

MODIFICATION CHIMIQUE DU CHITOSANE AVEC LA δ -GLUCONOLACTONE, LA β -PROPIOLACTONE ET LE GLYCIDOL

E. LOUBAKI, S. SICSI* et F. LE GOFFIC

Centre d'Etudes et de Recherches en Chimie Organique Appliquée (CERCOA) 2^{me} étage, rue Henri Dunant,
94320 Thiais, France

(Reçu le 25 juillet 1988)

Résumé—Les réactions d'acylation du chitosane par la δ -gluconolactone et la β -propiolactone, et d'alkylation par le glycidol ont été étudiées en faisant varier différents paramètres tels que la stoechiométrie et le milieu réactionnel. Le sens de la réaction (*N*- ou *O*-acylation) a été caractérisé par l'étude des spectres i.r. des produits obtenus.

INTRODUCTION

Le chitosane ou poly- β (1-4)-D-glucosamine est un dérivé de la chitine ou poly- β (1-4)-N-acétyl-D-glucosamine que l'on trouve en quantité abondante dans la nature, principalement dans le règne animal et dans quelques microorganismes [1]. L'amine primaire que comprend la molécule de chitosane confère à celui-ci des propriétés basiques dont un pK_a de 6,4.

Depuis plus de 50 ans déjà, des études tendent à développer des méthodes de dérivation du chitosane dans le but de le valoriser commercialement.

Parmi celles-ci, Karrer et White [2] ont en 1930 décrit l'acylation du chitosane avec des anhydrides carboxyliques à température élevée. Hirano *et al.* [3-6] ont également étudié l'acylation du chitosane par des anhydrides carboxyliques en modifiant les conditions réactionnelles, et ont pu mettre en évidence la *N*- et *O*-acylation. Cette étude leur a permis de mettre au point une méthode de *N*-acylation. Emmerling et Pfannemüller [7] ont étudié l'acylation du chitosane par la δ -gluconolactone dans l'éthylèneglycol et le diméthylsulfoxyde (DMSO) en présence de triéthylamine versée goutte à goutte, allant jusqu'à l'obtention de dérivés avec un degré de substitution de 1. Récemment Ohtsuki et Iwamoto [8] ont fait réagir la β -propiolactone sur le chitosane pour augmenter son hygroscopie. Enfin, Lang *et al.* [9] ont étudié la réaction du chitosane avec le glycidol, obtenu un degré de substitution de 1,44.

Tous ces travaux se caractérisent par l'absence de résultats permettant de déterminer le sens de l'acylation pour les lactones et de l'alkylation pour l'époxyde. Un des objectifs du laboratoire étant la passivation de la silice par du chitosane ou des dérivés du chitosane afin de rendre ce support compatible avec son utilisation pour la chromatographie des protéines, nous avons entrepris l'examen des conditions réactionnelles pour l'obtention de dérivés *N*-acylés par réaction de lactones, et de dérivés *N*-alkylés par réaction du glycidol.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels

Deux lots de chitosane ont été utilisés: ils ont pour origine le crabe et ont été fournis par la compagnie Rousselot S. A. Leur taux de désacétylation, déterminé par la méthode de Broussignac [1] à l'aide d'un potentiographe Metrohm Herisau E436, est respectivement de 80,5 et 85,5%. La δ -gluconolactone et la β -propiolactone proviennent d'Aldrich, le glycidol provient de Janssen. Les cellules et les membranes d'ultrafiltration sont des produits Amicon. Les spectres i.r. ont été réalisés en pastilles de KBr avec un spectrophotomètre Perkin-Elmer 1420. Les microanalyses ont été effectuées au Service Central d'Analyses du CNRS à Lyon.

2. Réaction du chitosane avec la δ -gluconolactone

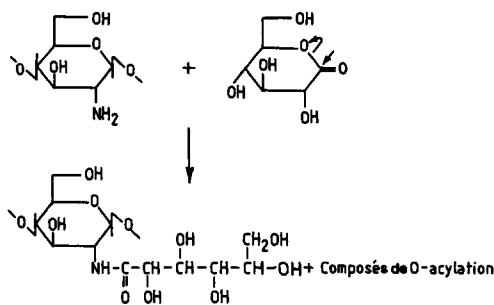
Chitosane (5 g) ayant un taux en NH₂ de 80,5% sont dissous dans 250 ml d'HCl, 0,1 N. Pour éliminer les particules insolubles, la solution est étendue avec 250 ml d'eau distillée et filtrée. La précipitation du chitosane-HCl se fait dans 1 l d'acétone. Le précipité est filtré, puis lavé à l'acétone jusqu'à l'obtention d'une poudre blanche qui est séchée au dessicteur sous vide puis à l'étuve à 60° [10].

Chitosane-HCl [0,5 g (2,5 m-equiv de NH₂)] ainsi préparés sont dissous dans 50 ml d'éthylèneglycol. On ajoute à cette solution 450 mg (2,5 mmol) de δ -gluconolactone. L'ensemble est agité à 70°. L'addition de 0,35 ml de triéthylamine (2,5 mmol) se fait soit par petites fractions de 35 µl toutes les heures, soit en une seule fois. Après 15 hr de réaction, la solution finale est filtrée dans une cellule d'ultrafiltration avec une membrane XM100 pour éliminer les petites molécules, puis le résidu est étendu avec 200 ml d'eau et à nouveau filtré. Cette opération est répétée 3 fois. Le produit est ensuite précipité dans 300 ml d'acétone, filtré et lavé à l'acétone jusqu'à l'obtention d'une poudre qui est séchée au dessicteur sous vide, puis à l'étuve à 60°. Le même protocole est utilisé avec le chitosane en suspension dans le DMSO.

3. Réaction du chitosane avec la β -propiolactone

Chitosane (5 g) ayant un taux en NH₂ de 85,5% sont dissous dans 250 ml d'HCl 0,1 N. La solution est étendue avec 150 ml d'eau distillée et filtrée pour éliminer les particules insolubles. Par addition de NaOH, 1N jusqu'à pH 7, sous faible agitation, un précipité blanc floconneux est obtenu. Ce mélange est versé dans 1 litre d'acétone, filtré puis rincé à l'acétone jusqu'à l'obtention d'une poudre

*Prière d'expédier la correspondance à cette adresse.

Schéma 1. Réaction du chitosane avec la δ -gluconolactone

blanche. Celle-ci est séchée au dessicateur sous vide puis à l'étuve à 60° [10].

Chitosane [0,5 g (2,655 m-equiv de NH₂)] ainsi préparés sont suspendus dans 20 ml d'eau distillée. On ajoute 175 μ l (2,65 mmol) de β -propiolactone. La réaction se fait à température ambiante, au bout de 2 hr de réaction on obtient une solution visqueuse claire. La même réaction donne une solution très visqueuse au bout de 1 hr avec 2 équivalents de β -propiolactone, et un gel est obtenu au bout de 5–8 min lorsque 3 ou 4 équivalents de β -propiolactone sont utilisés. Le produit final est isolé de la même façon que précédemment.

4. Réaction du chitosane avec le glycidol

(a) A pH 3. 1 g de chitosane au taux en NH₂ de 85,5% est dissous dans 50 ml d'HCl, 0,1 N. La solution finale est étendue avec 50 ml d'eau distillée et filtrée pour éliminer les particules insolubles. 50 ml (2,6 m-equiv de NH₂) de cette solution sont mis dans un ballon et 4 ml (15,6 mmol) de glycidol sont ajoutés. La réaction se fait à 60° sous agitation durant 15 hr. Le produit final est isolé de la même façon que précédemment. Le même protocole est utilisé avec le chitosane dissous dans l'acide acétique à 10%.

(b) A la neutralité: 0,5 g (2,655 m-equiv) de chitosane préparé selon le protocole décrit en (3) sont mis en suspension dans 20 ml d'eau distillée. On ajoute 1 ml (15,6 mmol) de glycidol. La réaction se fait à 60° sous agitation durant 15 hr. Le produit final est isolé de la même façon que précédemment.

RESULTATS ET DISCUSSION

Réactions d'acylation du chitosane par les lactones

1. Par la δ -gluconolactone. La réaction d'acylation du chitosane par la δ -gluconolactone a été faite dans l'éthylèneglycol [7] qui solubilise assez bien le chitosane-HCl et n'hydrolyse pas la δ -glucono-

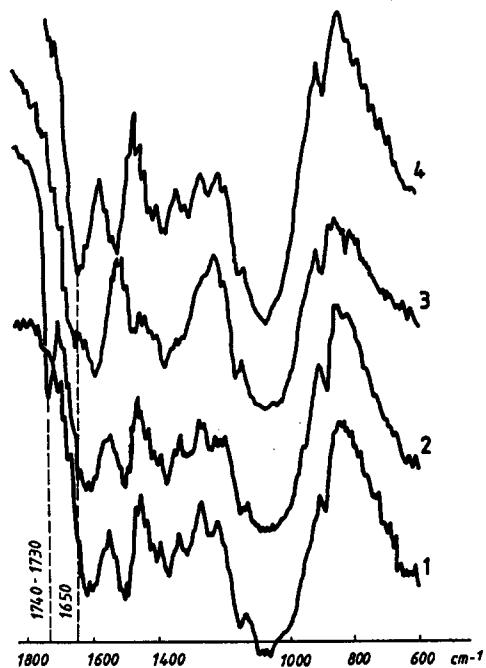


Fig. 1. Spectres des produits issus de la réaction du chitosane-HCl avec la δ -gluconolactone. Spectre 1, chitosane-HCl; spectre 2, produit d'acylation avec 3 équivalents de lactone, la triéthylamine étant ajoutée en une seule fois (expérience 2); spectre 3, produit de l'expérience (2) après O-désacylation; spectre 4, produit d'acylation avec 5 équivalents de lactone, la triéthylamine étant ajoutée par petites fractions (expérience 3).

lactone. Dans le DMSO, le chitosane-HCl n'est pas soluble et le milieu réactionnel est hétérogène. La triéthylamine a été additionnée soit en une seule fois, soit par petites fractions suivant le protocole d'Emmerling et Pfannemuller [7]. La réaction d'acylation peut conduire au produit de N-acylation et/ou au produit de O-acylation suivant le Schéma 1. Les résultats obtenus figurent dans le Tableau 1.

Les expériences (3) et (4) reproduisent bien les résultats de la littérature [7], les expériences (1) et (2) où la triéthylamine est ajoutée en une seule fois conduisent à des d.s. faibles.

L'étude des spectres i.r. (Fig. 1) des produits d'acylation combinée à la O-désacylation sélective

Tableau 1. Résultats de la réaction du chitosane-HCl avec la δ -gluconolactone

| Expérience | Excès lactone | Conditions ^a | Solvant ^b | Microanalyse du produit obtenu | | | |
|------------|---------------|-------------------------|----------------------|--------------------------------|------|------|---------------------------|
| | | | | C | N | C/N | d.s. ^c |
| — | 0 | — | — | 33,67 | 6,10 | 5,52 | 0 |
| 1 | 1 | 1 | EG | 34,57 | 5,53 | 6,25 | 0,20 |
| 2 | 3 | 1 | EG | 35,29 | 5,44 | 6,47 | 0,27 |
| 3 | 5 | 2 | EG | 35,25 | 4,86 | 7,25 | 0,47 |
| 4 | 5 | 2 | DMSO | 32,64 | 5,18 | 6,3 | 0,21 0,27 ^d |

^a1, Triéthylamine versée en une seule fois; 2, triéthylamine versée par petites fractions.

^bEG, éthylèneglycol; DMSO, diméthylsulfoxyde.

^cd.s., Degré de substitution déterminé par comparaison des rapports C/N entre le produit et le chitosane non modifié, obtenus par microanalyse. ^dObtenu par potentiométrie.

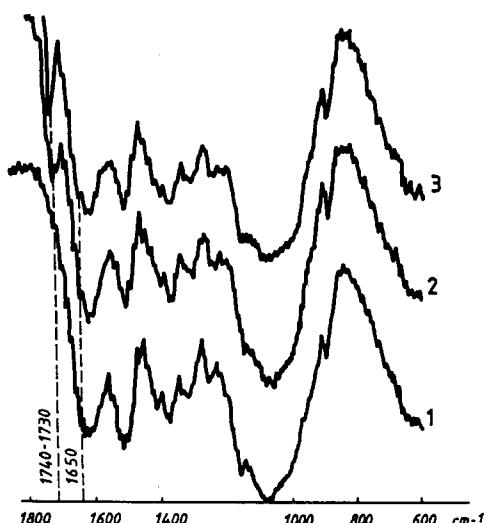


Fig. 2. Evolution de l'acylation du chitosane-HCl par la δ -gluconolactone en fonction de l'excès de gluconolactone. Spectre 1, chitosane-HCl; spectre 2, 1 équivalent de lactone (expérience 1); spectre 3, 3 équivalents de lactone (expérience 2).

par la potasse éthanolique, 0,5 N [4] a permis de déterminer le sens de l'acylation.

Le spectre du chitosane-HCl est pris comme référence. Deux bandes caractérisent la déformation symétrique et antisymétrique des groupes NH_3^+ à 1620 cm⁻¹ et 1520 cm⁻¹ [11].

Le spectre 2 est celui du produit issu de la réaction du chitosane-HCl avec 3 équivalents de gluconolactone, en présence de triéthylamine versée en une seule fois (expérience 2). On remarque la présence d'une bande à 1740–1730 cm⁻¹ et celle d'une petite bande à 1650 cm⁻¹. L'attribution de ces 2 bandes est faite après la *O*-désacylation sélective. Le spectre 3 du produit ainsi obtenu par réaction avec KOH éthanolique, 0,5 N, montre la disparition de la bande à 1730 cm⁻¹, tandis que la bande à 1650 cm⁻¹ se fait plus évidente. Ce résultat nous fait bien attribuer la bande à 1730 cm⁻¹ à la *O*-acylation, et la bande à 1650 cm⁻¹ à la *N*-acylation. Enfin le spectre 4 correspondant au produit issue de l'expérience (3), où la triéthylamine est ajoutée par petites fractions, montre nettement la présence d'une seule bande à 1650–1640 cm⁻¹ de *N*-acylation. Le même résultat est obtenu pour le produit de la réaction réalisée dans le DMSO (expérience 4).

La Fig. 2 montre l'évolution de la *O*- et de la *N*-acylation pour 1–3 équivalents de gluconolactone, quand la triéthylamine est versée en une seule fois. On remarque l'augmentation de la bande de *O*-

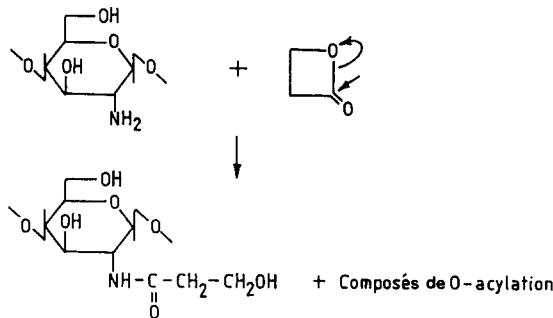


Schéma 2. Réaction du chitosane avec la β -propiolactone

acylation à 1740–1730 cm⁻¹ est plus importante que celle de la bande de *N*-acylation à 1650 cm⁻¹.

Ces résultats montrent nettement l'influence de la triéthylamine dans la compétition entre la *O*- et la *N*-acylation, dans la réaction du chitosane-HCl avec la δ -gluconolactone.

2. *Par la β -propiolactone*. D'après Gresham *et al.*, [14], la réaction de la β -propiolactone avec les amines peut aboutir à deux produits compétitifs: l'amide et/ou l'acide aminé suivant que l'amine réagit sur le carbone du carbonyle ou le carbone méthylénique en α de l'oxygène. Dans l'eau il est établi que la réaction porte essentiellement sur le carbone du carbonyle.

La réaction d'acylation par la β -propiolactone a donc été faite dans l'eau, en faisant varier le nombre d'équivalents de lactone de 1 à 4. Au départ le milieu est hétérogène et, en cours de réaction il devient homogène. Comme avec la δ -gluconolactone, il peut y avoir ici aussi réaction de *N*-ou de *O*-acylation, suivant le Schéma 2.

Les résultats obtenus figurent dans le Tableau 2.

Les expériences (1), (2) et (3) montrent l'évolution de la substitution en fonction de l'excès de β -propiolactone. L'expérience 4 indique le résultat obtenu après la *O*-désacylation. Il est à noter que la solution réactionnelle finale devient de plus en plus visqueuse à mesure que l'excès de lactone augmente.

Dans la Fig. 3 apparaissent les différents spectres i.r. obtenus.

Le spectre 1 est celui du chitosane obtenu par précipitation à pH 7. On note la présence des groupes *N*-acétyles résiduaires à 1650 cm⁻¹ et d'amines NH_2 à 1630 cm⁻¹ [11, 15].

Le spectre 2 est celui du produit de la réaction d'acylation du chitosane avec 4 équivalents de lactone (expérience 3). On observe la présence de la bande de *O*-acylation à 1720 cm⁻¹. Le même produit, après *O*-désacylation (expérience 4), donne le spectre 3 qui met en évidence la bande de *N*-acylation à 1650 cm⁻¹,

Tableau 2. Résultats de la réaction du chitosane avec la β -propiolactone dans l'eau

| Expérience | Excès lactone | Traitement par KOH 0,5 N éthanolique | Microanalyse du produit obtenu | | | |
|------------|---------------|--------------------------------------|--------------------------------|-------|------|-------|
| | | | C | N | C/N | d.s. |
| 1 | 1 | non | 41,88 | 6,30 | 6,65 | 0,52 |
| 2 | 2 | non | 40,91 | 5,94 | 6,88 | 0,640 |
| 3 | 4 | non | 41,91 | 5,025 | 8,35 | 1,4 |
| 4 | 4 | oui | 38,10 | 4,80 | 7,9 | 1,11 |

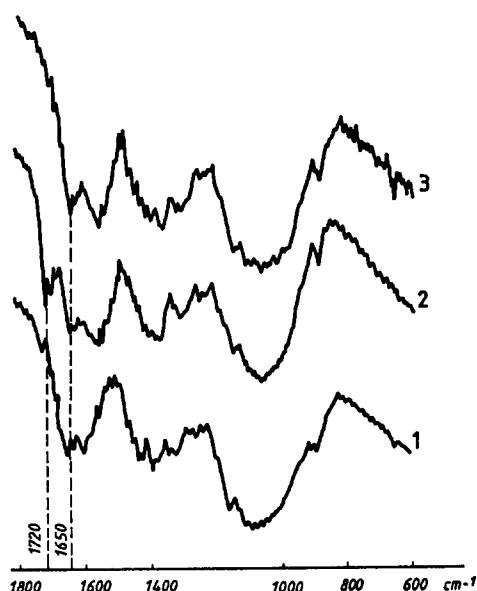


Fig. 3. Spectres des produits issus de la réaction du chitosane avec la β -propiolactone. Spectre 1, chitosane; spectre 2, produit d'acylation avec 4 équivalents de lactone (expérience 3); spectre 3, produit après O -désacétylation (expérience 4).

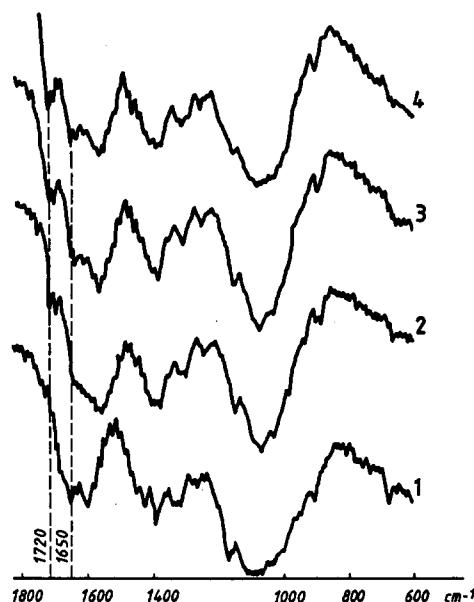


Fig. 4. Evolution de l'acylation du chitosane par la β -propiolactone en fonction de l'excès de propiolactone. Spectre 1, chitosane; spectre 2, 1 équivalent de lactone (expérience 1); spectre 3, 2 équivalents de lactone (expérience 2); spectre 4, 4 équivalents de lactone (expérience 3).

tandis que disparaît la bande de O -acylation à 1720 cm^{-1} .

Dans la Fig. 4, on peut observer l'évolution de la O -et de la N -acylation de 1 à 4 équivalents de lactone. On note qu'à 4 équivalents de lactone, les deux formes d'acylation sont bien nettes à 1720 et 1650 cm^{-1} (spectre 4).

Tous ces résultats permettent d'établir que la réaction de la β -propiolactone sur le chitosane dans l'eau conduit à des produits de O - et N -acylation. Le traitement par 4 équivalents de lactone, suivi d'une hydrolyse partielle par KOH éthanolique, conduit à un produit pratiquement totalement N -acylé.

Réactions d'alkylation du chitosane par le glycidol

La réaction du chitosane avec le glycidol donne un produit qui est hydrosoluble (Schéma 3). La réaction a été réalisée soit en solution chlorhydrique homogène à pH 3 ou acétique homogène à pH 3,6, soit en milieu hétérogène à pH 7. Une seule réaction a été faite avec 1 équivalent de glycidol. Toutes les autres ont été réalisées avec 6 équivalents de glycidol.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau 3.

Comme on pouvait le prévoir, la réaction réalisée en milieu hétérogène (expérience 4), dans laquelle le

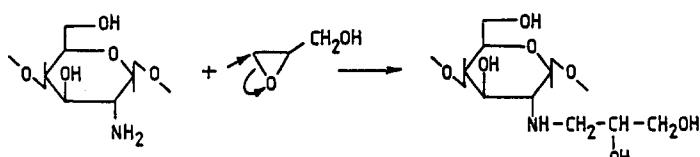


Schéma 3. Réaction du chitosane avec le glycidol

Tableau 3. Résultats de la réaction du chitosane avec le glycidol

| Expérience | Conditions | Équivalent | Microanalyse du produit obtenu | | | |
|------------|------------|------------|--------------------------------|------|-------|------|
| | | | C | N | C/N | d.s. |
| 1 | a | 1 | 38,89 | 5,92 | 6,57 | 0,53 |
| 2 | a | 6 | 39,54 | 5 | 7,9 | 1,02 |
| 3 | b | 6 | 40,87 | 6,22 | 6,57 | 0,55 |
| 4 | c | 6 | 44,04 | 3,93 | 11,20 | 2,85 |

a, Réaction dans HCl à pH 3.

b, Réaction dans l'acide acétique à pH 3,6.

c, Réaction hétérogène à la neutralité.

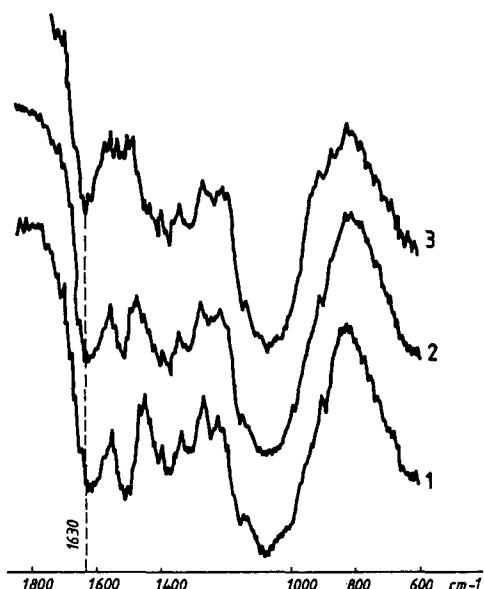


Fig. 5. Spectres de la réaction du chitosane-HCl avec le glycidol. Spectre 1, chitosane-HCl; spectre 2, produit d'alkylation avec 1 équivalent de glycidol (expérience 1); spectre 3, produit d'alkylation avec 6 équivalents de glycidol (expérience 2).

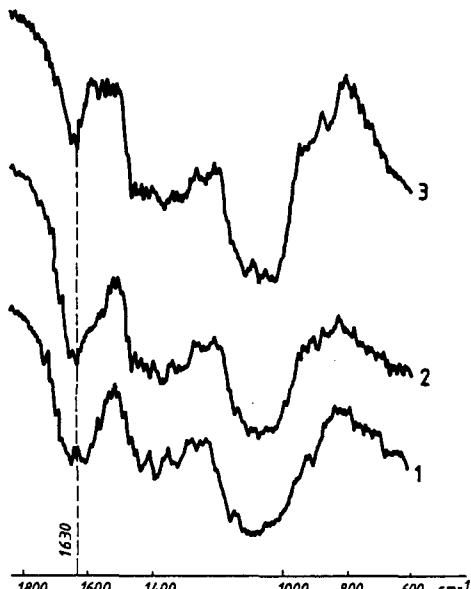


Fig. 6. Spectres de la réaction du chitosane avec le glycidol. Spectre 1, chitosane; spectre 2, produit d'alkylation du chitosane-HCl isolé sous forme d'amine libre (expérience 2); spectre 3, produit d'alkylation du chitosane à pH 7 (expérience 4).

chitosane possède ses groupements NH_2 libres, conduit au produit ayant le degré de substitution le plus élevé (2,85).

La Fig. 5 montre les spectres du chitosane-HCl et de l'alkyl-chitosane formé dans les expériences (1) et (2). Les deux bandes qui caractérisent la déformation symétrique et antisymétrique des groupes NH_3^+ à 1620 et 1520 cm^{-1} (spectre 1), diminuent sensiblement à 1 équivalent de glycidol (expérience 1, spectre 2), et font place à une seule bande qui absorbe à 1630 cm^{-1} à 6 équivalents de glycidol (expérience 2, spectre 3). Cette dernière doit correspondre aux carbonyles des acétyles résiduaires, et à la déformation des liaisons N—H qui absorbent dans cette zone [12].

La Fig. 6 compare les spectres du chitosane (spectre 1) à ceux du produit d'alkylation du chitosane à pH 3 (expérience 2), isolé sous forme d'amine libre (spectre 2) et du produit d'alkylation du chitosane en milieu hétérogène à pH 7 (spectre 3).

La comparaison des spectres 2 et 3 montre que la bande d'absorption à 1630 cm^{-1} est plus importante dans le spectre 2 (d.s. = 1,02), que dans le spectre 3 (d.s. = 2,85). Si l'on attribue la bande à 1630 cm^{-1} à la vibration de déformation N—H [12], la différence observée peut s'interpréter par la dialkylation de l'amine [9] dans l'expérience (4), alors qu'il doit y avoir essentiellement de la monoalkylation dans l'expérience (2). Le degré de substitution élevé (2,85) laisse supposer qu'il y a aussi de la O-alkylation.

CONCLUSION

Dans notre étude, nous avons vérifié que la réaction d'acylation du chitosane-HCl par la δ -gluconolactone marche mieux dans l'éthylèneglycol

que dans le DMSO. Mais le rôle de la triéthylamine varie suivant qu'on l'ajoute en une seule fois, dans ce cas, elle catalyse la N- et la O-acylation, ou qu'on l'ajoute par petites fractions tout au long de la réaction, dans ce cas, elle se comporte uniquement comme piégeur de HCl et ne favorise que la N-acylation. En général, nos résultats se rapprochent de ceux de la littérature pour 5 équivalents de gluconolactone, la triéthylamine étant versée par petites fractions [7]. Le produit final n'est pas hydrosoluble.

La réaction du chitosane avec la β -propiolactone s'effectue bien dans l'eau et dans des conditions douces. La gélification du produit final est le signe que l'acylation est effective. On obtient les deux types d'acylation, la N- et la O-acylation. Le produit final est hydrosoluble.

La réaction avec le glycidol aboutit à un produit qui est aussi hydrosoluble. Le milieu et le pH de la réaction jouent un rôle important. Ainsi, en milieu chlorhydrique à pH 3, la réaction conduit probablement à de la N-monoalkylation, alors qu'à pH 7, la réaction conduit à de la N-dialkylation et à de la O-alkylation.

BIBLIOGRAPHIE

1. P. Broussignac. *Chim. Ind. Génie chim.* **99**, 1241 (1968).
2. P. Karrel et S. M. White. *Chitin. Helv. chim. Acta* **13**, 1105 (1930).
3. S. Hirano, S. Kondo et Y. Ohe. *Polymer* **16**, 622 (1975).
4. S. Hirano et Y. Oye. *Agric. Biol. Chem.* **39**, 1337 (1975).
5. S. Hirano, Y. Oye et H. Ono. *Carbohyd. Res.* **47**, 315 (1976).
6. S. Hirano et R. Yamaguchi. *Biopolymer* **15**, 1685 (1976).
7. W. N. Emmerling et B. Pfannemüller. *Makromolek. Chem.* **184**, 1441 (1983).

8. S. Ohtsuki et R. Iwamoto. *Kobunshi Ronbunshi* **44**, 115 (1987).
9. G. Lang, E. Konrad et H. Wendel. *Proc. Int. Conf. Chitin-Chitosane 1985* (Edited by R. A. A. Muzzarelli, C. Jeuniaux) Vol. 39, p. 303 Graham Plenum, New York (1986).
10. J. Léonil. Thèse 3 ème cycle, Université P. et M. Curie, Paris 6 (1982).
11. F. G. Pearson, R. H. Marchessault et C. Y. Liang. *J. Polym. Sci.* **63**, 101 (1960).
12. R. M. Silverstein et G. Bassler. *Identification Spectrométrique des Composés Organiques*. Masson et Cie, Gautier-Villars, Paris (1968).
13. I. Fleming et D. H. Williams. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, McGraw-Hill, London (1966).
14. T. L. Gresham, J. E., Jansen, F. W. Shaver, R. A. Bankert et F. T. Fredorek. *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 3168 (1951).
15. J. Hirano, R. Yamaguchi, N. Matsuda, O. Miura et Y. Kondo. *Agric. Biol. Chem.* **41**, 1547 (1977).

Abstract—Chitosan was acylated by δ -gluconolactone and β -propiolactone, and alkylated by glycidol. These acylation and alkylations were performed by varying parameters such as stoichiometry and reaction medium. Reaction path (*N*- or *O*-acylation) was identified through study by i.r. spectroscopy of the products.