

Synteza i ocena możliwości zastosowania niektórych pochodnych chitozanu w przemyśle skórzanym. Część I: Przegląd literatury

Synthesis and evaluation of the possibility of using selected chitosan derivatives in the leather industry. Part I: Literature review

Lucjan Szuster, Łucja Wyrębska, Dorota Gendaszewska*

Institut Przemysłu Skórzanego

Abstrakt

Wzrastające obawy użytkowników obuwia przed chorobami stóp stwarzają nowe wyzwania przemysłowi obuwniczemu. Dlatego poszukiwane są nieszkodliwe dla człowieka substancje antybakteryjne, które będą skutecznie działać po zaaplikowaniu na wyroby skórzane. Takimi substancjami mogą być kopolimery oparte o naturalny polisacharyd - chitozan i jego poliglikolowe pochodne. W pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy w zakresie modyfikacji chitozanu, prowadzący do otrzymania kopolimerów, stwarzających możliwość zastosowań ich w przemyśle skórzanym.

Abstract

Increasing concerns of footwear users against foot diseases create new challenges for the footwear industry. Therefore, the antibacterial substances that will be effective after application to leather products and safe for human are still searched. Such substances may be copolymers based on natural polysaccharide - chitosan and its polyglycol derivatives. The paper presents the current state of knowledge in the field of chitosan modification leading to obtaining copolymers that may have potential applications in the leather industry.

Słowa kluczowe: chitozan, pochodne chitozanu, poliglikole, substancje antybakteryjne;

Keywords: chitosan, chitosan derivatives, polyglycols, antibacterial substances;

1. Wstęp

Wzrastające obawy użytkowników obuwia przed chorobami stóp, związane między innymi z aktywnym stylem życia, stwarzają nowe wyzwania przemysłowi obuwniczemu. Bliski kontakt buta ze stopą zapewnia doskonałe środowisko dla wzrostu bakterii i grzybów ze względu na obecność dużej wilgotności i ciepła (pot pochodzący od stóp, a także oleje i natłuszczenia od wkładek i innych elementów obuwia) [1]. Wzrost drobnoustrojów w środowisku obuwia może generować nieprzyjemne zapachy [2], wywoływać różnego rodzaju infekcje oraz spowodować pogorszenie jakości materiału obuwniczego [3, 4]. Ma to szczególnie istotny wpływ na stopy tzw. wrażliwe, takie jak np. stopy pacjentów z cukrzycą, gdzie zachodzi obawa owrzodzenia stóp, co może prowadzić nawet do amputacji [5].

* autor korespondencyjny: Dorota Gendaszewska: d.gendaszewska@ips.lodz.pl

Zapobieganie wzrostom drobnoustrojów w obuwiu jest kwestią o podstawowym znaczeniu, zarówno dla producentów obuwia, jak i z punktu widzenia konsumenta. Celem zminimalizowania problemu wzrostu drobnoustrojów w różnych typach obuwia, dostępne są na rynku antyperspiranty i preparaty w sprayu, zawierające substancje przeciwbakteryjne i przeciwgrzybiczne, stosowane bezpośrednio na stopę, lub do wewnątrz buta, jak również higroskopijne wkładki [6]. Biocydy chemiczne są również często stosowane w procesie przetwarzania skór, ale najczęściej nie nadają one właściwości przeciwdrobnoustrojowych produktom końcowym [1, 7]. Z danych opublikowanych wynika, że dotychczas do uzyskiwania powłoki antybakteryjnej na wyrobach skórzanych najczęściej stosowane jest nanosrebro [8]. Jednak jego zastosowanie w niedalekiej przyszłości może być zabronione ze względu na jego kumulację w organizmach żywych. Ponadto niektóre środki biobójcze zostały ograniczone lub zakazane ze względu na zagrożenie zdrowia ludzi oraz zanieczyszczenie środowiskowe [9]. Dlatego poszukiwane są inne substancje antybakteryjne nieszkodliwe dla człowieka, natomiast skutecznie działające po zaaplikowaniu na wyroby skórzane. Z przeglądu literaturowego wynika, że takimi substancjami mogą być kopolimery oparte o naturalny polisacharyd – chitozan i poliglikolowe pochodne.

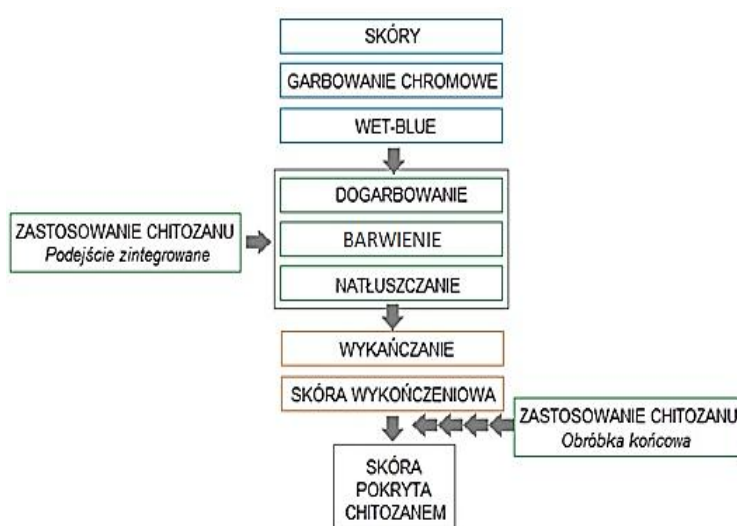
2. Wyniki analizy stanu techniki

Chitozan otrzymywany jest w wyniku deacetylacji chityny jednego z najpowszechniej występujących w przyrodzie polisacharydów. Na ogół jednak proces deacetylacji nie przebiega całkowicie [10]. Chityna jest pozyskiwana do celów przemysłowych m.in. ze szkieletów krabów oraz krewetek bądź grzybni wybranych grzybów strzępkowych [11, 12]. Struktura chitozanu składa się z części deacetylowanej (β -(1,4)-D-glukozamina) i części acetylowanej (N-acetylo-D-glukozamina) [13, 14]. Szeroki zakres zastosowań, chitozan zawdzięcza swojemu bezpieczeństwu, nietoksyczności, biokompatybilności, biodegradowalności oraz innym unikalnym właściwościom, takim jak np. możliwość tworzenia filmów i działaniu przeciwdrobnoustrojowym [13, 15]. Chitozan jest dostępny w wielu gatunkach, różniących się przede wszystkim masą molową i stopniem deacetylacji, które wpływają na jego właściwości fizyko-chemiczne [16]. Większość chitozanów jest rozpuszczalna w wodnych rozcieńczonych roztworach kwasów, np. octowego lub mrówkowego poniżej wartości pH 6,5, w których pierwszorzędowe grupy aminowe chitozanu są protonowane.

Czynnikiem ograniczającym zastosowania chitozanu jest jego słaba rozpuszczalność w neutralnym środowisku [17].

2.1. Chitozan w przemyśle obuwniczym

Od wielu lat prowadzone są badania dotyczące zastosowania samego chitozanu w wewnętrznych częściach obuwia. Według Fernandes i in. [18], najkorzystniejsze wyniki w zakresie właściwości przeciwbakteryjnych skóry uzyskano w procesie garbowania, wprowadzając chitozan na etapie utrwalania barwnika kwasowego (chitozan rozpuszcza się w stosowanym do tego celu środowisku kwaśnym), bądź powlekając w końcowym procesie obróbki poprzez dodatek chitozanu uprzednio rozpuszczonego w roztworze kwasu mrówkowego. Rys. 1 obrazuje możliwości wprowadzania chitozanu w procesie wyprawy skór.

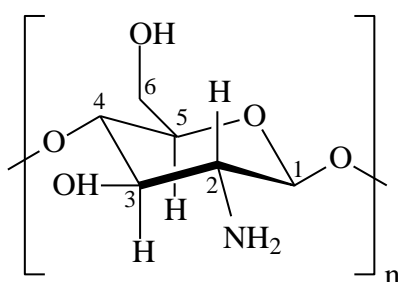


Rys. 1. Możliwości aplikacji chitozanu w procesie wyprawy skór [18].

Barros i in. [19] badali aktywność przeciwbakteryjną skóry zanurzonej przez 1 godzinę w 0,5% roztworze chitozanu rozpuszczonego w 2% roztworze kwasu octowego w temperaturze 50°C, następnie zalkalizowaniu układu NaOH do pH 5 i wysuszeniu w 60°C. Skóra wykazywała aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do trzech testowanych bakterii *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* potwierdzając w ten sposób zasadność użycia chitozanu, jako substancji czynnej, hamującej wzrost bakterii w części skórzanej obuwia [19].

2.2. Pochodne chitozanu

Pomimo potencjalnych możliwości chitozanu zapobiegania i kontroli wzrostu bakterii, ograniczenia rozpuszczalności chitozanu w wodzie w środowisku obojętnym zawężają zakres jego aplikacji. Dlatego od wielu lat szeroko prowadzone badania skupiają się na modyfikacji chemicznej chitozanu. Każda jednostka glukozaminowa chitozanu posiada grupy aminowe i hydroksylowe, podatne na modyfikację chemiczną (Rys. 2). Wyższą reaktywność posiadają grupy aminowe w pozycji C-2, w porównaniu z grupami hydroksylowymi w pozycji C-6 i C-3, co umożliwia specyficzny udział grup aminowych w większości chemicznych modyfikacji [20].



Rys. 2. Struktura chitozanu.

Próby zwiększenia rozpuszczalności chitozanu w wodzie spowodowały wytworzenie wielu jego pochodnych w wyniku np. reakcji sulfonowania [21], kwaternizacji [22, 23, 24], karboksymetylowania [25, 26] i N- i O-hydroksyalkilowania [27, 28]. Znane są również związki wytworzone w wyniku kopolimeryzacji szczepionej chitozanu na przykład z kwasem mlekowym [29], kwasem poliakrylowym [30] lub winylopirolidone [31]. Wymienione pochodne chitozanu, oprócz ich charakterystyk fizyko-chemicznych i badań potwierdzających ich budowę, ocenione zostały również pod względem zastosowań biomedycznych. Jednak żadna z wymienionych pochodnych nie spełniała oczekiwań, dotyczących rozpuszczalności w wodzie w szerokim zakresie wartości pH.

2.2.1. PEGyłowany chitozan

Zdolność rozpuszczalności w wodzie w szerokim zakresie wartości pH wykazuje tzw. PEGyłowany chitozan, który w zależności od stopnia podstawienia (DS) rozpuszcza się w wodzie przy wartości pH od 1,0 do 11,0. Poli(glikol etylenowy) (PEG) jest polimerem tlenku etylenu występującym w wielu odmianach o różnym stopniu polimeryzacji różniących się masą molową. Syntetyzuje się go poprzez polimeryzację tlenku etylenu z udziałem wody,

monoetylenoglikolu albo glikolu dietylenowego, a reakcja jest katalizowana zasadowo [32]. W wyniku tej reakcji powstaje produkt o wzorze $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$, gdzie n jest liczbą jednostek EO (ethyleneoxide – EO) [33]. Końcowe grupy hydroksylowe mają znaczący wpływ na fizyczne i chemiczne właściwości polimeru [32], który uczestniczy w tworzeniu wiązań wodorowych z tlenem pochodzącym z eterów i wodorami z H_2O [33]. PEG rozpuszcza się w wodzie, toluenie, chloroformie [33] oraz w innych, zarówno polarnych, jak i niepolarnych rozpuszczalnikach [34]. Polimer ten poprawia rozpuszczalność pokrywanych nim struktur, dzięki zapewnieniu im hydrofilowości powierzchni [33]. Stan skupienia, w jakim PEG występuje w temperaturze pokojowej, ma związek z jego masą molową (mała masa – ciecz, duża masa – ciało stałe), twardość polimeru w stanie stałym wzrasta wraz z masą molową [32]. PEG w handlu jest dostępny w szerokim zakresie mas cząsteczkowych. Literatura naukowa od wielu lat publikuje i dalej rozszerza liczne zastosowania PEG w różnych dziedzinach m.in. w opracowywaniu leków, gojeniu ran, tworzeniu modeli hodowli komórkowych i regeneracji tkanek oraz jako nośnika substancji aktywnych - np. leków. Glikol polietylenowy jest biokompatybilnym, hydrofilowym polimerem znajdującym szerokie zastosowanie w obszarach farmaceutycznych, biomedycznych i badaniach biomateriałów [35].

Proces PEGylowania, szczepienia (związania) kowalencyjnego PEG z cząsteczką chitozanu zwiększa jego rozpuszczalność w wodzie, a także podnosi zgodność biologiczną, szczególnie użyteczną przy opracowywaniu leków [36]. W procesie funkcjonalizacji chitozanu, celem uniknięcia sieciowania, powszechnie stosowany jest PEG metoksyłowany (mPEG). W takim przypadku tylko jedna, aktywowana odpowiednimi związkami, grupa wodorotlenowa mPEG reaguje z grupą aminową chitozanu. Aktywacji grupy wodorotlenowej mPEG można dokonać związkami z takich grup, jak: aldehyd, karboksyl, tosyłan, węglan p-nitrofenylu, jodek, maleimid i ester sukcyimidylu. Dotychczas wykorzystując różne pochodne PEG zsyntetyzowano kilka produktów PEGchitozanu. Stosowano różne metody modyfikacji chemicznej.

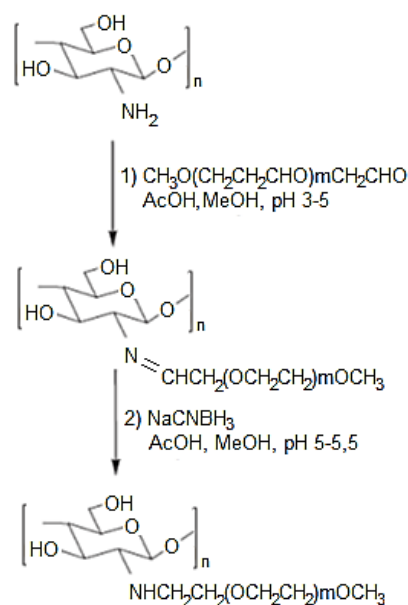
a) PEG-aldehydu (PEG - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$) [37]

Synteza pochodnych PEG i PEGylowanego chitozanu po raz pierwszy została opublikowana przez Harrisa w 1984 r. przy zastosowaniu aldehydu PEG [37]. PEG-3400 (5g, 1,7 mmola) dodano do 0,4 g bezwodnika octowego rozpuszczonego w 15 ml

dimetylosulfotlenku i mieszano przez 30 godzin w temperaturze pokojowej. Następnie wkroplono do tego 100 ml bezwodnego eteru etylowego i dwu/trzy krotnie wytrącono z chlorku metylenu z eterem etylowym.

b) PEGylowanie chitozanu [37]

Wodny roztwór aldehydu PEG (0,93 mmola) i cyjanoborowodoru sodu - NaCNBH₃ (7 mmoli, 10 ml) dodano kroplami do chitozanu (1 mmola) rozpuszczonego w mieszaninie (w proporcjach 1:1) rozcieńczonego kwasu octowego (2%) i metanolu (20 ml). Produkt wyizolowano po wytrąceniu benzenem i dializą. Stopień podstawienia oszacowano na podstawie analizy elementarnej. Przebieg reakcji obrazuje Rys. 3.



Rys. 3. Schemat syntezy PEG-g-chitozanu.

Zgodnie z powyższym schematem chitozan poddawano reakcji z aldehydem PEG poprzez wytworzenie iminy (zasady Schiffa), a następnie wytworzenie polimeru szczepionego PEG-g-chitozanu poprzez redukcję cyjanoborowodorkiem sodu (NaCNBH₃) [38]. Bhattarai i in. [38] przygotowali próbki do badań przy zastosowaniu zmiennych stosunków molowych PEG-aldehydu i cyjanoborowodoru sodowego według Tabeli 1.

Przedstawione dane w Tabeli 1 wskazują, że utrzymując ilości NaCNBH₃ na stałym poziomie (G45 - G68), ilość szczepionego PEG rośnie wraz ze wzrostem PEG/aldehyd do chitozanu. Nadmiar NaCNBH₃ zmniejsza szczepienie PEG (G36). Wszystkie próbki, oprócz próby z najniższym szczepieniem (G36), były rozpuszczalne w wodzie. Skuteczność

szczępienia PEG/chitozan potwierdzają badania publikowane w pracy [38]. Sugimoto i in. [39] na podstawie swoich badań stwierdzili, że uzyskiwany przez nich niski stopień konwersji PEG-aldehydu z chitozaniem wynika z niestabilności aldehydu PEG. Powyższe metody zastosowano również w publikacjach [40, 41].

Tabela 1. Próbkki przygotowane z różnych stosunków molowych reagentów wg [38]

| Nr próbki | PEG/aldehyd/ chitozan | NaCNBH ₃ / PEG/aldehyd | DS* | Szczep wt.** % | Δη*** (Pa*S) |
|-----------|--------------------------|--------------------------------------|------|-------------------|-----------------|
| G36 | 1,00 | 2,00 | 0,08 | 36 | - |
| G45 | 0,40 | 0,30 | 0,16 | 45 | 2,20 |
| G55 | 0,60 | 0,30 | 0,25 | 55 | 5,20 |
| G64 | 1,00 | 0,30 | 0,26 | 64 | 0,02 |
| G68 | 1,00 | 0,10 | 0,30 | 68 | 0,03 |

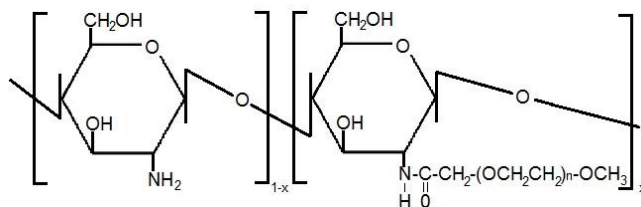
*DS-(ang. Degree of Substitution)-stopień podstawienia PEG, ** szczep wt.-waga przeszczepu obliczona wg wzoru: $(W_f - W_c)/W_t \times 100$, gdzie W_t jest masą liofilizowanego szczepionego kopolimeru, a W_c jest masą chitozanu, ***Δη-różnica lepkości wodnego roztworu (pH = 7,5) PEG-g-chitozanu w dwóch temperaturach, 10 i 37°C.

c) PEG-tosylu [37]

Chlorek tosylu (1,4 g, 7,4 mmola) rozpuszczony w 15 ml chlorku metylenu mieszano z 5 g PEG-34000g (1,5 mmoli) i 0,5 g (5,0 mmoli) trietyloaminy rozpuszczonej w 15 ml chlorku metylenu. Reakcję prowadzono w temperaturze 0°C przez 2 godziny, po czym produkt wytrącono trzykrotnie eterem etylowym.

d) PEG-karboksy [42]

Strukturę końcowego kopolimeru obrazuje Rys. 4.

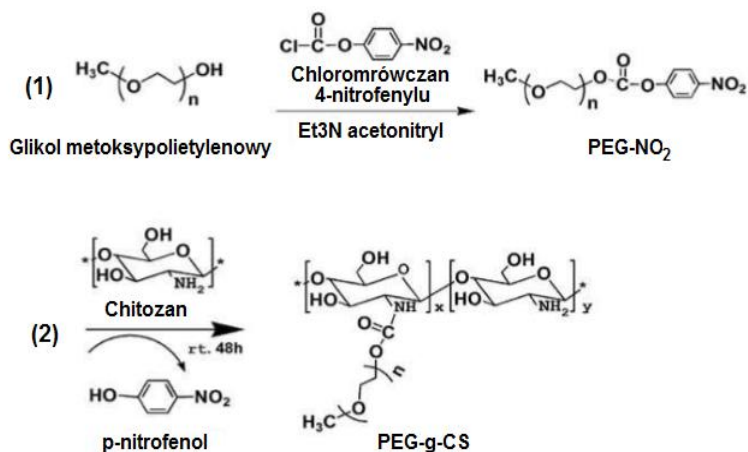


Rys. 4. Ogólna struktura PEG-g chitozanu.

e) PEG-węglan nitrofenylu [43, 44]

Metodę syntezy kopolimeru PEG-g-CS (gdzie CS to chitozan) z zastosowaniem węglanu-PEG przedstawiono na Rys. 5. Hydrofilowy PEG najpierw aktywowano w celu wytworzenia

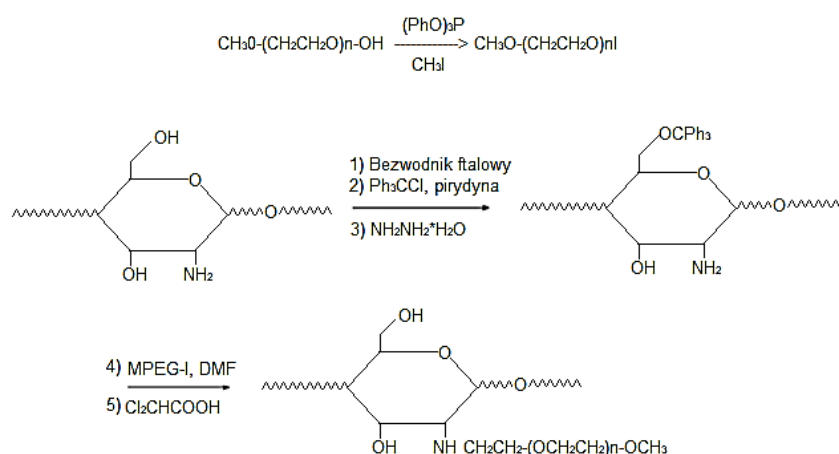
PEG-NO₂ (węglan PEG-nitrofenylu), który może reagować z grupą aminową. Podczas reakcji PEG-NO₂ z grupą aminową w czasie 48 godzin następuje odszczepienie p-nitrofenolu z utworzeniem wiązania amidowego pomiędzy PEG i CS. Masę dializowano w wodzie destylowanej przez 48 godzin, usuwając w ten sposób p-nitrofenol, a następnie kopolimer w postaci proszku poprzez liofilizację w ciągu 3 dni z wydajnością ok. 54%. Budowę potwierdzono metodą spektrofotometryczną [44].



Rys. 5. Synteza PEGylovanego chitozanu.

f) PEG-jodek [45]

Metodę syntezy kopolimeru PEG-g-CS z zastosowaniem jodku-PEG przedstawiono na Rys. 6.



Rys. 6. Syntezy kopolimeru PEG-g-CS z zastosowaniem jodku – PEG.

Zabezpieczając grupę wodorotlenową, uniknięto podstawienia jej PEG z powodu zbyt dużej reaktywności PEG-I. Grupę ochronną usunięto za pomocą kwasu dichlorooctowego. Zmieniając stosunki reagentów uzyskano polimery o różnym stopniu podstawienia. Wyniki procesu przedstawia Tabela 2.

Tabela 2. Synteza PEG-g-chitozanu [45]

| Nr próbki | PEG/CS [mol/mol] | DS [%] | Wydajność [%] |
|-----------|------------------|--------|---------------|
| C1 | 0,6 | 15 | 73 |
| C2 | 0,8 | 24 | 71 |
| C3 | 1,2 | 37 | 68 |
| C4 | 1,6 | 42 | 69 |

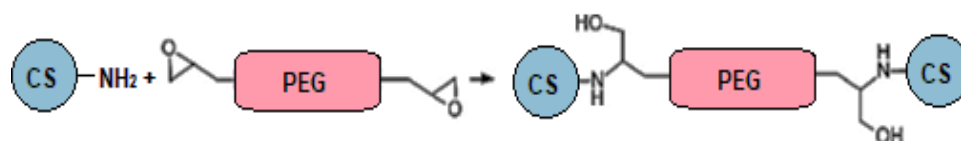
Pochodne chitozanu scharakteryzowano metodą FTIR, ^1H ^{13}C NMR, NMR i DSC. Wszystkie kopolimery przy zmieniających się stosunkach reagentów były rozpuszczalne w wodzie w szerokim zakresie pH. Ponadto rozpuszczały się w DMF i DMSO przy DS >24% (Tabela 3).

Tabela 3. Rozpuszczalność PEG-g-chitozanu

| Nr | DS [%] | Rozpuszczalność | | | | |
|----|--------|--------------------|---|-----------------|-----|------|
| | | 0,1 M PBS (pH=7,4) | Bufor 0,1 M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (pH=10) | CHCl_3 | DMF | DMSO |
| C1 | 15 | + | + | - | - | - |
| C2 | 24 | + | + | - | ± | ± |
| C3 | 37 | + | + | - | + | + |
| C4 | 42 | + | + | - | + | + |

g) PEGepoksyd [46, 47]

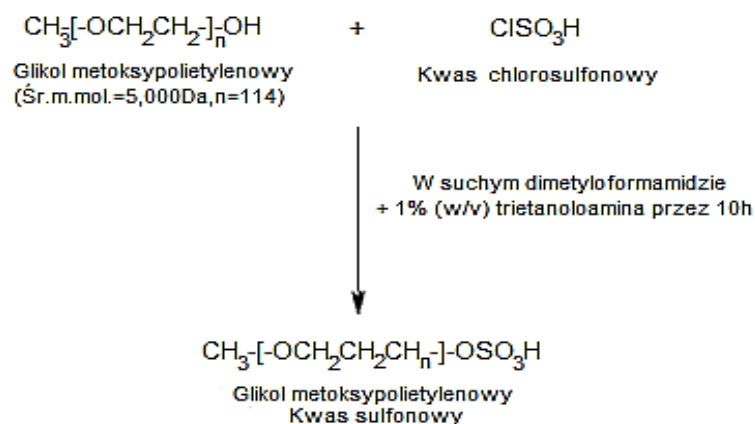
Kiuchi i in. [46] i Tanuma i in. [47] wykorzystali pochodną diepoksydową PEG jako środek sieciujący, który łatwo reagował z pierwszorzędową grupą aminową chitozanu (Rys. 7).



Rys. 7. Schemat reakcji pochodnej diepoksydowej PEG z chitozaniem [46].

h) PEG-sulfonian [48]

Przebieg reakcji przedstawiono na Rys. 8.



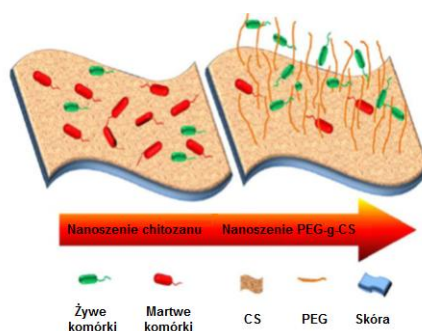
Rys. 8. Schemat syntezy sulfonianu mPEG.

2.2.2. Rozpuszczalność PEGylowanego chitozanu

Jedną z korzyści PEGylowania chitozanu jest polepszenie rozpuszczalności. Liczne badania donoszą, że rozpuszczalność zależy od DS i długości łańcuchów PEG [49, 50]. Jeongi in. [49] wykazali, że PEGylowany chitozan ze stopniem podstawienia (DS) w zakresie od 5 do 20% i masie cząsteczkowej PEG do 2 kDa wykazały rozpuszczalność w wodzie do pH 11, w przeciwieństwie do chitozanu (IS-chitozanu), który wykazywał granicę rozpuszczalności przy pH 6. Ponadto, stwierdzono, że rozpuszczalność mPEG-g-chitozanu o różnym stopniu podstawienia osiąga dobrą rozpuszczalność w DMSO i DMF [49].

3. Korzyści z aplikacji na skórę PEGylowanego chitozanu

Aplikacja PEGylowanego chitozanu może doprowadzić do wytworzenia wysoko wydajnych powłok antybakteryjnych na skórze.



Rys. 9. Ilustracja właściwości antybakteryjnych powłok chitozanu i PEG-chitozanu [44].

Syntetyzowana pochodna w przeciwieństwie do chitozanu nie ogranicza jej zastosowania tylko w roztworach kwaśnych i może skutecznie zapobiegać przywieraniu drobnoustrojów do skóry, dzięki właściwościom antyadhezyjnym łańcuchów PEG (Rys. 9). W polimerze składnik PEG może pomagać w zapobieganiu przylegania bakterii do powierzchni powłoki, podczas gdy chitozan będzie trwale hamował wzrost żywych komórek. W związku z tym, te przeciwbakteryjne i ekologiczne powłoki są korzystne dla przemysłu skórzanego i konsumentów.

4. Podsumowanie

Badania prowadzone w ostatnich latach w kierunku modyfikacji chemicznych chitozanu i jego poliglikolowych pochodnych omówiono w przedstawionym artykule. Omawiane pochodne mogą znaleźć zastosowanie w aplikacjach zarówno w przemyśle włókienniczym, jak i skórzanym. Przedstawiony materiał jest elementem prac prowadzonych w IPS nad syntezą nowych pochodnych chitozanu.

Literatura

- [1] Orlita A.: *Microbial biodeterioration of leather and its control: A review*, International Biodeterioration and Biodegradation, **53**, 2004, str. 157 – 163.
- [2] Ara K., Hama M., Akiba S., Koike K., Okisaka K., Hagura T., et al.: *Foot odor due to microbial metabolism and its control*, Canadian Journal of Microbiology, **52**, 2006, str. 357 – 364.
- [3] Jennings M. B., Alfieri D., Kosinski M., Weinberg J. M.: *An investigator blind study of the efficacy and safety of azithromycin versus cefadroxil in the treatment of skin and skin structure infections of the foot*, The Foot, **9**, 1999, str. 68 – 72.
- [4] Sánchez-Navarro M. M., Cuesta-Garrote N., Arán-Aís F., Orgilés-Barceló, C.: *Microencapsulation of Melaleuca alternifolia (Tea Tree) oil as biocide for footwear applications*, Journal of Dispersion Science and Technology, **32**, 2011, str. 1722 – 1727.
- [5] Johannesson A., Larsson G., Ramstrand N., Turkiewicz A., Wiréhn A., Atroshi I.: *Incidence of lower-limb amputation in the diabetic and nondiabetic general population*, Diabetes Care, **32**, 2009, str. 275 – 280.
- [6] Aksoy A., Kaplan S.: *Production and performance analysis of an antibacterial foot sweat pad*, Fibers and Polymers, **14**, 2013, str. 316 – 323.
- [7] Stockam G., Didato D. T., Hurlow E.: *Antibiotics in hide preservation and bacterial control*, Journal of the American Leather Chemists Association, **102**, 2007, str. 62 – 67.
- [8] Quanqing L., Haiqi G., Lihua P., Gongyan L., Zongcai Z.: *Synthesis of PEGylated chitosan copolymers as efficiently antimicrobial coatings for leather*, Journal of Applied Polymer Science, **133**, 2016, str. 1 – 7.
- [9] Sirvaitytė J., Siugzdaite J., Valeika V.: *Application of commercial essential oils of eucalyptus and lavender as natural preservative for leather tanning industry*, Revista de Chimie, **62**, 2011, str. 884 – 893.

- [10] Zhang M., Li X.H., Gong Y.D., Zhao N.M., Zhang X.F.: *Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG*, *Biomaterials*, **23**, 2002, str. 2641 – 2648.
- [11] Majeti N.V., Kumar R.: *A review of chitin and chitosan applications*, *Reactive and Functional Polymers*, **46**, 2000, str. 1 – 27.
- [12] Molinaro G., Leroux J.C., Damas J., Adam A.: *Biocompatibility of thermosensitive chitosan-based hydrogels an in vivo experimental approach to injectable biomaterials*, *Biomaterials*, **23**, 2002, str. 2717 – 2722.
- [13] Lu S., Gao W., Gu H.Y.: *Construction, application and biosafety of silver nanocrystalline chitosan wound dressing*, *Burns*, **34**, 2008, str. 623 – 628.
- [14] Yamaguchi I., Itoh S., Suzuki M., Sakane M., Osaka A., Tanaka J.: *The chitosan prepared from crab tendon I: the characterization and the mechanical properties*, *Biomaterials*, **24**, 2003, str. 2031 – 2036.
- [15] Muzzarelli R.A.: *Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone*, *Carbohydrate Polymers*, **76**, 2009, str. 167 – 182.
- [16] Kubiak T.: *Wykorzystanie pokryć z poli(glikolu etylenowego) i chitozanu do zapewnienia biokompatybilności nanocząstkom w aplikacjach biomedycznych*, *Polymers in Medicine*, **44 (2)**, 2014, str. 119 – 127.
- [17] Mao S., Shuai X., Unger F., Wittmar M., Xie X., Kissel T.: *Synthesis, characterization and cytotoxicity of poly(ethylene glycol)-graft-trimethyl chitosan block copolymers*, *Biomaterials*, **26 (32)**, 2005, str. 6343 – 6356.
- [18] Fernandes I. P., Amaral J. S., Pinto V., Ferreira M. J., Barreiro M. F.: *Development of chitosan-based antimicrobial leather coatings*, *Carbohydrate Polymers*, **98**, 2013, str. 1229 – 1235.
- [19] Barros M. C., Fernandes I.P., Amaral J. S., Barreiro M. F., Pinto V., Ferreira M. J.: *Chitosan as an antimicrobial agent for footwear leather components*, w: 2nd International Conference on Biodegradable Polymers and Sustainable Composites (BIOPOL-2009), Alicante, Hiszpania 2009.
- [20] Kurita K.: *Controlled functionalization of the polysaccharide chitin*, *Progress in Polymer Science*, **26**, 2001; str. 1921–1971.
- [21] Bannikova G. E., Sukhanova P. P., Vikhoreva G. A., Varlamov V. P., Gal'braikh L.S.: *Hydrolysis of chitosan sulfate with an enzyme complex from Streptomyces kurssanovii*, *Applied Biochemistry and Microbiology*, **38**, 2002, str. 413 – 415.
- [22] Polnok A., Verhoef J. C., Borchard G., Sarisuta N., Junginger H. E.: *In vitro evaluation of intestinal absorption of desmopressin using drug delivery systems based on super porous hydrogels*. *International Journal of Pharmaceutics*, **269**, 2004, str. 303 – 310.
- [23] Sieval A. B., Thanou M., Kotze A. F., Verhoef J.C., Brussee J., Junginger H. E.: *Preparation and NMR characterization of highly Substituted N-trimethyl chitosan chloride*, *Carbohydrate Polymers*, **36**, 1998; str. 157 – 165.
- [24] Le Dung P., Milas M., Rinando M., Desbrieres J.: *Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modification of chitosans*, *Carbohydrate Polymers*, **24**, 1994, str. 209 – 214.
- [25] Wongpanit P., Sanchavanakit N., Pavasant P., Supaphol P., Tokura S., Rujiravanit R.: *Preparation and characterization of microwave treated carboxymethyl chitin and carboxymethyl chitosan films for potential use in wound care application*, *Macromolecular Bioscience*, **5**, 2005, str. 1001 – 1012.
- [26] Muzzarelli R. A. A., Tanfani F., Emanuelli M.: *N-(carboxymethyl-dene) chitosans and N-(carboxymethyl) chitosans: novel chelating polyampholytes obtained from chitosan glyoxylate*, *Carbohydrate Research*, **107**, 1982, str. 199 – 214.

- [27] US Patent 6090928, Donges R., Reichel D., Kessler B.: Process for the preparation and work-up of N-hydroxyalkyl chitosan soluble in aqueous medium, 2000.
- [28] Richardson S., Gorton L.: *Characterization of the substituent distribution in starch and cellulose derivatives*, Analytica Chimica Acta, **497**, 2003, 27 – 65.
- [29] Yao F., Liu C., Chen W., Bai Y., Tang Z., Yao K.: *Synthesis and characterization of chitosan grafted oligo(L-lactic acid)*, Macromolecular Bioscience, **3**, 2003, str. 653 – 656.
- [30] Shim J. W., Nho Y. C.: *Preparation of poly(acrylic acid)-chitosan hydrogels by gamma irradiation and in vitro drug release*, Journal of Applied Polymer Science, **90**, 2003, str. 3660 – 3667.
- [31] Yazdani – Pedram M., Retuert J.: *Homogeneous grafting reaction of vinyl pyrrolidone onto chitosan*, Journal of Applied Polymer Science, **63**, 1997, str. 1321 – 1326.
- [32] Henning T.: *Polyethylene glycols (PEGs) and the pharmaceutical industry*, Pharma Chem, **1**, 2002, str. 57 – 59.
- [33] Alcantar N. A., Aydil E.S., Israelachvili J.N.: *Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces*, Journal of Biomedical Materials Research, **51**, 2000, str. 343 – 351.
- [34] Zhang Y., Kohler N., Zhang M.: *Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake*, Biomaterials, **23**, 2002, str. 1553 – 1561.
- [35] Hutanu D., Frishberg M. D., Guo L., Darie C. C.: *Recent Applications of Polyethylene Glycols (PEGs) and PEG Derivatives*, Modern Chemistry and Applications **2**, 2014, str. 132.
- [36] Veronese F. M., Pasut G.: *PEGylation, successful approach to drug delivery*, Drug Discovery Today, **10**, 2005, str. 1451 – 1458.
- [37] Harris J. M., Struck E. C., Case M. C., Paley M. S., Yalpani M., Van Alstine J. M., Brooks D. E.: *Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol) derivatives*, Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, **22**, 1984, str. 341 – 352.
- [38] Bhattarai N., Ramay H. R.: *PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release*, Journal of Controlled Release, **103**, 2005, str. 609 – 624.
- [39] Sugimoto M., Morimoto M., Sashiwa H., Saimoto H., Shigemasa Y.: *Preparation and characterization of water-soluble chitin and chitosan derivatives*, Carbohydrate Polymers, **36**, 1998, str. 49 – 59.
- [40] Kulkarni A.R., Lin Y.H., Liang H.F., Chang W. C., Hsiao W. W., Sung H. W.: *A novel method for the preparation of nanoaggregates of methoxypolyethylene glycol linked chitosan*, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, **6**, 2006, str. 2867 – 2873.
- [41] Muslim T., Morimoto M., Saimoto H., Okamoto Y., Minami S., Shigemasa Y.: *Synthesis and bioactivities of poly(ethylene glycol) - chitosan hybrids*, Carbohydrate Polymers, **46**, 2001, str. 323 – 330.
- [42] Ouchi T., Nishizawa H., Ohya Y.: *Aggregation phenomenon of PEG grafted chitosan in aqueous solution*, Polymer, **39**, 1998, str. 5171 – 5175.
- [43] Jang M – K., Nah J – W.: *Characterization. Modification of low molecular water-soluble chitosan for pharmaceutical application*, Bulletin of the Korean Chemical Society, **24**, 2003, 1303 – 1307.
- [44] Luo Q., Gao H., Peng L., Liu G., Zhang Z.: *Synthesis of PEGylated chitosan copolymers as efficiently antimicrobial coatings for leather*, Journal of Applied Polymer Science, **133 (22)**, 2016, str. 1-7.

- [45] Hu Y., Jiang H., Xu C., Wang Y., Zhu K.: *Preparation and characterization of poly(ethylene glycol)-g-chitosan with water-and organosolubility*, Carbohydrate Polymers, **61**, 2005, str. 472 – 479.
- [46] Kiuchi H., Kai W., Inoue Y.: *Preparation and characterization of poly(ethylene glycol) crosslinked chitosan films*, Journal of Applied Polymer Science, **107**, 2008, str. 3823 – 3830.
- [47] Tanuma H., Saito T., Nishikawa K., Dong T., Yazawa K., Inoue Y.: *Preparation and characterization of PEG-cross-linked chitosan hydrogel films with controllable swelling and enzymatic degradation behavior*, Carbohydrate Polymers, **80**, 2010, str. 260 – 265.
- [48] Amiji M. M.: *Synthesis of anionic poly(ethylene glycol) derivative for chitosan surface modification in blood-contacting applications*, Carbohydrate Polymers, **32**, 1997, str. 193 – 199.
- [49] Jeong Y-I., Kim D-G., Jang M-K., Nah J-W.: *Preparation and spectroscopic characterization of methoxy poly(ethylene glycol)-grafted water-soluble chitosan*, Carbohydrate Research, **343**, 2008, str. 282 – 289.
- [50] Sugimoto M., Morimoto M., Sashiwa H., Saimoto H., Shigemasa Y.: *Preparation and characterization of water-soluble chitin and chitosan derivatives*, Carbohydrate Polymers, **36**, 1998, str. 49 – 59.