMR spektre taip pat matyti nauji signalai ties 3,15 bei 4,40 ppm, priskiriami atitinkamai $-\text{N}-\text{CH}_2-$ bei $-\text{CH}(\text{OH})-$ protonų, esančių EPTMAC liekanoje, signalams. Chitozano KL skaičiuojant iš BMR spektrų, lyginant ketvirtinio amonio grupės protonų ties 3,0 ppm ir chitozano acetilgrupės protonų ties 1,8-1,9 ppm signalų intensyvumus, gaunami netikslūs duomenys, nes stiprus ketvirtinių amonio grupių protonų signalas persikloja su chitozano H-2 signalu. Skaičiuojant KL, lyginant $-\text{CH}(\text{OH})-$ grupės protono ties 4,40 ppm ir chitozano acetilgrupės protonų ties 1,8-1,9 ppm signalų intensyvumus, gaunamos KL vertės taip pat yra didesnės, nei kad nustatyta iš Cl^- matavimų (3.13 lentelė).



3.17 pav. Chitozano (D_2O /acto rūgštis- d_4) (1), CDK ($DMSO-d_6$) (2) ir *O*-KChz (KL 28) (D_2O /acto rūgštis- d_4) (3) 1H BMR spektrai

Nepaisant to, kad FT-IR ir 1H BMR spektrai patvirtino *O*-KChz susidarymą, iš chitozano/dodecilsulfato komplekso gauti katijonizuoti produktai vandenyje netirpo, o tik brinko. Tai įrodo, kad 1H BMR spektroskopijos būdu nustatytas didesnis KL, nei jis yra iš tikrųjų. Cheminių tyrimų metu medžiaga tik išbrinksta, todėl nustatomas paviršinis Cl, dėl ko jis yra mažesnis nei realiai turėtų būti. Galima netirpumo priežastis – ardant katijonizuoto chitozano/dodecilsulfato kompleksą, gali vykti įvairios pašalinės reakcijos, tame tarpe, dalyvaujant reakcijos terpėje likusiam EPTMAC. Siekiant pašalinti nesureagavusį EPTMAC, buvo išmėginti du būdai:

- 1) Reakcijos mišinys po katijonizavimo dializuojamas vandenyje, po to TRIS tirpale, ir galiausiai vėl vandenyje;
- 2) Katijonizuotas chitozano/dodecilsulfato kompleksas išsodinamas reakcijos mišinį pilant į vandenį, nuosėdos filtruojamos, tirpinamos DMSO, dializuojamos TRIS tirpale ir vandenyje.

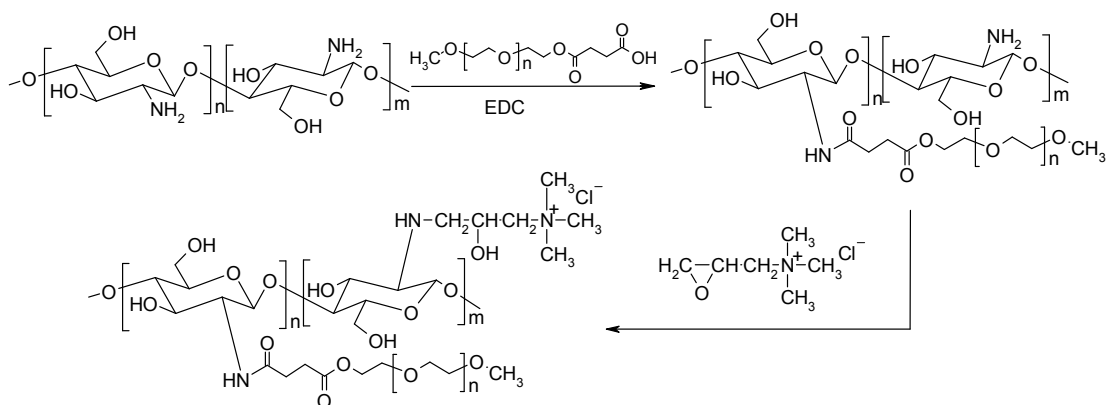
Deja, abiem būdais grynintą katijonizuotą chitozaną išsodinus ir išdžiovinus, jis tapo netirpus. Tikrosios *O*-KChz netirpumo priežastys neaiškios, nors galima įtarti, kad netirpūs kompleksai susidaro, tarp katijoninių grupių susidarius sulfato tilteliams. Reziumuojant galima tvirtinti, kad

chitozано *O*-katijonizavimas, naudojant chitozано/dodecilsulfato kompleksą galėtų būti perspektyvus tik tada, jeigu pavyktų gauti tirpius produktus.

3.3.3. Chitozано-*N*-MPEG kopolimerų sintezė ir jų katijonizavimas

Siekiant išsiaiškinti, ar galima pagal tais pačiais katijonizavimo būdais katijonizuoti ir chitozaną, ir jo darinius su metoksipolietilenglikoliu (MPEG), buvo susintetinti keli chitozано-MPEG kopolimerai. Kadangi grynas MPEG su chitozanu nereaguoja, katijonizavimui skirtų kopolimerų sintezei MPEG buvo „aktyvuojamas“ iki karboksidarinio. MPEG hidroksigrūpei esterifikacijos reakcijos metu reaguojant su cikliniu alifatinium anhidridu – gintaro rūgšties anhidridu – susidaro MPEG sukcinatas.

MPEG sukcinato reakcija su chitozано aminogrupėmis buvo inicijuota vandenyje tirpiu karbodiimidu (3.14 schema). Vandenyje tirpus 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimido hidrokloridas (EDC) aktyvuoja MPEG sukcinato karboksigrūpes, sudarydamas galimybę pastarosioms prisijungti prie chitozано aminogrupių [176]. Naudojant šį metodą, MPEG prie chitozано prijungiamas susidarant amidiniam ryšiui.



3.14 schema. Chitozано-*N*-MPEG kopolimerų sintezė ir katijonizavimas

Karbodiimidais katalizuojamos reakcijos yra gana lėtos ir paprastai trunka nuo kelių valandų iki paros. Reakciją vykdant 50 °C temperatūroje 24 val. ir naudojant skirtingus pradinių reagentų molinius santykius, buvo gauti chitozано-*N*-MPEG kopolimerai – didelės molekulinės masės vandenyje tirpūs

hidrofiliniai produktai, kuriuose pakeitimo laipsnis kinta nuo 20 iki 43 % (3.14 lentelė).

3.14 lentelė. Chitozano-*N*-MPEG kopolimerų sintezė ir katijonizavimas

Nr	Molinis santykis*		PL, %		η_{red} , dL/g	Molinis santykis**		KL, %		η_{red} , dL/g
	Chz	MPEG	NH ₂	BMR		Chz- <i>N</i> -MPEG	EPTMAC	Cl ⁻	BMR	
1	1	0,28	21	20	3,85	1	1	3,2	0,4	-
2						1	3	12,5	3,3	4,02
3	1	0,42	34	35	3,11	1	1	8,3	2,8	-
4						1	3	8,0	5,0	3,36
5	1	0,55	42	43	2,62	1	3	10,1	4,3	2,85

* - chitozano gliukozamino grandžių ir MPEG molinis santykis reakcijos mišinyje;

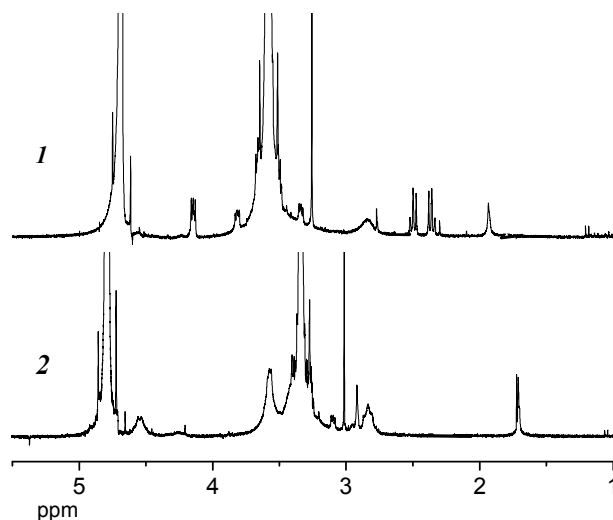
** - Chz-*N*-MPEG kopolimero ir EPTMAC molinis santykis reakcijos mišinyje.

¹H BMR spektrai ne tik patvirtino, kad chitozano dariniuose yra signalų, priskiriamų chitozanui ir MPEG, bet ir iš jų buvo galima įvertinti chitozano pakeitimo laipsnį (PL) (3.18 pav.). Chitozano PL buvo nustatytas lyginant chitozano acetilgrupės signalo ties 1,92 ppm ir MPEG metoksigrupei priklausančio signalo ties 3,2 ppm integralų santykį, ir jis gerai sutapo su cheminės analizės duomenimis.

Chitozano-*N*-MPEG kopolimerų katijonizavimas buvo vykdomas vandeniniame acto rūgšties tirpale. Tačiau, net ir naudojant katijonizuojančio reagento perteklių, gaunamas itin mažo KL chitozano kopolimeras (3.14 lentelė).

Katijonizuoto kopolimero ¹H BMR spektre matyti šiek tiek pasislinkę protonų signalai ties 3,01, 2,91 ir 2,83 ppm, priskiriami atitinkamai MPEG OCH₃ grupės, trimetilamonio grupės, esančios EPTMAC liekanoje, metilprotonų ir chitozano H-2 protono signalams. Tai, kad N⁺(CH₃)₃ signalas yra labai mažas, įrodo, kad tokiomis sąlygomis katijonizavimas vyksta sunkiai. Prie chitozano prijungtos MPEG grandinės yra pakankamai ilgos ir apsunkina gan didelio katijonizuojančio reagento priėjimą prie likusių laisvų chitozano aminogrupių. Be to, sumažėjęs MPEG oksimetileno grupių protonų signalas

ties 3,2-3,4 ppm leidžia manyti, kad vyksta polietilenglikolio grandinės destrukcija. Tokios destrukcijos priežastys nežinomos.



3.18 pav. Chitozано-N-MPEG (PL 35 %) (1) ir chitozано-N-MPEG-N-EPTMAC (2) kopolimerų (KL 5 %) ^1H BMR spektrai ($\text{D}_2\text{O}/\text{acto}$ rūgštis- d_4)

Literatūroje rasta keletas publikacijų, kur katijonizuotas chitozanas modifikuojamas MPEG, tačiau nerasta informacijos apie atvirkštinę reakcijų seką. O tai paremia prielaidą, kad chitozано-N-MPEG kopolimerų katijonizavimas vyksta labai sunkiai.

3.3.4. Katijonizuoto chitozано darinių dalinė destrukcija

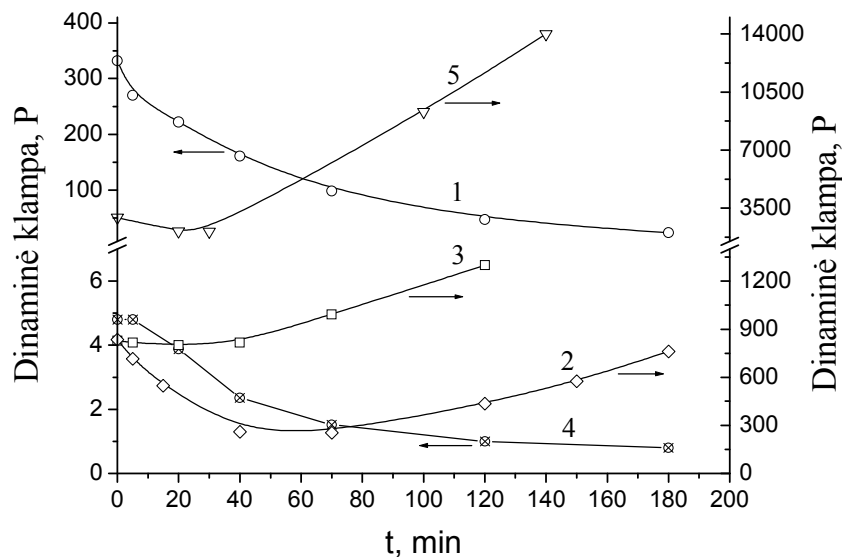
Polimerų klampa yra vienas iš svarbiausių rodiklių formuojant nanopluoštus, ypač elektroverpimo būdu. Žinoma [177], kad didinant polimerų tirpalų koncentraciją (ir klampą), formuojamo pluošto skersmuo didėja eksponentiškai. Geros kokybės pluoštą galima gauti tik naudojant santykinai mažos (nuo 1 iki 215 P) klamos tirpalus. Nanopluošų gamybai naudojant katijoninį chitozaną, reikalingas 7-8 % tirpalas, o jo dinaminė klampa turėtų būti apie 5 P [154].

Katijoninio chitozано ($N\text{-KChz}$), kurio KL 30 %, 7 % tirpalo 0,5 % acto rūgštyje dinaminė klampa buvo labai didelė (2930 P), ir toks tirpalas netiko elektroverpimui. Tirpalą praskiedus iki 2,0-2,3 %, jo dinaminė klampa

sumažėjo iki 5 P, tačiau tokia tirpalų koncentracija akivaizdžiai per maža, norint gauti gerų savybių pluoštą. Vienintelis būdas polimero tirpalo klampai sumažinti – polimero molekulinės masės mažinimas.

Chitozanas ir jo dariniai gali būti destruktuojami cheminiais ar fizikiniais metodais, t.y. chitozanas gali būti veikiamas rūgštimis, šarmais, oksidatoriais, γ ar UV spinduliais, ultragarsu ir pan. Šiame darbe chitozanas skaidytas jo tirpalus veikiant UV spinduliais arba į tirpalus pridėjus lizuojančių fermentų.

UV spinduliais buvo veikiami įvairaus KL chitozано darinių tirpalai 0,5 % acto rūgštyje. Nustatyta, kad, švitinant UV spinduliais, galima sumažinti dinaminę klampą tik tų katijonizuoto chitozано tirpalų, kurie gauti iš chitozано su dideliu KL (3.19 pav., 1, 4 kreivės). *N*-KChz (KL 50 %) švitinant 3 val., dinaminė klampa sumažėjo 70 kartų, buvo gautas elektroverpimui tinkamas tirpalas. Tuo tarpu, UV veikiant mažesnio KL chitozано tirpalus, gauti priešingi rezultatai (3.19 pav., 2, 3, 5 kreivės).



3.19 pav. *N*-KChz (KL 50 % (1), 40 % (2, 3), 68 % (4) ir 30 % (5)) 7 % tirpalų dinaminės klampos priklausomybė nuo švitinimo UV spinduliais trukmės. Atstumas iki kvarcinės lempos – 24 cm (1, 2, 4, 5) ir 35 cm (3).

UV spindulių poveikyje tirpalo dinaminė klampa iš pradžių (30-40 min) mažėja (3.19 pav., 1, 2, 4 kreivės) arba išlieka daugiau ar mažiau pastovi (3, 5 kreivės). Švitinant ilgiau, *N*-KChz (KL 30 %) tirpalo dinaminė klampa padidėja iki 16000 P (3.19 pav, 5 kreivė). Manoma, kad UV spindulių poveikyje vyko sudėtingi makromolekulių skilimo ir jungimosi tarpusavyje procesai, kurių metu susidarė dalinai sutinklinti polimerai.

Polimerų destrukcija, veikiant UV spinduliais, vyksta pagal laisvųjų radikalų mechanizmą, t.y., makromolekulių skilimas vyksta susidarant polimeriniams ar oligomeriniams laisviesiems radikalams [178]. Reakcijos metu susidarę makroradikalai dalyvauja grandininės makromolekulių destrukcijos arba susiuvimo procesuose [179]. Didelio KL katijonizuotas chitozanas (jo tirpalo klampa maža), gali būti priskiriamas ketvirtinėms amonio druskoms, kurios santykinai atsparios susiuvimui ir tinklinimui, tame tarpe, vykstant senėjimo procesams. Tuo tarpu mažo KL chitozano dariniai (jų tirpalų klampa didelė) turi daugiau aminogrupių ir gali būti priskiriami polimeriniams aminams, kurie neatsparūs senėjimui, linkę dalyvauti oksidacijos ir tinklinimo reakcijose. Molekulinės masės didėjimas UV švitinimo metu gali būti aiškinamas ir didele katijoninio chitozano, kurio KL mažas, tirpalų klampa. Klampiamame tirpale radikalai turėtų gyvuoti ilgiau, todėl bimolekulinio susijungimo galimybė padidėja. Apibendrinant galima teigti, kad UV spinduliai nėra tinkamas būdas katijoninio chitozano, kurio KL santykinai mažas (<50 %), destrukcijai. Kita vertus, didelio KL (>50 %) katijonizuotiems chitozano dariniams šį destrukcijos būdą galima naudoti.

Kitas būdas katijonizuoto chitozano tirpalų klampai sumažinti – fermentinė chitozano destrukcija. Katijonizuotų chitozano darinių destrukcija buvo vykdoma pektinazės iš *Aspergillus niger* ir celulazės iš *Trichoderma reesei* tirpaluose. Nustatyta, kad fermentinė hidrolizė sėkmingai vyksta įvairiose terpėse: citratiniame ir acetatiniame buferiuose, acto ir skruzdžių rūgštyse (3.15 lentelė). Per gana trumpą laiką šių tirpalų klampa sumažėja kelis kartus.

3.15 lentelė. 2 % *N*-KChz (KL 50 %, $\eta^*=29$ P) fermentinės hidrolizės rezultatai

Reakcijos terpė	Fermentas ir jo kiekis /1 g <i>N</i> -KChz	Hidrolizės trukmė, val.	η^* , P
Citratinis buferis, pH 3,0	Pektinazė, 0,04 g	24	4,1
Acetatinis buferis, pH 4,6	Pektinazė, 0,1 g	18	3,0
	Celulazė, 0,1 g	18	2,1
Acto rūgštis, pH 3,25	Pektinazė, 0,04 g	24	4,2
	Celulazė, 0,04 g	6,5	5,8
Skruzdžių rūgštis, pH 2,7	Pektinazė, 0,04 g	24	3,9

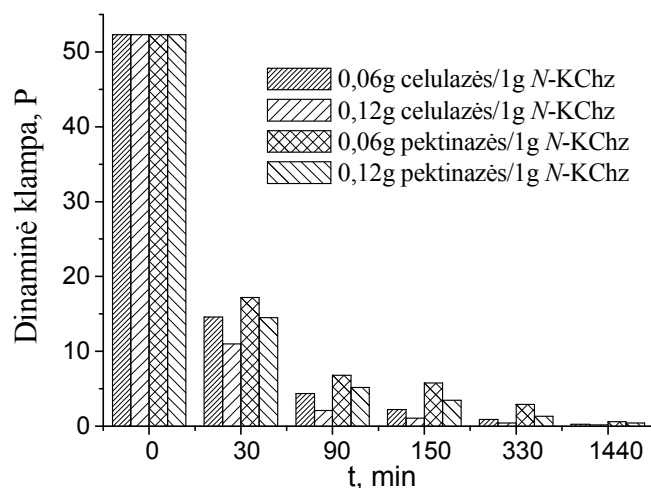
η^* – dinaminė klampa

Fermentinė hidrolizė sėkmingai vyksta įvairiose terpėse, tačiau ¹H BMR spektroskopijos pagalba buvo nustatyta, kad, po fermentinės hidrolizės citratiniame buferyje, katijonizuotame darinyje lieka nepasišalinusių citrato anijonų. Dėl šios priežasties tolimesniems fermentinės destrukcijos tyrimams buvo pasirinktas acetatinis buferis arba acto rūgšties tirpalas.

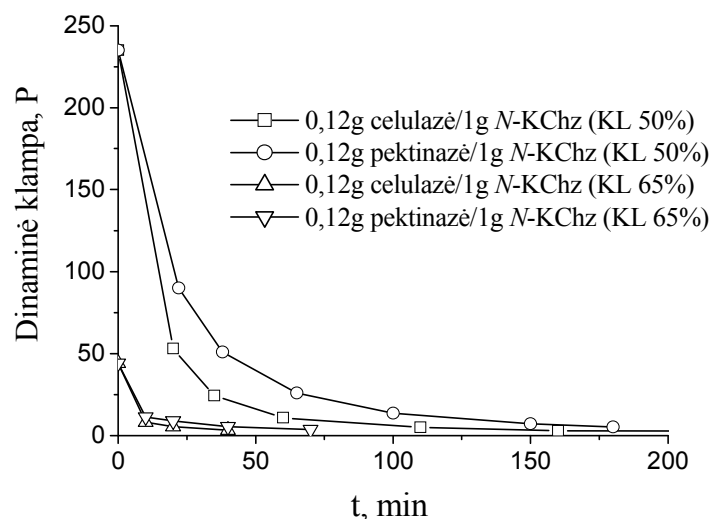
7 % katijonizuoto chitozano tirpalų klampa labai didelė, todėl pirmiausiai tyrimai buvo atlikti naudojant mažesnės koncentracijos tirpalus. 4 % katijonizuoto chitozano tirpalų acetatiniame buferyje fermentinė hidrolizė vyksta greitai, ir po 2-3 val. produktų dinaminė klampa sumažėja 10-30 kartų (3.20 pav.). Kaip matyti iš 3.20 pav., destrukciją lemia tiek fermento koncentracija, tiek ir naudojamas fermentas. Nors abu naudoti fermentai efektyviai hidrolizuoja katijoninį chitozaną, celulazė ardo šiek tiek geriau. Fermentinę hidrolizę vykdant 5 val., 4 % *N*-KChz (KL 30-40 %) tirpalo dinaminė klampa sumažėja iki 1-2 P (3.20 pav.).

Panašūs rezultatai gauti hidrolizuojant 7 % *N*-KChz tirpalus (3.21 pav.). Kadangi 7 % tirpalai yra ypatingai klampūs, destrukcija buvo vykdoma 37 °C temperatūroje termostate, tirpalus maišant mechanine maišykle. Lyginant 4 % ir 7 % *N*-KChz tirpalų fermentinės hidrolizės rezultatus matyti, kad didesnės koncentracijos tirpalų destrukcija greitesnė. Viena iš galimų tokio efekto priežasčių – vykdant 7 % tirpalų destrukciją, buvo naudojamas mechaninis maišymas, t.y., papildomas įnašas į ardymą, tuo tarpu 4 % tirpalas

hidrolizuojamas ventiliuojamoje džiovinimo krosnyje, tirpalą karts nuo karto supurtant. Hidrolizuojamą tirpalą papildomai maišant, klampiam tirpale padidėja fermento ir chitozano molekulių kontaktavimo laipsnis, dėl to destrukcija pagreitėja.



3.20 pav. 4 % *N*-KChz (KL 40 %) dinaminės klamos acetatiniame buferyje priklausomybė nuo fermento rūšies, kiekio ir fermentinės hidrolizės trukmės 18 °C temperatūroje

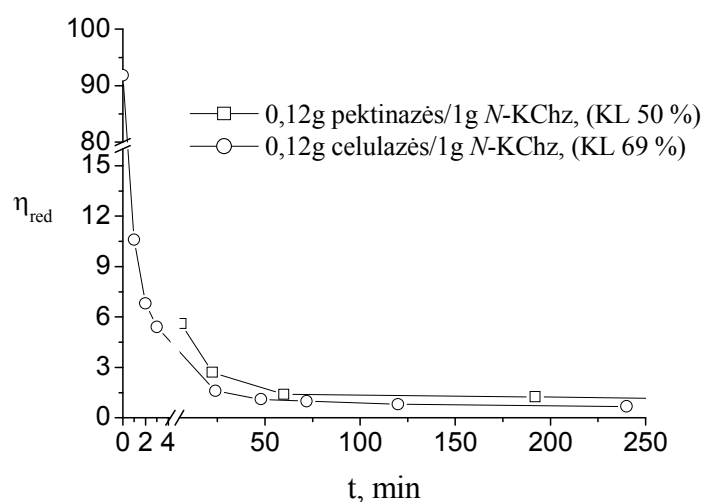


3.21 pav. 7 % *N*-KChz dinaminės klamos acetatiniame buferyje priklausomybė nuo fermento prigimties ir fermentinės hidrolizės trukmės 18 °C temperatūroje

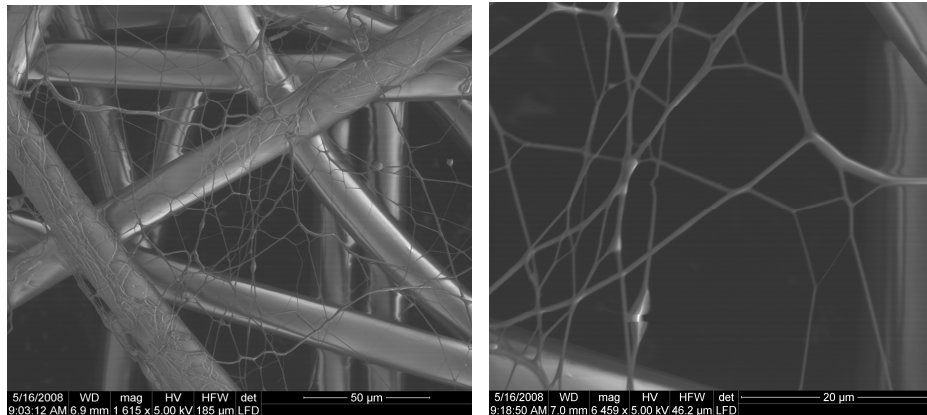
Siekiant įvertinti trukmės įtaką destrukcijai, fermentinė hidrolizė buvo tęsiama 10 dienų. Katijonizuotą chitozaną (KL 69 %) 10 parų hidrolizuojant celulazės tirpale, redukuota klampa sumažėjo iki 0,67 dL/g, o katijonizuotą chitozaną (KL 50 %) laikant pektinazės tirpale – iki 0,99 dL/g (3.22 pav.). Laikant ilgiau, klamos kitimas buvo nežymus. Dėl pernelyg didelės *N*-KChz (KL 50 %) klamos, nustatyti pradinio tirpalo redukuotą klampą nepavyko. Remiantis gautais rezultatais matyti, kad katijonizuoto chitozano fermentinė hidrolizė vyksta tik iki tam tikro laipsnio.

Gauti katijonizuoto gliukozamino ar kitų mažos molekulinės masės katijonizuotų fragmentų, vykdant katijonizuoto chitozano darinių fermentinę hidrolizę, nepavyko, tačiau šis destrukcijos būdas yra tinkamas, ruošiant reikiamos klamos katijonizuoto chitozano tirpalus elektroverpimui.

Fermentiškai hidrolizuoti *N*-KChz tirpalai buvo panaudoti nanopluoštams gauti. Siekiant gauti katijonizuoto chitozano turintį nanopluoštą, tirpalai elektroverpimui buvo paruošti sumaišant 8 % *N*-KChz (KL 30 %) ir 8 % polivinilalkoholio (PVA) tirpalus santykiu 15:85 arba 25:75.



3.22 pav. Katijonizuoto chitozano tirpalo ($c=4\%$) redukuotos klamos priklausomybė nuo fermentinės hidrolizės trukmės



3.23 pav. Nanopluošto tinklo (N -KChz:PVA =15:85 %) ant pluoštinio pagrindo (kairėje) ir be jo (dešinėje) SEM nuotraukos

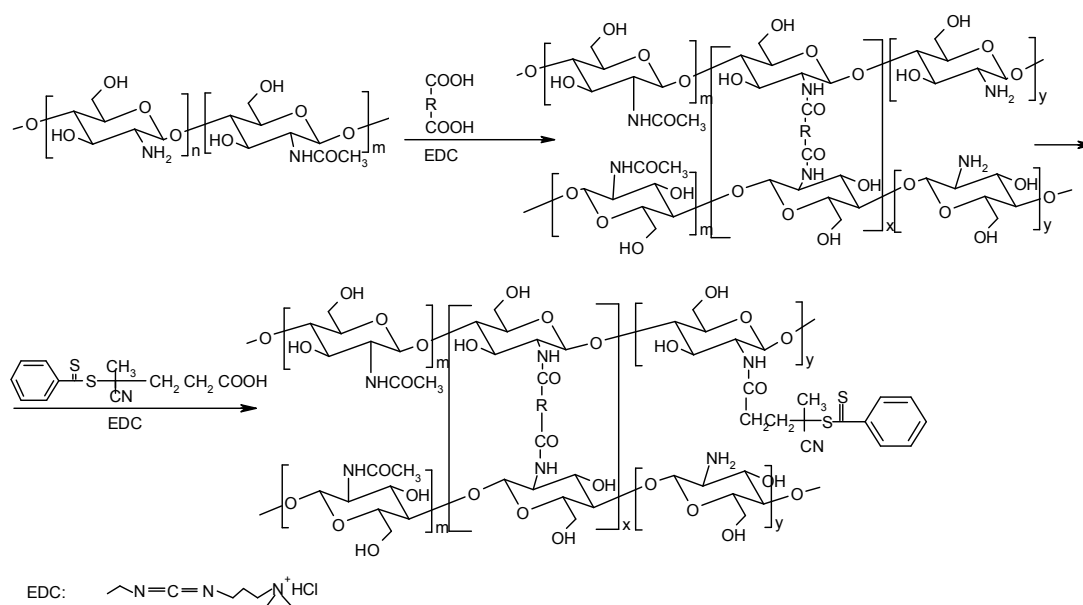
Formuojant nanopluoštą elektroverpimo būdu iš vandens – etanolio – acto rūgšties mišinių ir keičiant PVA ir KChz santykį, buvo gautas nanopluošto tinklas, kuriame gana daug sulipimo vietų ir gumuliukų (3.23 pav.). Geriausios kokybės nanopluošto tinklas gautas tada, kada polimerų mišinyje buvo daugiau PVA (75 %). Elektroverpiant N -KChz/PVA tirpalus, gauti katijoniniai nanopluoštai.

3.4. Di- ir trikarboksirūgštimis modifikuoto chitozono nanodalelės

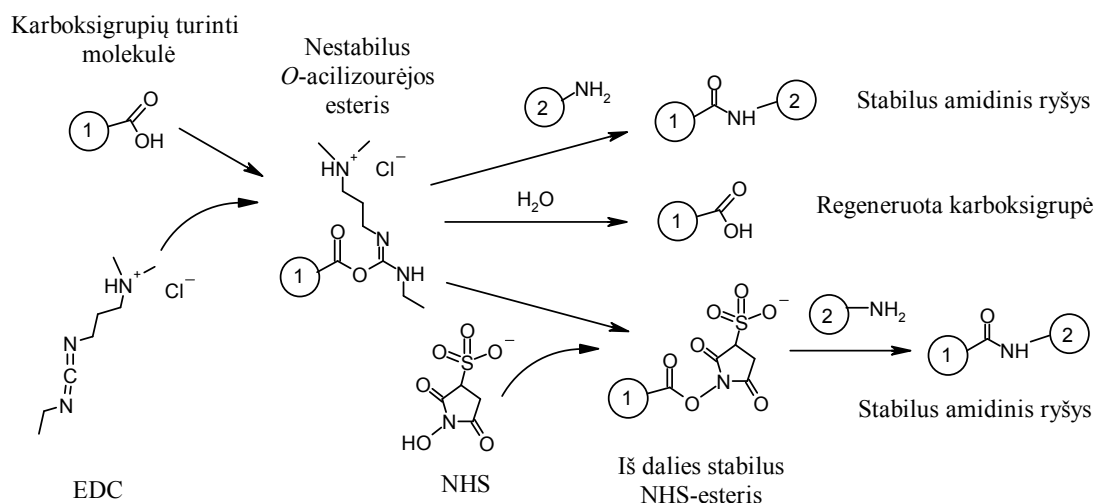
Chitozanas – bazinių savybių turintis polisacharidas, netirpus neutralioje ir šarminėje terpėje. Rūgštinėje terpėje chitozono aminogrupės protonizuojasi, ir gaunamos didelio krūvio tankio jo makromolekulės, kurių skersmuo paprastai siekia keliolika nm [122]. Sujungus kelias (ar keliasdešimt) tokių makromolekulių, gaunamos krūvį turinčios chitozono nanodalelės, kurios gali būti naudojamos vaistų, genų ar DNR pernašai, kaip priedai medikamentams ar detergentams [113,148].

Siekiant dalinai sutinklinti chitozono makromolekules ir reakcijos terpėje gauti chitozono nanodaleles, šiame darbe chitozanas buvo modifikuojamas di- ir trikarboksirūgštimis. Prie chitozono nanodalelių prijungiant RAFT agentą, buvo bandoma susintetinti polisacharidinį RAFT makroiniciatorių, nuo kurio paviršiaus vykdant RAFT polimerizaciją, būtų galima gauti nanodaleles biotechnologijos ar biomedicinos reikmėms.

Chitozanas buvo modifikuojamas adipo (AR), vyno (VR) ir citrinų (CR) rūgštimis bei vandenyje tirpiu RAFT agentu (4-cianpentano rūgšties)-4-ditiobenzenkarboksilatu (CPAD). Karboksirūgštys prie chitozано aminogrupių buvo jungiamos karbodiimidiniu metodu, naudojant vandenyje tirpų *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilkarbodiimido hidrochloridą (EDC) (3.15 schema).



3.15 schema. Chitozано *N*-modifikavimas dikarboksirūgštimis ir CPAD



3.16 schema. Reakcijos tarp karboksigrupių ir pirminių aminogrupių dalyvaujant EDC mechanizmas [180]

EDC, plačiai naudojamas vandenyje tirpus karbodiimidis, gali būti dviejų formų: laisvos bazės arba druskos. Dažniau naudojamas EDC hidrokloridas, nes jis nehigroskopiškas ir stabilus, tačiau šiek tiek jautrus hidrolizei. EDC reaguoja su karboksigrupe, sudarydamas reaktinę *O*-acilizourės tarpinį darinį, kurį atakuojant aminui, susidaro tvirtas amidinis ryšys. Nesureagavusį su aminais darinį vandeniniai tirpalai hidrolizuoja, vėl susidarant karboksigrupei. Kartais EDC naudojamas kartu su *N*-hidroksisulfosukcinimidu (NHS), kuris karboksigrupes paverčia į reaktingus sulfonhks esterius (3.16 schema).

Chitozano modifikavimas adipo, vyno ir citrinų rūgštimis buvo vykdomas vandeninėje terpėje (pH 6,5). Priklausomai nuo karboksigrupių ir aminogrupių santykio, buvo gauti skirtingo pakeitimo laipsnio (PL) chitozano dariniai (3.16 lentelė).

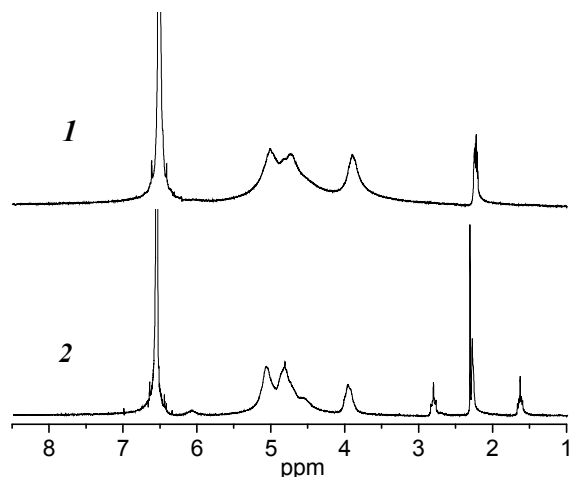
3.16 lentelė. Chitozano modifikavimo karboksirūgštimis rezultatai

Nr.	Chitozano darinys	Chz : rūgštis	PL, % (N)	PL, % (BMR)	[η]*, dL/g
1	Chz (DL 72%)	-	-	-	8,42
2	Chz- <i>N</i> -AR	1 : 0,11	-	10	3,12
3	Chz- <i>N</i> -AR	1 : 0,2	-	15	3,24
4	Chz- <i>N</i> -AR	1 : 1,18	70	-	-
5	Chz- <i>N</i> -VR	1 : 0,1	-	8	4,07
6	Chz- <i>N</i> -VR	1 : 0,2	-	22	4,26
7	Chz- <i>N</i> -VR	1 : 1,18	45	-	-
8	Chz- <i>N</i> -CR	1 : 0,05	-	7	3,45
9	Chz- <i>N</i> -CR	1 : 0,1	-	17	2,44
10	Chz- <i>N</i> -CR	1 : 0,2	26	-	-

[η]* - ribinis klamos skaičius, išmatuotas Ubelodės viskozimetru

Chitozano PL buvo įvertintas, nustatius azoto kiekį modifikavimo produktuose, o taip pat ir iš jų ¹H BMR spektrų. Chitozano PL iš ¹H BMR spektrų buvo skaičiuojamas, lyginant chitozano H-2 protono (2,97 ppm)

signalo intensyvumą su protonų, esančių modifikuojančios rūgšties liekanoje, signalų intensyvumu. Pvz., chitozaną modifikuojant adipo rūgštimi, atsiranda signalai ties 1,44 ir 2,25 ppm, priskiriami metileno grupėms, esančioms atitinkamai alifatinėje grandinėje ir šalia karboksigrupės (3.24 pav.).



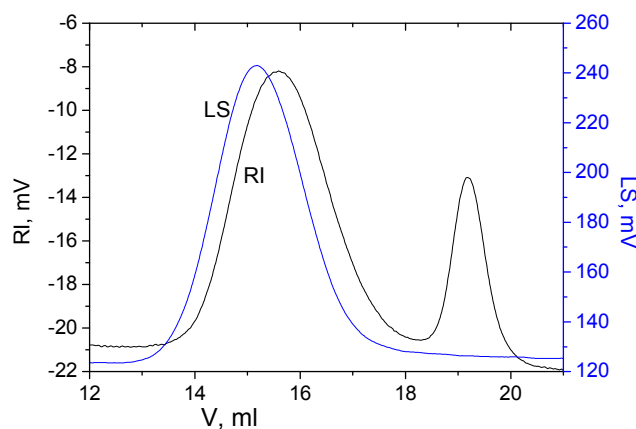
3.24 pav. Chitozано (1) ir chitozано-*N*-adipo rūgšties darinio (PL 10 %) (2) ^1H BMR spektrai ($\text{D}_2\text{O}/\text{acto}$ rūgštis- d_4)

Esant mažam chitozано pakeitimo di- ir trikarboksirūgštimis laipsniui (PL = 7-22 %), gauti vandenyje tirpūs kopolimerai (tikėtina, nanodalelės). Chitozaną modifikuojant dikarboksirūgštimis, esant rūgštinių grupių pertekliui, gauti nei vandenyje, nei organiniuose tirpikliuose netirpios makroskopinės chitozано dalelės. Akivaizdu, kad šiuo atveju chitozано makromolekulių tinklinimo laipsnis buvo pernelyg didelis.

Chitozано modifikavimo di- ir trikarboksirūgštimis produktų ribinis klampos skaičius $[\eta]$ mažesnis negu pradinio chitozано, tačiau pakankamai didelis, lyginant su kitais polimerais (3.16 lentelė). $[\eta]$ vertės sumažėjimas chitozaną dalinai tinklinant yra logiškas ir laukiamas, kadangi susidarančių šakotų makromolekulių tankis yra didesnis, o jų hidrodinaminis spindulys mažesnis.

Kai kurių di- ir trikarboksirūgštimis modifikuotų chitozано darinių molekuliniai rodikliai buvo įvertinti, naudojant molekulinę sietų chromatografiją (MSC) (3.25 pav., 3.17 lentelė). Naudojant tris nepriklausomas jutiklių sistemas (lūžio rodiklio, šviesos sklaidos ir klamos),

buvo nustatyti masinės ir skaitinės molekulinų masių vidurkiai (M_w ir M_n), ribinis klamos skaičius $[\eta]$ bei makromolekulių globulių matmenys (hidrodinaminis spindulys R_h). Visų bandinių eliuavimo kreivės RI jutiklio atžvilgiu buvo bimodalinės, o šviesos sklaidos jutiklio atžvilgiu – unimodalinės ir pasislinkusios mažesnio eliuavimo tūrio kryptimi (3.25 pav.). Didelės molekulinės masės (mažesnio eliuavimo tūrio) frakcija, be abejo, priskirtina dalinai tinklinto chitozano makromolekulėms. Mažamolekulės frakcijos, fiksuojamos tik lūžio rodiklio jutikliu, signalo kilmė neaiški. Gal būt, tai šalutiniai rūgščių–EDC jungimosi produktai, kurių nepavyko pašalinti chitozano nanodalelių gryninimo metu; šių junginių molekulinė masė labai maža (keletas šimtų), todėl šviesos sklaidos jutiklis jų nefiksuoja.



3.25 pav. Chitozano-*N*-adipo rūgšties (PL 15%) MSC eliuacijos kreivės. Šviesos sklaidos (LS) ir lūžio rodiklio (RI) jutiklių duomenys

3.17 lentelė. Di- ir trikarboksirūgštimis modifikuoto chitozano MSC rezultatai

Junginys	PL, %	$M_n \cdot 10^{-3}$	$M_w \cdot 10^{-3}$	M_w/M_n	$[\eta]^*$, dL/g
Chz	-	311	456	1,47	3,71
Chz- <i>N</i> -VR	22	79,9	189	2,36	2,36
Chz- <i>N</i> -AR	10	136	294	2,16	2,12
	15	219	502	2,29	2,42
Chz- <i>N</i> -CR	7	145	289	2,00	1,71
	17	200	434	2,17	1,69

$[\eta]^*$ - ribinis klamos skaičius, nustatytas MSC būdu

Lyginant 3.17 lentelėje pateiktus chitozano ir karboksirūgštimis modifikuoto chitozano molekulinę masę rezultatus matyti, kad modifikuotų chitozano darinių molekulinė masė maždaug 1,1-3,8 karto mažesnė nei chitozano. Tai įrodo, kad šios reakcijos metu vyksta chitozano grandinės destrukcija, nors ir nežymi.

Reikia pastebėti, kad MSC nustatytas ribinis klampos skaičius (3.17 lentelė) yra mažesnis nei išmatuotas Ubelodės viskozimetru (3.16 lentelė). Kaip žinia, tiriant kopolimerus MSC būdu, prieš analizę paruošti tirpalai filtruojami pro 0,22 μm filtrą. Šios procedūros metu pašalinami didžiausi agregatai, todėl ir išmatuota klampa yra mažesnė.

RAFT perdavos agentas CPAD, kuriame taip pat yra karboksigrupė, buvo jungiamas prie pradinio, o taip pat prie di- ir trikarboksirūgštimis modifikuoto chitozano pagal panašią metodiką, kaip prie chitozano prijungiant daugiafunkcines karboksirūgštis. CPAD buvo prijungiamas silpnai rūgštinėje terpėje (pH ≈ 6,5), naudojant 4-kartinį EDC perteklių CPAD atžvilgiu. Priklausomai nuo CPAD kiekio chitozano aminogrupių atžvilgiu, gauti skirtingo PL chitozano dariniai (3.18 lentelė).

3.18 lentelė. Chitozano ir chitozano nanodalelių modifikavimo CPAD rezultatai

Chitozanas (jo darinys)	Chz : CPAD	Išeiga, %	PL*, %	[η], dL/g
Chitozanas	1 : 0,05	81	3	4,64
	1 : 0,10	44	7	3,80
	1 : 0,30	89	27	-
	1 : 0,60	46	66**	-
Chz- <i>N</i> -AR (PL 10%)	1 : 0,18	68	12	2,12
Chz- <i>N</i> -CR (PL 17%)	1 : 0,25	64	15	-
Chz- <i>N</i> -VR (PL 8%)	1 : 0,05	72	5	2,42

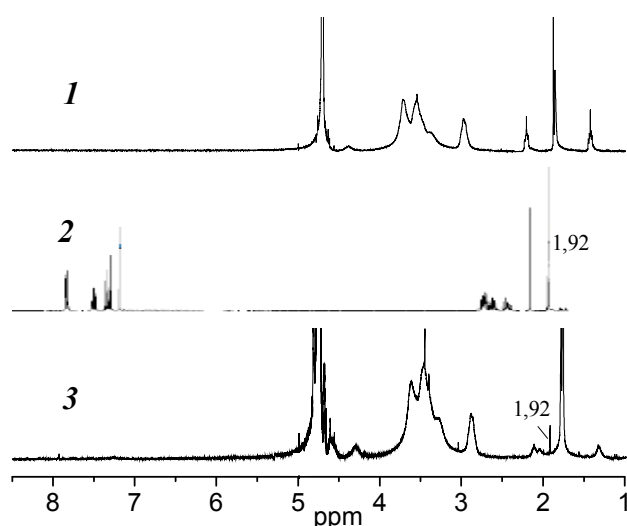
*– iš ¹H BMR spektrų;

** – pagal N kiekį.

Esant nedideliame chitozano PL (3-7 %), buvo gauti vandenyje tirpūs chitozano-CPAD dariniai. Chitozano PL pasiekus 27 %, chitozano-*N*-CPAD

dariniai tampa netirpiaisi, tačiau gerai brinksta vandeninėje terpėje; jei PL žymiai didesnis (PL 45-90 %), CPAD modifikuoti chitozano dariniai jau nebrinksta.

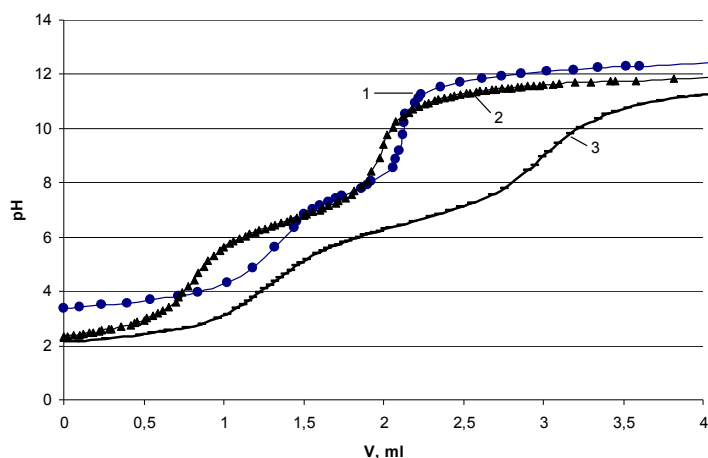
CHZ-*N*-AR-*N*-CPAD ^1H BMR spektre matyti chitozano, adipo rūgšties bei CPAD protonams būdingi signalai (3.26 pav.). Tiesa, CPAD signalai labai silpni, jie tampa matomais tik spektrą padidinus. Rūgštinėje terpėje Chz-*N*-AR-*N*-CPAD dariniai įgauna tokią konformaciją, kad hidrofobinės CPAD liekanos „paslepamos“ makromolekulių viduje, todėl CPAD arilgrupės protonų signalas arba nematomas, arba labai silpnas. Gerai matomas CPAD metilgrupės protonų signalas (1,92 ppm), todėl lyginant šio signalo ir chitozano H-2 protono (2,97 ppm) signalo intensyvumus buvo apskaičiuotas chitozano PL jo dariniuose su CPAD.



3.26 pav. Chz-*N*-AR (PL 10%) (1) ($\text{D}_2\text{O}/\text{acto}$ rūgštis- d_4), CPAD (CDCl_3) (2) ir CHZ-*N*-AR(PL 10%)-*N*-CPAD(PL 12%) ($\text{D}_2\text{O}/\text{acto}$ rūgštis- d_4) (3) ^1H BMR spektrai

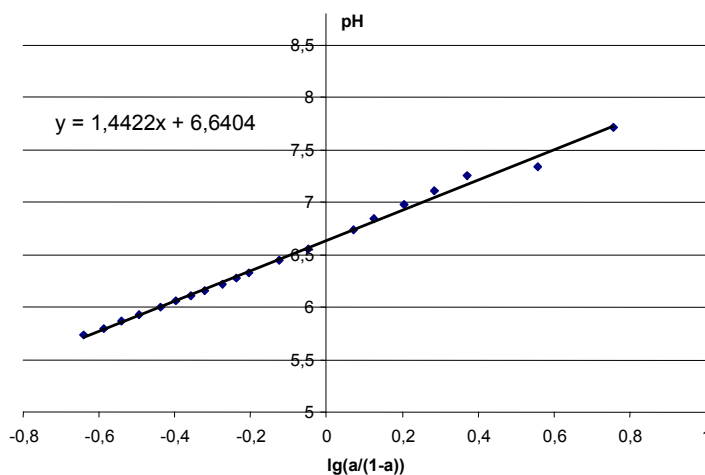
Siekiant nustatyti, ar chitozano modifikavimo di- ir trikarboksirūgštimis produktai pasižymi poliamfolitams būdingomis savybėmis, jie buvo ištirpinti 0,01 M HCl tirpale ir titruojami 0,05 M NaOH tirpalu. Potenciometriškai titruojant chitozano darinių vandeninius tirpalus, esant pastoviai joninei jėgai (0,1 M NaCl), buvo gautos du perlinkius turinčios titravimo kreivės (3.27 pav.). Pirmajame perlinkio taške (pH apie 4-6) pilnai neutralizuojamas

HCl ir karboksigrupės, o antrajame (pH apie 8-10) – protonizuojamos aminogrupės.



3.27 pav. Chitozano – di(tri)karboksirūgščių darinių Chz-*N*-CR (PL 17%) (1), Chz-*N*-VR (PL 22%) (2) ir Chz-*N*-AR (PL 15%) (3) potenciometrinio titravimo kreivės

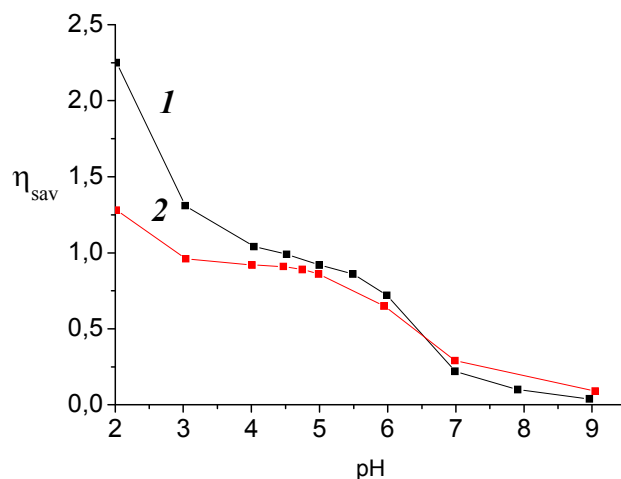
Potenciometrinio titravimo duomenis pateikus Hendersono-Hazelbalcho lygties koordinatėse (3.28 pav.), buvo įvertintos chitozano pK_a vertės šiuose dariniuose (3.19 lentelė). Jos gana gerai sutampa su anksčiau publikuotomis chitozano ir jo darinių pK_a vertėmis [181].



3.28 pav. Chz-*N*-AR (PL 15%) potenciometrinio titravimo duomenys, pateikti Hendersono – Hazelbalcho lygties koordinatėse

Visų di- ir trikarboksirūgštimis modifikuotų chitozano darinių titravimo kreivės panašios, tik skiriasi iš šių kreivių apskaičiuotas aminogrūpių kiekis

kopolimeruose (3.19 lentelė). Gauti duomenys rodo, kad chitozono nanodalelės turi pakankamai didelį aminogrupių kiekį. Karboksigrupių kiekį nustatyti iš potenciometrinio titravimo duomenų nepavyko.



3.29 pav. Chitozano-*N*-AR (PL 10 %) savitosios klampos priklausomybė nuo pH 0,03 M HCl (2) ir 0,03 M HCl/0,1 M NaCl tirpale (1)

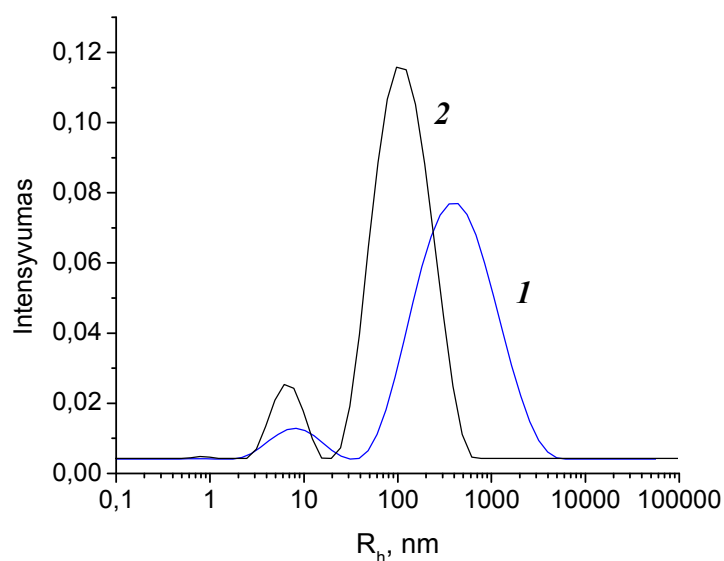
Norint įsitikinti, kad karboksirūgštimis modifikuoti chitozono dariniai pasižymi polielektrolitams būdingomis savybėmis, buvo mėginta nustatyti izoelektrinį tašką. Kaip matyti iš 3.29 pav., didinant pH, savitoji klampa pastoviai mažėjo. Didėjant pH, protonizuotos aminogrupės neutralizuojamos, atostūmio jėgos tarp teigiamą krūvį turinčių grupių mažėja, todėl ir klampa mažėja. Tikėtasi, kad toliau didinant pH, bus jonizuojamos karboksigrupės, tarp jų prasidės atostūmio jėgos, ir klampa didės. Deja, klampa ir toliau mažėjo. Pastebėta, kad esant $\text{pH} \approx 7$ tirpalas darėsi balzganas, t.y. prasidėjo makromolekulių aglomeracija ir dalelių agregacija. Taigi, dėl blogo chitozono darinio tirpumo šarminėje terpėje izoelektrinio taško nustatyti negalėjome. Izoelektrinį tašką netiesiogiai galima įvertinti ir kitais metodais. Žinoma [182], kad amfoterinį polimerą potenciometriškai titruojant vandenyje ir druskos tirpale, titravimo kreivės kertasi taške, kuris labai artimas izoelektriniam taškui. Titruojant chitozano-*N*-AR (PL 10 %) darinį, titravimo kreivės kertasi ties $\text{pH} 6,5$. Remiantis šia teorija galima teigti, kad gautos dalelės pasižymi

poliamfolitams būdingomis savybėmis. Tiesa, pagal izoelektrinio taško vertę matyti, kad karboksigrupių yra labai nedaug.

3.19 lentelė. Chitozano – di(tri)karboksirūgščių darinių potenciometrinio titravimo duomenys

Nr	Chitozano – di(tri)karboksi-rūgščių darinys	-NH ₂ , %	pKa
1	Chz- <i>N</i> -AR (PL 15%)	6,16	6,64
2	Chz- <i>N</i> -VR (PL 8%)	3,92	6,84
3	Chz- <i>N</i> -VR (PL 22%)	3,21	6,94
4	Chz- <i>N</i> -CR (PL 17%)	2,22	7,65

Di- ir trikarboksirūgščių „tilteliais“ sujungtas chitozanas sudaro nanodaleles, kurių vandeniniai tirpalai yra stabilios skaidrios arba opalescuojančios koloidinės sistemos. Chitozano modifikavimo produktų tirpalus ištyrus dinaminės šviesos sklaidos (DLS) metodu nustatyta, hidrodinaminių spindulių pasiskirstymo kreivės yra bimodalinės (3.30 pav.).



3.30 pav. Chz-*N*-AR (PL 10%) (1) ir Chz-*N*-AR (PL 10%)-*N*-CPAD (PL 12%) (2) makromolekulių ir nanodalelių hidrodinaminių spindulių pasiskirstymo kreivės

Nanodalelių hidrodinaminis spindulys priklauso nuo sintezei naudotos di(tri)karboksirūgšties ir siekia 180-850 nm (3.20 lentelė). Šalia nanodalelių

yra ir chitozano (ar modifikuoto chitozano) makromolekulių, kurių hidrodinaminis spindulys 8-30 nm. Kadangi didesnių dalelių šviesos sklaidos intensyvumas yra žymiai didesnis (nuo 3,3 iki 44 kartų), galima numatyti, kad į nanodaleles sujungta didžioji dalis modifikuoto chitozano makromolekulių. Prie chitozano nanodalelių prijungus CPAD, jų hidrodinaminis spindulys sumažėja.

3.20 lentelė. Chitozano nanodalelių DLS matavimų rezultatai

Nr.	Chitozano darinys	PL, %	Intensyvumų santykis*	R _h ** , nm
1	Chz-N-AR	10	14	11,0; 849
2	Chz-N-AR	15	3,3	7,8; 288
3	Chz-N-CR	7	5,4	10,2; 233
4	Chz-N-CR	17	4,4	11,7; 235
5	Chz-N-VR	8	39	54,7; 564
6	Chz-N-VR	22	9,1	24,9; 176
7	Chz-N-AR-N-CPAD	10 + 12	9,4	6,7; 132

*– didesnio ir mažesnio spindulio dalelių DLS intensyvumų santykis

** – vidutinės R_h vertės, apskaičiuotos iš pirmosios ir antrosios smailių

Apibendrinant galima teigti, kad chitozaną (katijoninį polimerą) dalinai sutinklinus di- ir trikarboksirūgštimis, gautos chitozano nanodalelės, turinčios amino- bei karboksigrupių ir pasižyminčios poliamfolitų savybėmis. Prie chitozano ir daugiafunkcinėmis karboksirūgštimis modifikuotų jo darinių prijungus CPAD, susintetinti RAFT makroiniciatoriai, kuriuos galima naudoti RAFT polimerizacijos nuo nanodalelių paviršiaus inicijavimui ir, tuo pačiu, chitozano nanodalelių „aprengimui“ norimo polimero sluoksniu.

IŠVADOS

1. Pirmą kartą išsamiai ištirtos „klik“ chemijos galimybės chitozaną modifikuojant metoksipolietilenglikoliu (MPEG). MPEG „klikinant“ prie chitozano per pastarojo C(2) aminogrupę arba C(6) hidroksigrupę, gautos kelios serijos chitozano-MPEG „šepėčio“ struktūros kopolimerų, besiskiriančių molekuline mase, MPEG grandinių tankiu ir savybėmis.
2. „Klik“ reakcijai reikalingas *N*-azidintas chitozanas susintetintas naudojant 4 skirtingus azidinančius reagentus. Geriausi chitozano azidavimo per aminogrupę rezultatai pasiekti azidinančiomis medžiagomis naudojant trifluormetansulfonilazidą (pakeitimo laipsnis PL 40 %) ir imidazol-1-sulfonilazido hidrochloridą (PL 65 %), tačiau antruoju atveju susidarė vandeninėje terpėje netirpūs azidinti chitozano dariniai.
3. Sintetinant chitozano-MPEG kopolimerus „klik“ chemijos metodu, „klik“ reakcija pakankamai gerai valdoma, pasiekiamas toks chitozano PL, kokį turi azidinti chitozano dariniai. „Klik“ chemijos būdu susintetinti įvairaus pakeitimo laipsnio (PL 13-40 %) chitozano dariniai, turintys triazoliliekaną, yra tirpūs tik rūgštinėje vandeninėje terpėje. „Klikavimo“ reakciją katalizuojant Cu(II)/askorbato sistema, vyksta chitozano grandinės destrukcija, todėl gautų chitozano kopolimerų molekulinė masė yra dešimtimis kartų mažesnė, negu tikėtasi.
4. Naudojant *N*-ftaloilchitozano darinius, gliukozamino grandžių C(6) padėtyje turinčius azido arba propargilo liekanas, „klik“ chemijos metodu pirmą kartą susintetinti chitozano-C(6)-TMPEG kopolimerai, kuriuose chitozano PL siekia iki 64 %. Dėl destrukcinių procesų, vykstančių aminogrupės apsaugojimo ir „klikavimo“ metu, gauti mažos molekulinės masės chitozano dariniai.
5. Siekiant išvengti destrukcinių procesų, chitozano aminogrupių apsaugai vietoje *N*-ftalinimo panaudotas chitozano kompleksavimas su natrio dodecilsulfatu. Nustatyta, kad aminogrupės taip gautuose kompleksuose

pilnai apsaugotos, kompleksas tirpus DMSO ir tinkamas vykdyti chitozano *O*-modifikavimo reakcijas. Chitozano-*C(6)*-TMPEG sintezės schema, chitozano aminograpių apsaugai naudojant CDK, nepasiteisino, šiuo būdu gauti kopolimerų nepavyko.

6. Chitozano tirpalą acto rūgštyje ar dispersiją vandenyje veikiant *N*-2,3-epoksipropil-*N,N,N*-trimetilamonio chloridu (EPTMAC), susintetinti katijonizuoto chitozano (KChz) dariniai, kuriuose chitozano katijonizavimo laipsnis (KL) siekia nuo 30 iki 67 %. KChz darinius papildomai katijonizuojant EPTMAC šarminėje terpėje, chitozano katijonizavimo laipsnis padidintas labai ženkliai (iki 190 %). Katijonizuojant chitozaną, įeinantį į CDK, gauti netirpūs chitozano dariniai. Chitozano-*N*-MPEG kopolimerų katijonizavimas vyksta sunkiai, gaunami itin mažo KL dariniai.
7. Siekiant sumažinti susintetintų KChz tirpalų klampą ir padaryti juos tinkamus nanopluoštų formavimui elektroverpimo būdu, ištirta dalinė KChz destrukcija UV spinduliuotės ir fermentų pektinazės ir celulazės poveikyje. Nustatyta, kad poveikis UV spinduliuote yra tinkamas tik tada, kai chitozano KL didelis (KL > 50 %). Fermentinė KChz tirpalų hidrolizė yra efektyvi (ypač – dalyvaujant celulazei); ją naudojant, dinaminę KChz tirpalų klampą galima sumažinti dešimtimis kartų. Iš katijonizuoto dalinai destruktuoto chitozano ir polivinilalkoholio tirpalų mišinių elektroverpimo būdu gauti katijoniniai nanopluoštai.
8. Chitozaną modifikuojant daugiafunkcinėmis vyno, citrinų ar adipo rūgštimis, susintetinti dalinai tinklinti chitozano dariniai. Chitozano PL esant 7-22 %, greta modifikuoto chitozano makromolekulių susidaro chitozano nanodalelės, kurių hidrodinaminis spindulys yra nuo 170 iki 850 nm. Esant didesniam chitozano PL, susidaro netirpūs tinklinti chitozano dariniai. Prie chitozano ir karboksirūgštimis modifikuotų chitozano nanodalelių prijungus (4-cianpentano rūgšties)-4-ditiobenzenkarboksilatą, susintetintas makroiniciatorius gyvybingajai radikalinei polimerizacijai RAFT metodu.

LITERATŪRA

1. Bock, V. D., Hiemstra, H., Maarseveen, J. H. Cu^I-Catalyzed Alkyne–Azide “Click” Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective. *European Journal of Organic Chemistry*, 2006, V. 1, p. 51-68.
2. Kolb, H. C., Finn, M. G., Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 2001, V. 40, p. 2004-2021.
3. Hein, C. D., Liu, X., Wang, D. Click Chemistry, A Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences. *Pharmaceutical Research*, 2008, V. 25 (10), p. 2216-2230.
4. Binder, W. H., Kluger, Ch. Azide/Alkyne-"Click" Reactions: Applications in Material Science and Organic Synthesis. *Current Organic Chemistry*, 2006, V. 10, p. 1791-1815.
5. Meldal, M. Polymer „Clicking“ by CuAAC reaction. *Macromolecular Rapid Communications*, 2008, V. 29, p. 1016-1051.
6. Kolb, H. C., Sharpless, K. B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today (DDT)*, 2003, V. 8 (24), p. 1128-1137.
7. Becer, C. R., Hoogenboom, R., Schubert, U. S. Click Chemistry Beyond Metal-Catalyzed Cycloaddition. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, V. 48, p. 2-11.
8. Lutz, J. F. Copper-Free Azide-Alkyne Cycloadditions: New Insights and Perspectives. *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, V. 47, p. 2182-2184.
9. Singh, I., Zarafshani, Z., Lutz, J. F., Heaney, F. Metal-Free “Click” Chemistry: Efficient Polymer Modification via 1,3-Dipolar Cycloaddition of Nitrile Oxides and Alkynes. *Macromolecules*, 2009, V. 42 (15), p. 5411-5413.
10. Agard, N. J., Prescher, J. A., Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3+2] Azide-Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, V. 126 (46), p. 15046-15047.
11. Sletten, E. M., Bertozzi, C. R. A Hydrophilic Azacyclooctyne for Cu-Free Click Chemistry. *Organic Letters*, 2008, V. 10 (14), p. 3097-3099.

12. Baskin, J. M., *et al.* Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, V. 104 (43), p. 16793-16797.
13. Newkome, G. R., Shreiner, C. D. Poly(amidoamine), polypropylenimine, and related dendrimers and dendrons possessing different 1/2 branching motifs: An overview of the divergent procedures. *Polymer*, 2008, V. 49, p. 1-173.
14. Lutz, J. F. 1,3-Dipolar Cycloadditions of Azides and Alkynes: A Universal Ligation Tool in Polymer and Materials science. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, V. 46, p. 1018-1025.
15. Parrish, B., Breitenkamp, R. B., Emrick, T. PEG- and Peptide-Grafted Aliphatic Polyesters by Click Chemistry. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, V. 127, p. 7404-7410.
16. Opsteen, J. A., Van Hest, J. C. M. Modular Synthesis of ABC Type Block Copolymers by „Click“ Chemistry. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 2007, V. 45, p. 2913-2924.
17. Altintas, O., Hizal, G., Tunca, U. ABC-Type Hetero-Arm Star Terpolymers Through „Click“ Chemistry. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 2006, V. 44, p. 5699-5707.
18. Niederhafner, P., Sebestik, J., Jezek, J. Glycopeptide dendrimers. Part II. *Journal of Peptide Science*, 2008, V. 14, p. 44-65.
19. Ossipov, D. A., Hilborn, J. Poly(Vinyl Alcohol)-Based Hydrogels Formed by „Click Chemistry“. *Macromolecules*, 2006, V. 39, p. 1709-1718.
20. Wu, P., Fokin, V. V. Catalytic Azide–Alkyne Cycloaddition: Reactivity and Applications. *Aldrichimica Acta*, 2007, V. 40 (1), p. 7-17.
21. Lewis, W. G., *et al.* Click Chemistry In Situ: Acetylcholinesterase as a Reaction Vessel for the Selective Assembly of a Femtomolar Inhibitor from an Array of Building Blocks. *Angewandte Chemie International Edition*, 2002, V. 41 (6), p. 1053-1057.
22. Speers, A. E., Adam, G. C., Cravatt, B. F. Activity-Based Protein Profiling in Vivo Using a Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3+2] Cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, V. 125 (16), p. 4686-4687.
23. Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., Sharpless, K. B. A stepwise Huisgen Cycloaddition Process: copper (I)-catalyzed regioselective „ligation“ of

- azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie International Edition*, 2002, V. 41 (14), p. 2596-2599.
24. Prieiga per internetą http://clickchemicals.com/Click_Chemistry.html [Žiūrėta 2009-07-23].
 25. Broggi, J., Joubert, N., Aucagne, V., Zevaco, T., Berteina-Raboin, S, Nolan, S., Agrofoglio, L. Study of Different Copper (I) Catalysts for the "Click Chemistry" Approach to Carbanucleosides. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 2007, V. 26 (6), p. 779-783.
 26. Chassaing, S., Kumarraja, M., Sido, A. S. S., Pale, P., Sommer, J. Click chemistry in Cu^I-zeolites: the Huisgen [3+2]- cycloaddition. *Organic Letters*, 2007, V. 9, p. 883-886.
 27. Chan, T. R., Hilgraf, R., Sharpless, K. B., Fokin, V. V. Polytriazoles as Copper(I)-Stabilizing Ligands in Catalysis. *Organic Letters*, 2004, V. 6 (17), p. 2853-2855.
 28. Meng, J., Fokin, V. V., Finn, M. G. Kinetic resolution by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Tetrahedron Letters*, 2005, V. 46, p. 4543-4546.
 29. Lewis, W. G., Magallon, F. G., Fokin, V. V., Finn, M. G. Discovery and Characterization of Catalysts for Azide-Alkyne Cycloaddition by Fluorescence Quenching. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, V. 126 (30), p. 9152-9153.
 30. Yadav, J. S., Subba Reddy, B. V., Chary, D. N., Suresh Reddy, Ch. A tandem Ferrier and Click reaction: a facile synthesis of triazolyl-2,3-dideoxypyranosides. *Tetrahedron Letters*, 2008, V. 49, p. 2649-2652.
 31. Lee, B., Park, S., Jeon, H., Kim, K. A New Solvent System for Efficient Synthesis of 1,2,3-triazoles. *Tetrahedron Letters*, 2006, V. 47, p. 5105-5109.
 32. Liebert, T., Hansch, C., Heinze, T. Click Chemistry with Polysaccharides. *Macromolecular Rapid Communications*, 2006, V. 27, p. 208-213.
 33. Pohl, M., Morris, G. A., Harding, S. E., Heinze, T. Studies on the molecular flexibility of novel dendronized carboxymethyl cellulose derivatives. *European Polymer Journal*, 2009, V. 45, p. 1098-1110.
 34. Fenn, D., Pohl, M., Heinze, T. Novel 3-O-propargyl cellulose as a precursor for regioselective functionalization of cellulose. *Reactive and Functional Polymers*, 2009, V. 69 (6), p. 347-352.

35. Hafren, J., Zou, W., Cordova, A. Heterogeneous ‘Organoclick’ Derivatization of Polysaccharides. *Macromolecular Rapid Communications*, 2006, V. 27, p. 1362-1366.
36. Ringot, C., Sol, V., Granet, R., Krausz, P. Porphyrin-grafted cellulose fabric: New photobactericidal material obtained by “Click-Chemistry” reaction. *Materials Letters*, 2009, V. 63, p. 1889-1891.
37. Krouit, M., Bras, J., Belgacem, M. N. Cellulose surface grafting with polycaprolactone by heterogeneous click-chemistry. *European Polymer Journal*, 2008, V. 44, p. 4074-4081.
38. Yamashita, E., Okubo, K., Negishi, K., Hasegawa, T. Regioselective and Quantitative Modification of Cellulose to Access Cellulose-based Advanced Materials: Cellulose-based Glycoclusters. *Chemistry Letters*, 2009, V. 38, p. 122-123.
39. Wan, Q., Chen, J., Chen, G., Danishefsky, S. J. A Potentially Valuable Advance in the Synthesis of Carbohydrate-Based Anticancer Vaccines through Extended Cycloaddition Chemistry. *The Journal of Organic Chemistry*, 2006, V. 71 (21), p. 8244-8249.
40. Zhang, J., Xu, X. D., Wu, D. Q., Zhang, X. Z., Zhuo R. X. Synthesis of thermosensitive P(NIPAAm-co-HEMA)/cellulose hydrogels via “click” chemistry. *Carbohydrate Polymers*, 2009, V. 77, p. 583-589.
41. Crescenzi, V., Cornelio, L., Meo, Ch. D., Nardecchia, S., Lamanna, R. Novel Hydrogels via Click Chemistry: Synthesis and Potential Biomedical Applications. *Biomacromolecules*, 2007, V. 8, p. 1844-1850.
42. Testa, G., Meo, Ch. D., Nardecchia, S., Capitani, D., Mannina, L., Lamanna, R., Barbetta, A., Dentini, M. Influence of dialkyne structure on the properties of new click-gels based on hyaluronic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, V. 378, p. 86-92.
43. Neely, W.B. Dextran: structure and synthesis. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 1960, V. 15, p. 341-369.
44. Geest, B. G., Camp, W. V., Prez, F. E. D., Smedt, S. C. D., Demeester, J., Hennink, W. E. Biodegradable microcapsules designed via ‘click’ chemistry. *Chemical Communications*, 2008, p. 190-192.

45. Hasegawa, T., Umeda, M., Numata, M., Li, Ch., Bae, A. H., Fujisawa, T., Haraguchi, S., Sakurai, K., Shinkai, S. "Click Chemistry" on Polysaccharides: a Convenient, General, and Monitorable Approach to Develop (1→3)- β -d-glucans with Various Functional Appendages. *Carbohydrate Research*, 2006, V. 341 (1), p. 35-40.
46. Hasegawa, T., Umeda, M., Numata, M., Fujisawa, T., Haraguchi, S., Sakurai, K., Shinkai, S. Click Chemistry on Curdlan: A Regioselective and Quantitative Approach to Develop Artificial β -1,3-Glucans with Various Functional Appendages. *Chemistry Letters*, 2006, V. 35 (1), p. 82-83.
47. Marmuse, L., Nepogodiev, S. A., Field, R. A. "Click chemistry" en route to pseudo-starch. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2005, V. 3, p. 2225-2227.
48. Nepogodiev, S. A., Dedola, S., Marmuse, L., Oliveira, M. T., Field, R. A. Synthesis of triazole-linked pseudo-starch fragments. *Carbohydrate Research*, 2007, V. 342, p. 529-540.
49. Sun, X. L., Stabler, Ch. L., Cazalis, Ch. S., Chaikof, E. L. Carbohydrate and Protein Immobilization onto Solid Surfaces by Sequential Diels-Alder and Azide-Alkyne Cycloadditions. *Bioconjugate Chemistry*, 2006, V. 17 (1), p. 52-57.
50. Gao, Y., Zhang, Z., Chen, L., Gu, W., Li, Y. Synthesis of 6-*N,N,N*-Trimethyltriazole Chitosan via "Click Chemistry" and Evaluation for Gene Delivery. *Biomacromolecules*, 2009, V. 10 (8), p. 2175-2182.
51. Zhang, F., Bernet, B., Bonnet, V., Dangles, O., Sarabia, F., Vaselia, A. 2-Azido-2-deoxycellulose: Synthesis and 1,3-dipolar Cycloaddition. *Helvetica Chimica Acta*, 2008, V. 91 (4), p. 608-617.
52. Lallana, E., Fernandez-Megia, E., Riguera, R. Surpassing the Use of Copper in the Click Functionalization of Polymeric Nanostructures: A Strain-Promoted Approach. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, V. 131, p. 5748-5750.
53. Prieiga per internetą http://en.wikipedia.org/wiki/Quaternary_ammonium_cation#cite_note-1 žiūrėta [2010-05-01].
54. Zhang, L. M. New Water-Soluble Cellulosic Polymers: A Review. *Macromolecular Materials and Engineering*, 2001, V. 286, p. 267-275.

55. Song, Y., Sun, Y., Zhang, X., Zhou, J., Zhang, L. Homogeneous Quaternization of Cellulose in NaOH/Urea Aqueous Solutions as Gene Carriers. *Biomacromolecules*, 2008, V. 9 (8), p. 2259-2264.
56. Song, Y., Zhou, J., Li, Q., Guo, Y., Zhang, L. Preparation and Characterization of Novel Quaternized Cellulose Nanoparticles as Protein Carriers. *Macromolecular Bioscience*, 2009, V. 9, p. 857-863.
57. Yan, L., Tao, H., Bangal, P. R. Synthesis and Flocculation Behavior of Cationic Cellulose Prepared in a NaOH/Urea Aqueous Solution. *Clean*, 2009, V. 37 (1), p. 39-44.
58. Glaied, O., Dube, M., Chabot, B., Daneault, C. Synthesis of cationic polymer-grafted cellulose by aqueous ATRP. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2009, V. 333, p. 145-151.
59. Sableviciene, D., Klimaviciute, R., Bendoraitiene, J., Zemaitaitis, A. Flocculation properties of high-substituted cationic starches. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2005, V. 259, p. 23-30.
60. Klimaviciute, R., Riauka, A., Zemaitaitis, A. The Binding of Anionic Dyes by Cross-Linked Cationic Starches. *Journal of Polymer Research*, 2007, V. 14, p. 67-73.
61. Sidlauskiene, D., Klimaviciute, R., Zemaitaitis, A. Adsorption of Hexavalent Chromium on Cationic Starches with Different Degree of Crosslinking. *Journal of Applied Polymer Science*, 2008, V. 107, p. 3469-3475.
62. Bendoraitienė, J., Kavaliauskaitė, R., Plačenytė, N., Valikonytė, V., Žemaitaitis, A. Katijoninio krakmolo ir jo jodo kompleksų antimikrobinis veiksmingumas. *Cheminė technologija*, 2007, V. 44 (2), p. 61-69.
63. Liesiene, J. Synthesis of water-soluble cationic cellulose derivatives with tertiary amino groups. *Cellulose*, 2010, V. 17, p. 167-172.
64. Liesiene, J., Matulioniene, J. Application of water-soluble diethylaminoethylcellulose in oral drug delivery systems. *Reactive and Functional Polymers*, 2004, V. 59, p. 185-191.
65. Kazlauskė, J., Ulozienė, G., Liesienė, J. Celiuliozės darinių taikymas transderminei vaistų pernašai. *Cheminė technologija*, 2009, Nr. 4 (53), p. 11-17.
66. Matulionienė, J., Kiverienė, J., Liesienė, J. Celiuliozės dariniai kontroliuojamo vaistų atpalaidavimo sistemose. *Cheminė technologija*, 2003, Nr. 4 (30), p. 73-78.

67. Klimavičiūtė, R., Bendoraitienė, J., Žemaitaitis, A. Katijoninių polisacharidų flokuliacinės savybės. *Cheminė technologija*, 2002, Nr. 2 (23), p. 40-44.
68. Bendoraitiene, J., Kavaliauskaite, R., Klimaviciute, R., Zemaitaitis, A. Peculiarities of Starch Cationization with Glycidyltrimethylammonium Chloride. *Starch/Stärke*, 2006, V. 58, p. 623-631.
69. Guerrini, M. M., Lochhead, R. Y., Daly, W. H. Interactions of aminoalkylcarbamoyl cellulose derivatives and sodium dodecyl sulfate. 2. Foam stabilization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1999, V. 147, p. 67-78.
70. Manuszak-Guerrini, M., Culberson, A., Doris, A., Daly, W. H. Cationic cellulose derivatives of controlled charge density useful in cosmetic preparations. *United States Patent*, 5981737.
71. Hebeish, A., Abdel-Rahman, A., El-Hilw, Z., Hashem, M. Cationized Starch Derived From Pre-Oxidized Starch For Textile Sizing and Printing. *Starch/Stärke*, 2005, V. 57, p. 616-623.
72. Radosta, S., Vorweg, W., Ebert, A., Begli, A. H., Grülç, D., Wastyn, M. Properties of Low-substituted Cationic Starch Derivatives Prepared by Different Derivatisation Processes. *Starch/Stärke*, 2004, V. 56, p. 277-287.
73. Pigorsch, E. Spectroscopic Characterisation of Cationic Quaternary Ammonium Starches. *Starch/Stärke*, 2009, V. 61, p. 129-138.
74. Heinze, T., Haack, V., Rensing, S. Starch Derivatives of High Degree of Functionalization. 7. Preparation of Cationic 2-Hydroxypropyltrimethylammonium Chloride Starches. *Starch/Stärke*, 2004, V. 56, p. 288-296.
75. Khalil, M. I., Aly, A. A. Preparation and Evaluation of Some Cationic Starch Derivatives as Flocculants. *Starch/Stärke*, 2001, V. 53, p. 84-89.
76. Krentz, D. O., Lohmann, C., Schwarz, S., Bratskaya, S., Liebert, T., Laube, J., Heinze, T., Kulicke, W. M. Properties and Flocculation Efficiency of Highly Cationized Starch Derivatives. *Starch/Stärke*, 2006, V. 58, p. 161-169.
77. Ayoub, A., Bliard, C. Cationisation of Glycerol Plasticised Wheat Starch under Microhydric Molten Conditions. *Starch/Stärke*, 2003, V. 55, p. 297-303.
78. Khalil, M. I., Dokki, S. F. Preparation of Some Cationic Starches Using the Dry Process. *Starch/Stärke*, 1998, V. 50 (6), p. 267-271.

79. Pal, S., Mal, D., Singh, R. P. Characterization of Cationic Starch: An Efficient Flocculating Agent. *Journal of Applied Polymer Science*, 2008, V. 108, p. 2674-2681.
80. Khalil, M. I., Aly, A. A. Use of Cationic Starch Derivatives for the Removal of Anionic Dyes from Textile Effluents. *Journal of Applied Polymer Science*, 2004, V. 93, p. 227-234.
81. Kweon, M. R., Bhirud, P. R., Sosulski, F. W. An aqueous alcoholic-alkaline process for cationization of corn and pea starches. *Starch/Stärke*, 1996, V. 48, p. 214-220.
82. Gruber, E., Bothor, R. Cationisation of Starch Granules by Graft Copolymerisation. *Starch/Stärke*, 1998, V. 50 (6), p. 257-264.
83. Jones, D. A., Fanta, G. F., Burr, R. C. Flocculants from starch graft copolymers. *United States Patent*, 3669915.
84. Deets, G. L., Tamalis, W. G. Cationic grafted starch copolymers. *United States Patent*, 4684708.
85. Richardson, S., Gorton, L. Characterisation of the substituent distribution in starch and cellulose derivatines. *Analytica Chimica Acta*, 2003, V. 497, p. 27-65.
86. Е.А. Плиско, Л.А. Нубьга, С.Н. Данилов. Хитин и его химические превращения. *Успехи химии*, 1977, Т.46, с. 1478-1481.
87. Domard, A., Rinaudo, M., Terrassin, C. New method for the quaternization of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1986, V. 8 (2), p. 105-107.
88. Mourya, V. K., Inamdar, N. N. Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2009, V. 20, p. 1057-1079.
89. Wu, J., Wei, W., Wang, L. Y., Su, Z. G., Ma, G. H. Preparation of uniform-sized pH-sensitive quaternized chitosan microsphere by combining membrane emulsification technique and thermal-gelation method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2008, V. 63 (2), p. 164-175.
90. Wu, J., Wei, W., Wang, L. Y., Su, Z. G., Ma, G. H. A thermosensitive hydrogel based on quaternized chitosan and poly(ethylene glycol) for nasal drug delivery system. *Biomaterials*, 2007, V. 28, p. 2220-2232.

91. Channasanon, S., Graisuwan, W., Kiatkamjornwang, S., Hoven, V. P. Alternating bioactivity of multilayer thin films assembled from charged derivatives of chitosan. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2007, V. 316, p. 331-343.
92. Qin, C., Xiao, Q., Li, H., Fang, M., Liu, Y., Chen, X., Li, Q. Calorimetric studies of the action of chitosan-*N*-2-hydroxypropyl trimethyl ammonium chloride on the growth of microorganisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2004, V. 34, p. 121-126.
93. Lapitsky, Y., Zahir, T., Shoichet, M. S. Modular biodegradable biomaterials from surfactant and polyelectrolyte mixtures. *Biomacromolecules*, 2008, V. 9, p. 166-174.
94. Verheul, R. J., Amidi, M., Steenbergen, M. J., Riet, E., Jiskoot, W., Hennink, W. E. *Biomaterials*, 2009, V. 30, p. 3129-3235.
95. Belalia, R., Grelier, S., Benaissa, M., Coma, V. New bioactive biomaterials based on quaternized chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, V. 56, p. 1582-1588.
96. Seong, H. S., Whang, H. S., Ko, S. W. Synthesis of a Quaternary Ammonium Derivative of Chitooligosaccharide as Antimicrobial Agent for Cellulosic Fibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 2000, V. 76, p. 2009-2015.
97. Cho, J., Grant, J., Piquette-Miller, M., Allen, C. Synthesis and physicochemical and dynamic mechanical properties of a water-soluble chitosan derivative as a biomaterial. *Biomacromolecules*, 2006, V. 7, p. 2845-2855.
98. Nan, C. W., Kim, Y. H., Ko, S. W. Modification of polyacrylonitrile (PAN) fiber by blending with *N*-(2-hydroxy)propyl-3-trimethylammonium chitosan chloride. *Journal of applied polymer science*, 1999, V. 74 (9), p. 2258-2265.
99. Guerrini, M. M., Negulescu, I. I., Daly, W. H. Interactions of Aminoalkylcarbamoyl Cellulosics and Sodium Dodecyl Sulfate. I. Surface Tension. *Journal of Applied Polymer Science*, 1998, V. 68, p. 1091-1097.
100. Kim, C. H., Kim, S. Y., Choi, K. S. Synthesis and Antibacterial Activity of Water-soluble Chitin Derivatives. *Polymers for Advanced Technologies*, 1997, V. 8, p. 319-325.
101. Скрябин, К.Г., Вихорева, Г.А., Варламов, В.П. ХИТИН И ХИТОЗАН. Получение, свойства и применение. Москва, Наука, 2002.

102. Sun, Y., Wan, A. Preparation of Nanoparticles Composed of Chitosan and Its Derivatives as Delivery Systems of Macromolecules. *Journal of Applied Polymer Science*, 2007, V. 105, p. 552-561.
103. Li, H., *et al.* Effect of molecular weight and degree of substitution of quaternary chitosan on its adsorption and flocculation properties for potential retention-aids in alkaline papermaking. *Colloids and surfaces A: physicochemical and engineering aspects*, 2004, V. 242, p. 1-8.
104. Sun, L., *et al.* Preparation, characterization and antimicrobial activity of quaternized carboxymethyl chitosan and application as pulp-cap. *Polymer*, 2006, V. 47 (6), p. 1796-1804.
105. Holappa, J., *et al.* Synthesis of novel quaternary chitosan derivatives via *N*-chloroacyl-6-*O*-triphenylmethylchitosans. *Biomacromolecules*, 2006, V. 7 (2), p. 407-410.
106. Guo, Z. Y., Xing, R. E., Liu, S., Zhong, Z. M., Ji, X., Wang, L., Li, P. C. Antifungal properties of Schiff bases of chitosan, *N*-substituted chitosan and quaternized chitosan. *Carbohydrate Research*, 2007, V. 342, p. 1329-1332.
107. Ravi Kumar, M.N.V. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*, 2000, V. 46, p. 1-27.
108. Bhatnagar, A., Sillanpää, M. Applications of chitin- and chitosan-derivatives for the detoxification of water and wastewater — A short review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2009, V. 152, p. 26-38.
109. Gerente, C., Lee, V. K. C., Le Cloirec, P., McKay, G. Application of Chitosan for the Removal of Metals From Wastewaters by Adsorption—Mechanisms and Models Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2007, V. 37 (1), p. 41-127.
110. Buzea, C., Pacheco, I. I., Robbie, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2007, V. 2 (4), p. 17-71.
111. Silva, G. A., Ducheyne, P., Reis, R. L. Materials in particulate form for tissue engineering. 1. Basic concepts. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2007, V. 1, p. 4-24.
112. Gan, Q., Wang, T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier – Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids and Surfaces B: Biointerphases*, 2007, V. 59, p. 24-34.

113. Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, Ch., Zhang, Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, V. 60 (15), p. 1650-1662.
114. Janes, K. A., Calvo, P., Alonso, M. J. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, V. 47 (1), p. 83-97.
115. Bodnar, M., Hartmann, J. F., Borbely, J. Preparation and Characterization of Chitosan-Based Nanoparticles. *Biomacromolecules*, 2005, V. 6, p. 2521-2527.
116. Desgouilles, S., Vauthier, Ch., Bazile, D., Vacus, J., Grossiord, J. L., Veillard, M., Couvreur, P. The Design of Nanoparticles Obtained by Solvent Evaporation: A Comprehensive Study. *Langmuir*, 2003, V. 19, p. 9504-9510.
117. Kwon, S. S., *et al.* Preparation and characterization of coenzyme Q10-loaded PMMA nanoparticles by a new emulsification process based on microfluidization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2002, V. 210, p. 95-104.
118. Huang, X., Du, Y. Z., Yuan, H., Hu, F. Q. Preparation and pharmacodynamics of low-molecular-weight chitosan nanoparticles containing insulin. *Carbohydrate Polymers*, 2009, V. 76, p. 368-373.
119. Freitas, Ch., Muller, R. H. Spray-drying of solid lipid nanoparticles (SLNTM). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1998, V. 46, p. 145-151.
120. Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N., Aminabhavi, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 2004, V. 100, p. 5-28.
121. Bodnar, M., Hartmann, J. F., Borbely, J. Nanoparticles from Chitosan. *Macromolecular Symposia*, 2005, V. 227, p. 321-326.
122. Borbely, J., Bodnar, M. Nanoparticles from chitosan. *United States Patent Application*, 20050226938.
123. Tang, Z. X., Qian, J. Q., Shi, L. E. Characterizations of immobilized neutral lipase on chitosan nano-particles. *Materials Letters*, 2007, V. 61, p. 37-40.
124. Zhang, X. G., Teng, D. Y., Wu, Z. M., Wang, X., Wang, Z., Yu, D. M., Li, C. X. PEG-grafted chitosan nanoparticles as an injectable carrier for sustained protein

- release. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2008, V. 19, p. 3525-3533.
125. Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C., McCarron, P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2005, V. 44, p. 65-73.
126. Lee, D. W., Shirley, S. A., Lockey, R. F., Mohapatra, S. S. Thiolated chitosan nanoparticles enhance anti-inflammatory effects of intranasally delivered theophylline. *Respiratory Research*, 2006, V. 7 (1), p. 112.
127. Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S. I., Lee, Y. C. Thiolation of chitosan. Attachment of proteins via thioether formation. *Biomacromolecules*, 2005, V. 6, p. 880-884.
128. Martien, R., Loretz, B., Thaler, M., Majzoob, S., Bernkop-Schnurch, A. Chitonan-thioglycolic acid conjugate: An alternative carrier for oral nonviral gene delivery? *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2007, V. 82A (1), p. 1-9.
129. Lee, P. W., Peng, S. F., Su, C. J., Mi, F. L., Chen, H. L., Wei, M. C., Lin, H. J., Sung, H. W. The use of biodegradable polymeric nanoparticles in combination with a low-pressure gene gun for transdermal DNA delivery. *Biomaterials*, 2008, V. 29, p. 742-751.
130. Hua, Y., Jiang, X., Ding, Y., Ge, H., Yuan, Y., Yang, Ch. Synthesis and characterization of chitosan-poly(acrylic acid) nanoparticles. *Biomaterials*, 2002, V. 23, p. 3193-3201.
131. Mansouri, S., Lavigne, P., Corsi, K., Benderdour, M., Beaumont, E., Fernandes, J. C. Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2004, V. 57 (1), p. 1-8.
132. Wang, X., Hall, J. E., Warren, S., Krom, J., Magistrelli, J. M., Rackaitis, M., Bohm, G. G. A. Synthesis, Characterization, and Application of Novel Polymeric Nanoparticles. *Macromolecules*, 2007, V. 40, p. 499-508.
133. Tan, Y., Liu, Ch. G. Self-aggregated nanoparticles from linoleic acid modified carboxymethyl chitosan: Synthesis, characterization and application *in vitro*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2009, V. 69, p. 178-182.

134. Liu, Ch., Fan, W., Chen, X., Liu, Ch., Meng, X., Park, H. J. Self-assembled nanoparticles based on linoleic-acid modified carboxymethyl-chitosan as carrier of adriamycin (ADR). *Current Applied Physics*, 2007, V. 7 (1), p. 125-129.
135. Liu, C. G, Desai, K. G. H., Chen, X. G., Park, H. J. Linolenic acidmodified chitosan for formation of self-assembled nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, V. 53(2), p. 437-441.
136. Yu, H., Wang, W., Chen, X., Deng, C., Jing, X. Synthesis and Characterization of the Biodegradable Polycaprolactone-graft-Chitosan Amphiphilic Copolymers. *Biopolymers*, 2006, V. 83, p. 233-242.
137. Yu, J. M., Li, Y. J., Qiu, L. Y., Jin, Y. Self-aggregated nanoparticles of cholesterol-modified glycol chitosan conjugate: Preparation, characterization, and preliminary assessment as a new drug delivery carrier. *European Polymer Journal*, 2008, V. 44, p. 555-565.
138. Wang, Y. S., Liu, L. R., Jiang, Q., Zhang, Q. Q. Self-aggregated nanoparticles of cholesterol-modified chitosan conjugate as a novel carrier of epirubicin. *European Polymer Journal*, 2007. V. 43, p. 43-51.
139. Chae, S. Y., Son, S., Lee, M., Jang, M. K., Nah, J. W. Deoxycholic acid-conjugated chitosan oligosaccharide nanoparticles for efficient gene carrier. *Journal of Controlled Release*, 2005, V. 109, p. 330-344.
140. Kim, Y. H., Gihm, S. H., Park, C. R. Structural Characteristics of Size-Controlled Self-Aggregates of Deoxycholic Acid-Modified Chitosan and Their Application as a DNA Delivery Carrier. *Bioconjugate Chemistry*, 2001, V. 12 (6), p. 932-938.
141. Ohya, Y., Cai, R., Nishizawa, K., Hara, K., Ouchi, T. Preparation of PEG-grafted chitosan nanoparticles as peptide drug carriers. *S.T.P. Pharma Sciences*, 2000, V. 10 (1), p. 77-82.
142. Ouchi, T., Nishizawa, H., Ohya, Y. Aggregation phenomenon of PEG-grafted chitosan in aqueous solution. *Polymer*, 1998, V. 39 (21), p. 5171-5175.
143. Yoksan, R., Matsusaki, M., Akashi, M., Chirachanchai, S. Controlled hydrophobic/hydrophylic chitosan: colloidal phenomena and nanosphere formation. *Colloid and Polymer Science*, 2004, V. 288 (4), p. 337-342.

144. Bodnar, M., Hartmann, J. F., Borbely, J. Synthesis and Study of Cross-Linked Chitosan-*N*-Poly(ethylene glycol) Nanoparticles. *Biomacromolecules*, 2006, V. 7, p. 3030-3036.
145. Yang, X., Zhang, Q., Wang, Y., Chen, H., Zhang, H., Gao, F., Liu, L. Self-aggregated nanoparticles from methoxy poly(ethylene glycol)-modified chitosan: Synthesis; characterization; aggregation and methotrexate release *in vitro*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2008, V. 61, p. 125-131.
146. Huang, Y., Li, L., Fang, Y. Self-assembled particles of *N*-phthaloylchitosan-polycaprolactone molecular bottle brushes as carriers for controlled release of indometacin. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2010, V. 21, p. 557-565.
147. Kohane, D. S. Microparticles and Nanoparticles for Drug Delivery. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, V. 99 (2), p. 203-209.
148. Kumari, A., Yadav, S. K., Yadav, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, V. 75, p. 1-18.
149. Xu, Y., Du, Y., Huang, R., Gao, L. Preparation and modification of *N*-(2-hydroxyl) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride nanoparticle as a protein carrier. *Biomaterials*, 2003, V. 24, p. 5015-5022.
150. Zhu, S., Qian, F., Zhang, Y., Tang, C., Yin, C. Synthesis and characterization of PEG modified *N*-trimethylaminoethylmethacrylate chitosan nanoparticles. *European Polymer Journal*, 2007, V. 43, p. 2244-2253.
151. Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W. E., Yong, T., Ma, Z., Ramaseshan, R. Electrospun nanofibers: solving global issues. *Materials Today*, 2006, V. 9, p. 40-50.
152. Subbiah, T., Bhat, G. S., Tock, R. W., Parameswaran, S., Ramkumar, S. S. Electrospinning of Nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 2005, V. 96, p. 557-569.
153. Ignatova, M., Manolova, N., Rashkov, I. Novel antibacterial fibers of quaternized chitosan and poly(vinyl pyrrolidone) prepared by electrospinning. *European Polymer Journal*, 2007, V. 43, p. 1112-1122.
154. Geng, X., Kwon, O. H., Jang, J. Electrospinning of Chitosan Dissolved in Concentrated Acetic Acid Solution. *Biomaterials*, 2005, V. 26, p. 5427-5432.

155. Lim, S. H. Synthesis of a fiber-reactive chitosan derivative and its application to cotton fabric as an antimicrobial finish and a dyeing-improving agent. *A dissertation submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State University*, 2002.
156. Kurita, K., Ikeda, H., Yoshida, Y., Shimojoh, M., Harata, M. Chemoselective protection of the amino groups of chitosan by controlled phthaloylation: facile preparation of a precursor useful for chemical modifications. *Biomacromolecules*, 2002, V. 3, p. 1-4.
157. Cai G., Jiang H., Tu K., Wang L., Zhu K. A Facile Route for Regioselective Conjugation of Organo-Soluble Polymers onto Chitosan. *Macromolecular Bioscience*, 2009, V. 9 (3), p. 256-261.
158. Jameela, S. R., Lakshmi, S., James, N. R., Jayakrishnan, A. Preparation and Evaluation of Photocrosslinkable Chitosan as a Drug Delivery Matrix. *Journal of Applied Polymer Science*, 2002, V. 86 (8), p. 1873-1877.
159. Titz, A., Radic, Z., Schwardt, O., Ernst, B. A safe and convenient method for preparation of triflyl azide, and its use in diazo transfer reactions to primary amines. *Tetrahedron Letters*, 2006, V. 47 (14), p. 2383-2385.
160. Goddard-Borger, E. D., Stick R. V. An Efficient, Inexpensive and Shelf-Stable Diazotransfer Reagent: Imidazole-1-sulfonyl Azide Hydrochloride. *Organic Letters*, 2007, V. 9 (19), p. 3797-3800.
161. Makuška, R., Buika, G., Budrienė, S., Vareikis, A., Kiverienė, J., Žemaitaitis, A., Beleška, K., Gražulevičius, V.J., Radzevičius, K. Polimerų sintezė ir tyrimas. Red. Makuška, R. Vilniaus Universitetas, 2006.
162. Zanze, I., Gracias, V., Djuric, S. W. A versatile synthesis of fused triazolo derivatives by sequential Ugi/alkyne-azide cycloaddition reactions. *Tetrahedron Letters*, 2004, V. 45, 8439-8441.
163. Srisuk, S., Srikulkit, K. Properties Evaluation of Sodium Nitrite Treated Chitosan-Cotton Fabric. *Journal of the Minerals Metals & Materials Society*, 2008, V. 18, p. 41.
164. Nyffeler, P. T., Liang, Ch. H., Koeller, K. M., Wong, C. H. The Chemistry of Amine-Azide Interconversion: Catalytic Diazotransfer and Regioselective Azide Reduction. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, V. 124, p. 10773-10778.

165. Makuška, R., Goročovceva, N. Regioselective grafting of poly(ethylene glycol) onto chitosan through C-6 position of glucosamine units. *Carbohydrate Polymers*, 2006, V. 64, p. 319-327.
166. Janciauskaite, U., Makuska, R. Polyelectrolytes from natural building blocks: synthesis and properties of chitosan-*O*-dextran graft copolymers. *Chemija*, 2008, V. 19, p. 35-42.
167. Kurita, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer Science*, 2001, V. 26, p. 1921-1971.
168. Lebouc, F., Dez, I., Desbrie`res, J., Picton, L., Madec, P. J. Different ways for grafting ester derivatives of poly(ethylene glycol) onto chitosan: related characteristics and potential properties. *Polymer*, 2005, V. 46 (3), p. 639-651.
169. Kurita, K., Yoshino, H., Yokota, K., Ando, M., Inoue, S., Ishii, S., Nishimura, S.I. Preparation of tosylchitins as precursors for facile chemical modifications of chitin. *Macromolecules*, 1992, V 25, p. 3786.
170. Wang, G., Luo, X., Liu, C., Huang, J. Synthesis of ABCD 4-Miktoarm Star-Shaped Quarterpolymers by Combination of the “Click” Chemistry with Multiple Polymerization Mechanism. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 2008, V. 46, p. 2154-2166.
171. Harris, J. M., Struck, E. C., Case, M. G., Paley, M. S. Synthesis and Characterization of Poly(ethylene Glycol) Derivatives. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*, 1984, V. 22, p. 341-352.
172. Goročovceva, N., Naderi, A., Dedinaite, A., Makuska, R. Chitosan-*N*-poly(ethylene glycol) brush copolymers: synthesis and adsorption on silica surface. *European Polymer Journal*, 2005, V. 41, p. 2653-2662.
173. Tanioka, S., Matsui, Y., Irie, T., Tanigawa, T., Tanaka, Y., Shibata, H., Sawa, Y., Kono, Y. Oxidative Depolymerization of Chitosan by Hydroxyl Radical. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1996, V. 60 (12), p. 2001-2004.
174. Vargeese, C. Deprotection and purification of oligonucleotides and their derivatives. *United States Patent*, 6989442.
175. Sadeghi, A. M. M., *et al.* Permeation enhancer effect of chitosan and chitosan derivatives: Comparison of formulations as soluble polymers and nanoparticulate systems on insulin absorption in Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, V. 70 (1), p. 270-278.

176. Wang, W. A novel hydrogel crosslinked hyaluronan with glycol chitosan. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2006, V. 17, p. 1259-1265.
177. Lyons, J., Ko, F. Melt Electrospinning of Polymers: A Review. *Polymer News*, 2005, Vol. 30, p. 1-9.
178. Sharpatyi, V. A. Radiation Chemistry of Polysaccharides: 4. Free-Radical Mechanisms of Formaldehyde Formation. *High Energy Chemistry*, 2006, V.40 (1), p. 18-20.
179. Kleeberg, W., Rogler, W., Gentzkow, W. V. Rubner, R. Method for cross-linking and stabilizing polymers which can be cross-linked radically. *US Patent*, 4283505.
180. Prieiga per internetu http://www.piercenet.com/Products/Browse.cfm?fldID=02030312&WT.mc_id=keyname žiūrėta [2010-04-29].
181. Anthonsen, M.W., Smidsrod, O. Hydrogen ion titration of chitosans with varying degrees of *N*-acetylation by monitoring induced ¹H-NMR chemical shifts. *Carbohydrate Polymers*, 1995, V. 26, p. 303-305.
182. Alfrey, T., Fuoss, R. M., Morawetz, H., Pinner, H. Amphoteric Polyelectrolytes. II. Copolymers of Methacrylic Acid and Diethylaminoethyl Methacrylate. *Journal of the American Chemical Society*, 1952, V. 74, p. 438-441.

PUBLIKUOTŲ DARBŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

Moksliniai straipsniai žurnaluose, įrašytuose į Mokslinės informacijos instituto (ISI) sąrašą:

1. Kulbokaite, R., Ciuta, G., Netopilik, M., Makuska, R. *N*-PEG'ylation of chitosan via "click chemistry" reactions. *Reactive & Functional Polymers*, 2009, V. 69, p. 771-778.
2. Gruškienė, R., Čiuta, G., Makuška, R. Grafting of poly(ethylene glycol) to chitosan at *C*(6) position of glucosamine units via "click chemistry" reactions. *Chemija*, 2009, V. 20, p. 241-249.

Mokslinis straipsnis recenzuojamame Lietuvos žurnale:

1. Gorochovceva, N., Kulbokaitė, R., Juškėnas, R., Makuška, R. Synthesis and study of chitosan and poly(ethylene glycol) graft copolymers containing triazine moiety. *Chemija*, 2004, V. 15 (1), p. 22-27.

Tarptautinių konferencijų medžiaga:

1. Kulbokaite, R., Gorochovceva, N., Vaiciulis, A., Makuska, R. Additional cationization of chitosan and chitosan-poly(ethylene glycol) graft copolymers. *Programme and Proceedings of Baltic Polymer Symposium 2006*. Riga, Latvia, 2006, p.37.
2. Makuska, R., Gorochovceva, N., Janciauskaite, U., Kulbokaite, R., Dedinaite, A., Claesson, P. Brush copolymers of chitosan and poly(ethylene glycol): synthesis and properties of adsorbed layers. *Proceedings of VIIIth International Conference: Modern Perspectives in Chitin and Chitosan Studies*. Kazan, Russia, 2006, p.37-40.
3. Makuška, R., Kulbokaitė, R. Synthesis and properties of chitosan-poly(ethylene glycol) comb copolymers. In: „(Bio)degradable Polymers from Renewable Resources“. *Proceedings of the International Conference, Vienna, November 18-21, 2007*. Series „Conference Proceedings and Monographs, Vol. 8, Vienna, Austria, 2008, p. 220-223.

4. Kulbokaitė, R., Čiuta, G., Makuška, R. Synthesis and characterization of *N*-azidated chitosans. *Polymer Chemistry and Technology: Proceedings of Scientific Conference Chemistry and Chemical Technology*. Kaunas, Lithuania, 2009, p. 83.

Konferencijų tezės:

1. Makuska, R., Janciauskaite, U., Kulbokaite, R. Synthesis and properties of chitosan brush polyelectrolytes. *European Polymer Congress 2007: Programme and Book of Abstracts*. Portoroz, Slovenia, 2007, p. 243.
2. Janciauskaite, U., Kulbokaite, R., Makuska, R. Breakdown of chitosan backbone under synthesis of its *O*-derivatives. *Chemija 2007: Abstracts of 8th National Lithuanian Conference*. Vilnius, Lithuania, 2007, p.69.
3. Kulbokaite, R., Makuska, R. Synthesis of chitosan-poly(ethylene glycol) comb copolymers employing “click” chemistry. *Baltic Polymer Symposium 2007: Programme and Book of Abstracts*. Druskininkai, Lithuania, 2007, p.62.
4. Makuška, R., Kulbokaitė, R., Bendoraitienė, J., Adomavičiūtė, E., Milašius, R. Quaternization of chitosan and its use for preparation of cationic nanofibres by electrospinning. *International Conference “Polyelectrolytes 2008”. Book of Abstracts*. Coimbra, Portugal, 2008, p. 199.
5. Čiuta, G., Kulbokaite, R., Makuška, R. Azidation of chitosan and “click” reactions for preparation of PEG’ylated derivatives. *IST Baltchem International Student Conference on Chemistry. Conference Book of Abstracts*. Warsaw, Poland, 2008, p. 31.
6. R. Gruskiene, R. Deveikyte, R. Makuska. Preparation and partial destruction of the quaternized chitosan derivatives. *Programme and Proceedings of Baltic Polymer Symposium 2009*. Ventspils, Latvia, 2009, p.60.
7. E. Udrenaite, R. Gruskiene. *N*-Modification of chitosan with carboxylic acids by carbodiimide. *Programme and Proceedings of Baltic Polymer Symposium 2009*. Ventspils, Latvia, 2009, p.103.
8. R. Gruškienė, R. Deveikytė, R. Makuška. Cationization of chitosan and its graft-copolymers. *Chemistry 2009: Book of Abstracts*. Vilnius, Lithuania, 2009, p. 97.