TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ GÉNÉRAL I

TABLE DES MATIÈRES IV

LISTE DES TABLEAUX VII

LISTE DES FIGURES VIII

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES IX

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

1.1 Le chitosane, structure et domaines d'applications 1

1.2 Historique de la découverte du biopolymère 2

1.3 Structure chimique et caractéristiques structurales du chitosane 3

1.4 Préparation et nomenclature du chitosane 4

1.5 L'abondance et les sources de chitosane 5

1.6 La solubilité du chitosane et de ces dérivés 6

1.7 Les réactions de silylation sur le chitosane et la solubilité en milieu organique 8

1.9 Exploitation du caractère polaire du chitosane à des fins de dissolution et de transformations chimiques 12

1.10 Formation et utilisation des sels de chitosane à des fins de transformations chimiques 13

1.11 Dissolution directe du chitosane en milieu organique 14

1.12 Contexte du projet de recherche 15

CHAPITRE 2: REGIOSELECTIVE SILYLATION OF N-PHTHALOYLCHITOSAN WITH TBDMS AND TBDPS GROUPS **17**

ABSTRACT **18**

2.1 Introduction *18*

2.2 Experimental section *20*

2.2.1 General information 20

2.2.2 General silylation procedure 21

2.3 Results and discussion *23*

2.3.1 Silylations 23

2.4 Characterization *27*

2.4.1 Interpretation of IR spectra 27

2.4.2 Interpretation of CP/MAS ^{13}C NMR spectra 28

2.5 Purification *30*

2.6 Conclusion *30*

2.7 Acknowledgments *31*

CHAPITRE 3: FORMATION OF TRIFLUOROACETATE CHITOSAN SALT SOLUBLE IN ORGANIC MEDIA: A USEFUL REAGENT FOR CHITOSAN REGIOSELECTIVE TRANSFORMATIONS **32**

ABSTRACT **33**

3.1 Introduction *33*

3.2 Experimental section *35*

3.2.1 General information 35

3.2.2 Preparation of chitosan derivatives 36

3.3 Results and discussion *38*

3.3.1 Characteristics of trifluoroacetic acid 38

3.3.2 Choice of anion and pKa considerations 38

3.4 Silylation *41*

3.5 Characterization *42*

3.5.1 Interpretation of IR spectra 42

3.5.2 Interpretation of the ^{13}C NMR spectra 42

3.6 Purification *43*

3.7 Solubility of the reported derivatives *44*

3.8 Trifluoroacetate as a leaving group *46*

3.9 Conclusion *47*

3.10 Acknowledgments *47*

CHAPITRE 4 : DISCUSSION GÉNÉRALE 48

4.1 Silylation du N-phtaloylchitosane *48*

4.1.1 Caractérisation des dérivés silylés du N-phtaloylchitosane 52

4.2 Formation du sel de chitosane-TFA *55*

4.2.1 Le choix de l'acide et du milieu réactionnel 55

4.2.2 Silylation du sel de chitosane-TFA 58

4.3 Caractérisation du 6-O-TBDPS-chitosane *60*

4.4 L'ion trifluoacétate en tant que groupe sortant *62*

CHAPITRE 5 : CONCLUSION GÉNÉRALE 65

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 67

LISTE DES TABLEAUX

Table 1 Degree of substitution of TBDMS groups on *N*-phthaloylchitosan under various conditions. 24

Table 2 Degree of substitution of TBDPS groups on N-phthaloylchitosan under various conditions. 24

Table 3 Solubility of Chitosan Derivatives in Common Organic Solvents[a].....26

Table 4 Solubility of *6-O*-TBDPS-chitosan in various solvents[a] 45

Table 5 Solubility of trifluoroacetate chitosan salt in various solvents[a] 45

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Structures idéalisées de la chitine et du chitosane.....1

Figure 2 Synthesis of silylated *N*-phthaloylchitosan.....21

Figure 3 IR spectra of *N*-phthaloylchitosan and its silylated derivatives.....27

Figure 4 CP/MAS ^{13}C NMR spectra of chitosan derivatives a) *N*-phthaloylchitosan..28

Figure 5 Procedures of dissolution of chitosan by protonation and selective protection of the primary hydroxyl with TBDPS group.....41

Figure 6 IR spectra of chitosan and its derivatives a) chitosan b) trifluoroacetate chitosan salt c) *6-O*-TBDPS-chitosan 43

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

Abréviations, sigles ou acronymes	Correspondance
Aliph	aliphatique
Anal. calcd	pourcentage massique calculé
aro.	aromatique
C/N	rapport des atomes de carbone divisé par les atomes d'azote
$C_{4°}$	carbone quaternaire
CAS	*chemical abstract services*
cm^{-1}	nombre d'onde (1/cm)
CP/MAS	*cross-polarization / magic angle spinning*
CSA	acide (1R)-(-)-10-camphorsulfonique
DA	degré d'acétylation
DDA	degré de déacétylation
def	déformation
DMAc	*N,N*-diméthylacétamide
DMAP	4-(*N,N*-diméthylamino)pyridine
DMF	*N,N*-diméthylformamide
DMF-d_7	*N,N*-diméthylformamide deutérée
DMSO	diméthylsulfoxyde
DS	degré de substitution
equiv	équivalent stœchiométrique

F_A	fraction d'acétylation
FT-IR	spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier
GPC	*gel permeation chromatography*
HFP	hexafluoropropan-2-ol
Im	imidazole
IR	infrarouge
m	*meta*
M_w	masse molaire moyenne (d'un polymère)
NMR	*nuclear magnetic resonance*
o	*ortho*
p	*para*
phth	phtaloyle
ppm	partie par million
py	pyridine
RMN	résonance magnétique nucléaire
SA	acide salicylique
TBDMS	*tert*-butyldiméthylsilyle
TBDMSCl	*tert*-butylchlorodiméthylsilane
TBDPS	*tert*-butyldiphénylsilyle
TBDPSCl	*tert*-butylchlorodiphénylsilane
t-but	*tert*-butyle

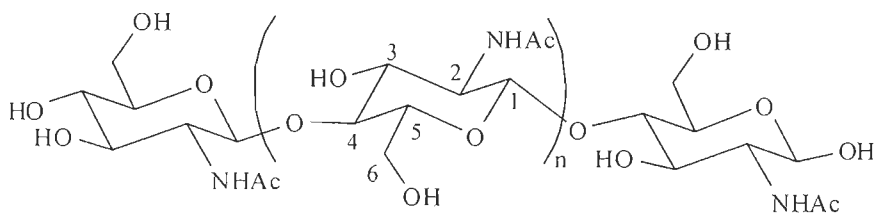
Rapport-Gratuit.com

TFA	acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofuranne
TMS	triméthylsilane
vs	*versus*
α	degré de neutralisation

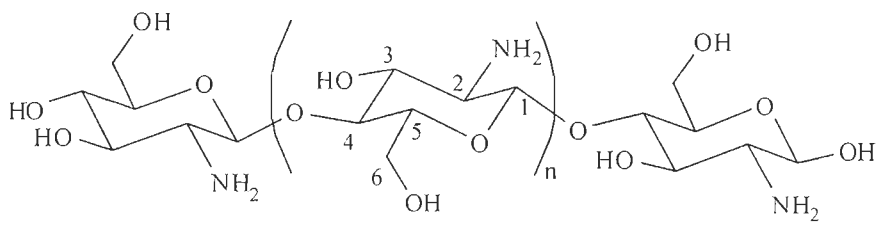
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 LE CHITOSANE, STRUCTURE ET DOMAINES D'APPLICATIONS

Les polysaccharides sont des polymères composés d'unités de sucre sous leur forme cyclique. Ils sont présents naturellement sous d'innombrables structures et compositions. Le chitosane (figure 1) est un de ces biopolymères. Il est généralement dérivé de la chitine (figure 1). Hormis la cellulose, la chitine est le biopolymère le plus abondant sur la Terre. Les estimations de l'abondance de chitine dans la biosphère sont de l'ordre de 10^{13} kg (Ravi Kumar, Muzzarelli *et al.* 2004). Une grande proportion de la biosynthèse de la chitine est d'origine marine, soit autour de $2{,}3 \times 10^{9}$ kg par an (Jeuniaux & Vossfoucart 1991).



Chitine (CAS 1398-61-4)
(poly[ß-(1→4)-2-acétamino-2-déoxy-D-glucopyranose])



Chitosane (CAS 9012-76-4)
(poly[ß-(1→4)-2-amino-2-déoxy-D-glucopyranose])

Figure 1 Structures idéalisées de la chitine et du chitosane

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

La chitine et le chitosane sont des exemples de polymères non-pétroliers et biodégradables (Srinivasa & Tharanathan 2007). Ces biopolymères sont au cœur des sujets d'étude de plusieurs groupes de recherche. Le nombre d'articles scientifiques traitant de ces polysaccharides a plus que triplé au cours de la dernière décennie, passant de 505 pour l'année 1995 à plus de 1 800 publications pour l'année 2005 (source : ISI Web of Knowledge). Les motivations qui orientent les choix de sujets de ces équipes de recherche sont multiples. L'intérêt croissant que suscitent ces substances est dû à plusieurs facteurs : leur disponibilité, leur architecture, leur coût et principalement, le potentiel qu'elles représentent pour une multitude d'applications dans des domaines variés. Pour n'en énumérer que quelques-uns, citons le traitement des eaux, les matériaux, l'agroalimentaire, les biotechnologies, la catalyse chimique, le remplissage de colonnes chromatographiques et le secteur pharmaceutique (Ravi Kumar, Muzzarelli *et al.* 2004; Guibal 2005; Macquarrie & Hardy 2005).

1.2 HISTORIQUE DE LA DÉCOUVERTE DU BIOPOLYMÈRE

La chitine fut isolée de champignons et identifiée pour la première fois en 1811 par Braconnot. Il nomma la substance fugine. Notons que cette découverte précède l'identification de la cellulose d'environ une trentaine d'années. En 1823, Odier isole la même substance, mais cette fois elle provient d'exosquelettes d'insectes; il la nomme chitine du grec *χιτων*, signifiant : tunique, armure. Ce n'est que 36 ans plus tard, en 1859,

que Rouget montre que la saponification de la chitine produit le chitosane. En 1878, Ledder hydrolyse la chitine pour produire de l'acide acétique et un sucre, la glucosamine (Peter 2002). Bien que la chitine et le chitosane aient été identifiés il y a plus d'un siècle, ce n'est que depuis une trentaine d'années que l'intérêt pour la chitine et le chitosane s'est substantiellement accru avec la parution des premiers ouvrages exclusivement consacrés à ces substances (Roberts 1992; Muzzarrelli 1997).

1.3 STRUCTURE CHIMIQUE ET CARACTÉRISTIQUES STRUCTURALES DU CHITOSANE

Le chitosane complètement déacétylé est un polysaccharide régulier composé d'unités de glucosamine unies par des liens glucosidiques $\beta(1\rightarrow4)$. La structure du chitosane ne diffère de la structure de la cellulose que par la présence d'un groupe amine en position deux (C2) au lieu d'une fonction alcool (-OH) pour la cellulose. Cette particularité structurale confère au chitosane une plus grande variabilité au niveau des groupes fonctionnels. La présence de trois groupes fonctionnels nucléophiles distincts par unité entraîne une souplesse potentielle de transformations chimiques régiosélectives. En ordre croissant de réactivité nucléophilique, chaque unité de chitosane présente les groupes fonctionnels suivants : une fonction alcool secondaire en position 3 (C3), une fonction alcool primaire en position 6 (C6) et une fonction amine primaire en position 2 (C2) (figure 1).

1.4 PRÉPARATION ET NOMENCLATURE DU CHITOSANE

Le chitosane est principalement produit par la déacétylation de la chitine. Toutefois, la nature polymérique de la chitine et la grande stabilité chimique des fonctions amides font que cette réaction de déacétylation (ou saponification) est souvent incomplète. Dans la plupart des cas, la chitine et le chitosane sont des hétéropolymères linéaires et irréguliers. Ces derniers sont constitués, en différentes proportions, d'unités de glucosamine et de *N*-acétylglucosamine (Ravi Kumar 2000).

Les proportions d'acétylation du polymère sont indiquées en fonction du pourcentage d'acétylation ($\%_A$) ou en pourcentage de déacétylation ($\%_{DA}$). D'autres appellations se retrouvent aussi dans la littérature : le degré d'acétylation (DA) et le degré de déacétylation (DDA), qui sont eux aussi des pourcentages. Certains auteurs préfèrent calquer le concept de la fraction molaire et « parler » de fraction d'acétylation (F_A). Cette dernière appellation aurait l'avantage de se référer à une définition propre à la chimie et d'ainsi aplanir toute confusion (Peter 2002).

En ce qui a trait à la nomenclature, il n'y a pas de démarcation franche entre la chitine (F_A de 1) et le chitosane (F_A de 0) (Ravi Kumar 2000). La délimitation entre les deux substances est basée sur la fraction d'acétylation moyen de leurs structures. Il est

cohérent de fixer la distinction entre les deux substances à une F_A de 0,50. D'ailleurs, avec une F_A de 0,50, le chitosane, contrairement à la chitine, présente une solubilité dans l'eau acidulée (≅ 5% HCl ou acide acétique (AcOH)) (Roberts 1992; Peter 2002).

1.5 L'ABONDANCE ET LES SOURCES DE CHITOSANE

La chitine et le chitosane sont présents au sein d'une pléiade d'organismes. Les membranes cellulaires de certaines bactéries contiennent de la chitine. Chez d'autres bactéries, les membranes contiennent exclusivement du chitosane. La chitine se retrouve chez de nombreuses espèces de champignons dans des proportions allant jusqu'à 45 % ($^{m}/_{m}$). Les carapaces d'insectes, de scorpions et d'araignées contiennent de 20 à 60 % ($^{m}/_{m}$) de chitine.

Les exosquelettes de crustacés sont largement composés de chitine. La proportion massique de chitine post-décalcification et déprotéinisation est de l'ordre de 80 % (Peter 2002). Chez les décapodes, comme la crevette, la chitine représente 8,8 % de la masse totale humide de l'organisme (Synowiecki & Al-Khateeb 2003).

Les principales sources industrielles de chitine et de chitosane sont les exosquelettes de crustacés provenant de l'industrie de la transformation du crabe et de la crevette. Selon les données du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec et en considérant le pourcentage de chitine présent chez *Pandalus borealis*, la quantité de chitine qui pourrait potentiellement être extraite par les usines québécoises de transformation de la crevette serait de 650 tonnes par an (Boulet, Coulombe *et al.* 2006).

Outre les sources citées précédemment, la chitine a aussi été isolée d'un grand nombre d'organismes marins dont les algues, les mollusques et les céphalopodes (Peter 2002).

1.6 LA SOLUBILITÉ DU CHITOSANE ET DE CES DÉRIVÉS

L'intérêt porté à la solubilité du chitosane est justifié par la nécessité de dissoudre la substance afin de faciliter d'éventuelles transformations chimiques (Sashiwa, Shigemasa *et al.* 2000). Les réactions chimiques réalisées en phase homogène conduisent généralement à de meilleurs rendements réactionnels, et ce, en moins de temps que lorsque ces mêmes réactions sont effectuées dans des conditions hétérogènes. Le chitosane est une substance présentant une très faible solubilité dans des milieux organiques et plus particulièrement

lorsque cette dissolution est tentée dans des solvants aprotiques ou non polaires. Cette quasi insolubilité s'explique par trois principales raisons (Cho, Jang *et al.* 2000):

1) La grande masse moléculaire de chacune des chaînes de polymères.
2) La formation de liaisons hydrogènes entre les différents groupes fonctionnels portés par chacune des unités.
3) Les repliements des chaînes.

Les molécules et macromolécules organiques, par opposition aux composés ioniques, sont formées de liaisons covalentes. Ceci implique généralement des points de fusion relativement bas et des solubilités élevées dans les solvants organiques. Les composés organiques présentent généralement une faible solubilité dans l'eau, un milieu très polaire. Il y a des exceptions à cela, les molécules organiques riches en oxygène et en azote peuvent présenter une certaine solubilité dans l'eau. Il est généralement admis que les solvants polaires ont une meilleure capacité pour dissoudre les substances polaires et que la réciproque est vraie (Solomons & Fryhle 2000).

Outre l'hydrolyse enzymatique ou chimique du polymère en oligomères, deux approches ont été développées par différents groupes de recherche pour augmenter la solubilité du chitosane à des fins de transformations chimiques. Ces deux approches se distinguent l'une de l'autre par l'objectif visé.

La première approche vise à dissoudre le chitosane en milieu organique et la seconde cherche à exploiter le caractère polaire de la substance pour effectuer une dissolution en phase aqueuse. L'approche qui vise la dissolution en milieu organique modifie chimiquement la nature des fonctions alcool et amine (groupes polaires) portées par le chitosane. L'effet recherché est de diminuer l'aptitude de ces groupes fonctionnels à participer à la formation de ponts hydrogène. L'idée est qu'en diminuant, par substitution chimique, la polarité des groupes fonctionnels du biopolymère, il devienne plus solubles dans des milieux organiques ou relativement peu polaires.

1.7 LES RÉACTIONS DE SILYLATION SUR LE CHITOSANE ET LA SOLUBILITÉ EN MILIEU ORGANIQUE

Une approche inspirée de travaux effectués sur la cellulose et le dextran (Mormann & Demeter 1999) consiste en la triméthylsilylation du chitosane. Kurita *et al.* ont montré qu'en réalisant une triméthylsilylation poussée du chitosane pour atteindre un degré de substitution[2] (DS) de 3,20 (Kurita, Hirakawa *et al.* 2004), le dérivé triméthylsilylé formé présente une solubilité partielle dans certains milieux organiques. Un gonflement et/ou une solubilité partielle du dérivé formé est observé dans quelques solvants organiques : l'acétone, le tétrahydrofuranne (THF), le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le

[2] Le DS est le nombre moyen de substituants (groupement) fixés par unité (glucosamine dans le cadre de ce travail) de polymère. Dans le cas du chitosane ($F_A = 0$), la valeur du DS est comprise entre 0 et 4, soit une possibilité d'un groupement pour chacune des deux fonctions alcools et de deux groupements pour la fonction amine primaire.

N,*N*-diméthylacétamide (DMAc). Ce groupe de recherche a rapporté une « quasi-solubilité » (trad. de : *almost-soluble*) du chitosane triméthylsilylé (DS de 2,82) dans la pyridine.

Les groupes triméthylsilyles sont facilement hydrolysables en milieu acide. Leur intérêt en tant que groupes protecteurs est donc mitigé. Les fonctions alcools régénérées suite à l'hydrolyse peuvent être converties en groupe acétyle (Kurita, Sugita *et al.* 2005). Une limite de ces transformations est qu'elles ne présentent aucune sélectivité.

La protection sélective de la fonction alcool primaire de la cellulose par un groupe silylé plus encombré que le TMS a été rapportée en 2001. Le réactif utilisé était le chlorodiméthyl-(2,3-diméthylbut-2-yl)silyle (Petzold, Einfeldt *et al.* 2001).

Le *tert*-butylchlorodiméthylsilane (TBDMSCl) et le *tert*-butylchlorodiphénylsilane (TBDPSCl) sont des réactifs qui permettent la mise en place de groupes protecteurs sélectifs aux fonctions alcools primaires (Greene & Wuts 1999). La sélectivité des groupes *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS) et *tert*-butyldiphénylsilyle est conséquente de leur grand encombrement stérique autour de l'atome de silicium. Ils sont connus et largement utilisés pour leur facilité d'introduction dans des conditions réactionnelles douces, généralement en présence d'une base aromatique, l'imidazole (Im) (Greene & Wuts 1999, Carey & Sundberg 1997 B).

Rapport-Gratuit.com

Le TBDMS et le TBDPS présentent de bonnes stabilités face à une variété de conditions réactionnelles ou de réactifs chimiques, tels les oxydations, les réductions, les attaques nucléophiles, les électrophiles et en milieu basique. Le TBDMS présente une légère sensibilité à l'hydrolyse en milieu acide. À titre d'illustration de leur stabilité relative face à l'hydrolyse en milieu acide (HCl 1% / MeOH, 25°C); le temps de demi-vie pour le groupe TBDMS est d'environ une minute. Dans ces mêmes conditions, il est de 225 minutes pour le TBDPS (Greene & Wuts 1999).

Ces groupes protecteurs présentent l'avantage certain d'être clivables sélectivement par une multitude de méthodes dans des conditions douces, telle l'utilisation de l'ion fluorure présent dans le fluorure de tétrabutylammonium (Nelson & Crouch 1996).

De telles conditions réactionnelles font en sorte que le polysaccharide étudié serait moins susceptible de se dénaturer. Le TBDMS et le TBDPS sont des groupes protecteurs faisant partie de la classe de composés des éthers silylés, dont l'utilisation dans la synthèse de dérivés des saccharides est très répandu (Collins & Ferrier 1995).

1.8 PROTECTION SÉLECTIVE DE LA FONCTION AMINE DU CHITOSANE PAR LE GROUPE PHTALOYLE

La protection de la fonction amine par *N*-phtaloylation est une procédure clé pour la préparation de dérivés de chitosane. L'utilisation de ce robuste groupe protecteur des fonctions amines permet la modification sélective des fonctions hydroxyles. L'introduction de ce groupe entraîne une augmentation de la solubilité dans certains solvants organiques tels le DMF et la pyridine (Kurita, Ikeda *et al.* 2002). Une récente publication de Liu *et al.* (Liu, Li *et al.* 2004) décrit une procédure pour la *N*-phtaloylation du chitosane par irradiation aux fréquences micro-ondes en quelques minutes (6 min). Néanmoins, leurs travaux mentionnent que l'irradiation aux micro-ondes entraîne une diminution de la masse molaire moyenne (M_W) du polymère. Cette diminution de la M_W serait plus importante que celle occasionnée par un chauffage conventionnel.

Le clivage du groupe phtaloyle peut être réalisé par un traitement à l'hydrazine. Comme le *N*-phtaloyle est un groupement protecteur robuste, sa suppression entraîne potentiellement des réactions secondaires indésirables. Le clivage de fonctions esters est un exemple de réactions secondaires indésirables (Gagnon, communication personnelle). La protection régiosélective des fonctions alcool primaires du *N*-phtaloylchitosane a été rapportée avec le chlorotriphénylméthane dans la pyridine à chaud avec un DS de 0,8. La protection d'une fonction alcool primaire avec le groupe triphénylméthyle peut facilement être renversée par une hydrolyse en milieu acide (Nishimura, Kohgo *et al.* 1990).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

1.9 EXPLOITATION DU CARACTÈRE POLAIRE DU CHITOSANE À DES FINS DE DISSOLUTION ET DE TRANSFORMATIONS CHIMIQUES

La deuxième approche cherche à exploiter, voire augmenter le caractère polaire du chitosane de manière à pouvoir dissoudre ce dernier en milieu polaire ou aqueux. La chitine se dissout dans certains systèmes organiques très polaires tels LiCl / DMAc et dans le méthanol saturé en $CaCl_2 \bullet 2H_2O$ (Kurita 2001). Le chitosane est soluble dans les milieux aqueux légèrement acidifiés ($\cong$ 5% HCl ou acide acétique (AcOH)) (Roberts 1992; Peter 2002).

Compte tenu de la présence d'une amine primaire sur chacune de ses unités pyranosyles, le chitosane peut, par une réaction acido-basique accepter un proton pour devenir l'acide conjugué du chitosane. Les sels de chitosane protoné représentent un des rares exemples de biopolymère polycationique. En revanche, les exemples de polymères polyanioniques tels les polysaccharides portant des groupes sulfates et/ou des unités glucuroniques sont plus nombreux dans la nature (Collins & Ferrier 1995; Sashiwa, Shigemasa *et al.* 2000).

1.10 FORMATION ET UTILISATION DES SELS DE CHITOSANE À DES FINS DE TRANSFORMATIONS CHIMIQUES

Les sels de chitosane sont des composés qui font l'objet d'une recherche intensive. Ces sels sont faciles à former et peuvent servir de matériel pour la fabrication de films ou de fibres (Sashiwa, Shigemasa *et al.* 2000 A). La protonation de l'amine du chitosane est une méthode rapide et efficace pour annuler le caractère nucléophile de la fonction amine du chitosane. Par surcroit, en tant que méthode de protection, la protonation de la fonction amine du chitosane présente l'avantage d'être facilement réversible par le traitement avec une base. Comme il s'agit de réactions acido-basiques, soulignons la rapidité et la complétude de ces réactions en comparaison des méthodes de protection classiques faisant appel à l'introduction de groupements fonctionnels organiques telle la *N*-phtaloylation.

De manière générale, les sels de chitosane protonés sont insolubles dans les solvants organiques, cela indépendamment du fait que ces sels soient formés à l'aide d'acides organiques ou inorganiques. Récemment Sashiwa *et al.* (2000 A) ont rapporté la formation dans l'eau de sels de chitosane produits à l'aide des acides *p*-toluènesulfonique, (1R)-(-)-10-camphorsulfonique (CSA), méthanesulfonique et salicylique (SA). Après lyophilisation, ces sels se sont avérés solubles dans le DMSO (Sashiwa, Shigemasa *et al.* 2000 A). Les sels de chitosane rapportés par ce groupe ne se dissolvent pas dans d'autres solvants tels le DMF, le méthanol, le chloroforme et la pyridine.

Ce groupe de recherche a utilisé le dérivé sel de chitosane-CSA pour effectuer différentes polyacylations sur les atomes d'azote et d'oxygène à l'aide de différents anhydrides cycliques. Ils ont obtenu des DS allant jusqu'à 2,43 (Sashiwa, Shigemasa *et al.* 2000 B). En 2002, le groupe de Sashiwa a rapporté l'utilisation du sel de chitosane-acide méthanesulfonique, dans lequel l'acide méthanesulfonique agit aussi en tant que solvant pour effectuer une polyacétylation sur les atomes d'azote et d'oxygène du chitosane et obtenir un dérivé hydrosoluble (Sashiwa, Kawasaki *et al.* 2002 A).

Les sels rapportés par Sashiwa (2000 A) ont été préparés en phase aqueuse. Malgré la lyophilisation de ces sels, ils contiennent toujours des traces d'eau. Cette observation est attribuable au caractère hygroscopique du chitosane et à un effet de matrice en raison de la nature polymérique de ce dernier. Ces traces d'eau et le fait que bon nombre de réactifs utilisés en chimie organique sont hydrosensibles, font en sorte que ces sels sont d'un intérêt amoindri dans un contexte de transformations chimiques.

1.11 DISSOLUTION DIRECTE DU CHITOSANE EN MILIEU ORGANIQUE

Le groupe de Sashiwa a utilisé l'hexafluoro-2-propanol (HFP) pour dissoudre le chitosane (F_A=0,20 et M_w=32 000 g/mol). Le chitosane serait parfaitement soluble dans le HFP en 24h (Sashiwa, Kawasaki *et al.* 2002 B). Cependant, pour obtenir une bonne solubilité, le chitosane doit avoir une masse molaire moyenne (M_w) inférieure à

32 000 g/mol. Un des inconvénients de cette procédure est le coût du HFP, soit autour de 500 $ pour 50 mL (source : Aldrich en ligne). De plus, comme le HFP est un solvant protique portant une fonction alcool primaire, ce système réactionnel ne permet pas d'effectuer toutes les transformations souhaitées sur les groupes hydroxyles du chitosane.

1.12 CONTEXTE DU PROJET DE RECHERCHE

L'objectif à moyen terme du groupe de recherche du Professeur Gagnon est d'utiliser le chitosane à la fois en tant qu'auxiliaire chiral et support polymérique, dans le but de réaliser des catalyses asymétriques suite à la coordination de métaux. L'utilisation du chitosane à des fins catalytiques donnerait une valeur ajoutée à cette biomasse abondante dans la région Bas-Saint-Laurent – Gaspésie. Au cours de ce travail, les deux approches discutées précédemment ont été explorées afin de fonctionnaliser régiosélectivement le chitosane et d'en augmenter la solubilité.

Le chapitre 2 présente l'étude de la protection régiosélective de la fonction alcool primaire du chitosane par les groupes TBDMS et TBDPS. Ces protections ont été optimisées en considérant différents paramètres, tels le choix de solvant, les proportions stœchiométriques, le choix de la base, la température de réaction et le choix de l'agent

silylant. Cette étude a fait l'objet d'une publication[3] dans *Biomacromolecules* (2007; **8** (6); 1812-1815; DOI: 10.1021/bm0610976), un périodique de l'*American Chemical Society.*

Le troisième chapitre présente l'étude de la dissolution du chitosane directement en milieu organique polaire (DMF) suite à la protonation de ce dernier avec l'acide trifluoroacétique (TFA). Le sel de chitosane formé a ensuite été utilisé pour effectuer une protection sélective de l'alcool primaire à l'aide du groupe TBDPS. À notre connaissance, le sel de chitosane-TFA serait le premier sel de chitosane soluble dans certains solvants organiques préparé directement dans un solvant organique. Cette procédure de dissolution et de protection monotope (*one-pot*) est à la base d'une demande de brevet faite par l'Université du Québec à Rimouski. « *CHITOSAN SALTS, METHODS OF MANUFACTURE AND USES THEROF* » décrit dans la demande de brevet provisoire déposée le 18 mai 2007 au United States Patent and Trademark Office (USPTO); numéro de référence : 60/938,743.

[3] Note : Suite à des suggestions de corrections mineures venant de MM. Benoit Daoust (UQTR) et Émilien Pelletier (ISMER), le chapitre 2 n'est pas une transcription intégrale de l'article publié dans le périodique *Biomacromolecules*, mais une version améliorée. Le contenu et les conclusions exprimés dans ce chapitre demeurent les mêmes. Je tiens à les remercier pour leurs commentaires et suggestions qui ont permis de rehausser la qualité du travail présenté.

CHAPITRE 2: REGIOSELECTIVE SILYLATION OF N-PHTHALOYLCHITOSAN WITH TBDMS AND TBDPS GROUPS

Alain Binette[1,2], Jonathan Gagnon[1]

[1]*Université du Québec à Rimouski*
Département de biologie, chimie et géographie
300, allée des Ursulines, C. P. 3300, succ. A
Rimouski (Québec) Canada
G5L 3A1

[2]*Institut des sciences de la mer de Rimouski (ISMER)*
310, allée des Ursulines, C.P. 3300
Rimouski (Québec) Canada
G5L 3A1

ABSTRACT

Chemoselective protection of primary alcohols on *N*-phthaloylchitosan was achieved with *tert*-butyldimethylsilyl (TBDMS) and *tert*-butyldiphenylsilyl (TBDPS) groups in imidazole/DMF and DMAP/pyridine. The influence of experimental conditions such as solvent, base, stoichiometry, temperature, and time of reaction was studied regarding the degree of substitution (DS) of silyl groups. TBDMS groups allow higher DS than TBDPS groups. Reactions made at temperature higher than ambient led to lower DS and incomplete substitution for all the studied conditions. Regioselective silylation of *N*-phthaloylchitosan was realized with DS up to 0.92 at room temperature. Silylated derivatives were characterized by elemental analysis, IR, and CP/MAS ^{13}C NMR spectroscopies.

Keywords: *N*-Phthaloylchitosan, Silylations, TBDMS, TBDPS, Regioselective transformations, Protective groups, IR, NMR spectroscopy

2.1 INTRODUCTION

Chitosan is a biopolymer derived from the *N*-deacetylation of chitin, which is the second most abundant polysaccharide on earth after cellulose. Sources of chitin are various where crustacean exoskeletons are the main industrial source; however, chitin also occurs in fungi and insects (Peter 2002). Chitosan is biodegradable, biocompatible, and nontoxic. Therefore, it is widely studied for numerous actual and potential application fields such as water treatment, materials, food, biotechnology, and pharmaceutical uses (Ravi Kumar,

Muzzarelli *et al.* 2004). Efficient transformations and applications of chitosan are limited by its lack of organosolubility that can be explained by its high molecular weight and inter-unit hydrogen bonding. Complete trimethylsilylation of chitosan (DS of 2.9) and cellulose (DS of 3.00) has been reported to increase solubility in organic media. Trimethylsilylated chitosan, however, is easily hydrolyzed in acidic medium and can be acetylated (Kurita, Hirakawa *et al.* 2004; Kurita, Sugita *et al.* 2005). Moreover, regioselective silylation of starch at the 6-*O* positions has been achieved using thexyldimethylchlorosilane (Petzold, Einfeldt *et al.* 2001). *tert*-Butyldimethylsilyl (TBDMS) and *tert*-butyldiphenylsilyl (TBDPS) protective groups are known to be selectively introduced under mild conditions on primary alcohol functions due to their steric hindrance. They have been commonly used in the derivatization of monosaccharides for their stability toward several reaction conditions. Indeed, TBDMS and TBDPS groups possess excellent stability toward bases, although they can be slightly sensitive to acids (Greene & Wuts 1999). Silyl groups can also be cleaved with numerous reagents in basic, acidic, oxidizing, and reducing conditions including fluoride ions (Farras, Serra *et al.* 1998; Greene & Wuts 1999; Gopinath and Patel 2000; Sharma 2003; Arumugam, Karthikeyan *et al.* 2004; Crouch 2004; Karimi, Zamani *et al.* 2004).

On the other hand, the protection of amine groups by *N*-phthaloylation of chitosan induces an increase of solubility in organic solvents and facilitates the chitosan derivatization (Nishimura, Kohgo *et al.* 1990; Kurita, Uno *et al.* 2000; Kurita, Ikeda *et al.* 2002). Regioselective protection of primary hydroxyl groups onto *N*-phthaloylchitosan has

Rapport-Gratuit.com

been reported with trityl groups, which are cleaved in acidic conditions (Holappa, Nevalainen *et al.* 2004). The protection of O-6 positions with trityl chloride in hot pyridine has been reported with a DS in the order of 0.8 (Nishimura, Kohgo *et al.* 1991; Holappa, Nevalainen *et al.* 2005). Herein, we report the regioselective protection of chitosan on primary hydroxyl groups in mild conditions with DS of 0.92 and 0.86, respectively, for TBDMS and TBDPS groups with the perspective to realize further chemoselective modifications.

2.2 EXPERIMENTAL SECTION

2.2.1 General information

Completely deacetylated high molecular weight shrimp shell chitosan (547 kDa by GPC) was purchased from Marinard Biotech Inc. (Gaspé, Canada) and was mechanically ground to 33 mesh and used without prior chemical treatment. *N,N*-Dimethylformamide (DMF) and pyridine (py) were distilled over CaH_2 under a nitrogen atmosphere. Reagents including TBDPSCl and TBDMSCl were purchased from Sigma-Aldrich and used without purification. *N*-Phthaloylchitosan with a DS of 1.0 and an absence of ester groups was synthesized according to the literature (Kurita 2000). All reactions were realized under nitrogen atmosphere. FT-IR spectra and elemental analysis were recorded, respectively, with a Perkin Elmer FT-IR 1600 in KBr pellets and with a Costech 4010 elemental

analyzer. The degrees of substitution (DS) have been calculated from the C/N ratio provided by the elemental analysis. Solid state ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker DSX300 NMR spectrometer at 75 MHz with a 4 mm CP/MAS probe, a rotating speed of 12 kHz, a contact time of 1.5 ms, and a repetition time of 5 s, and 1400 scans were accumulated.

2.2.2 General silylation procedure

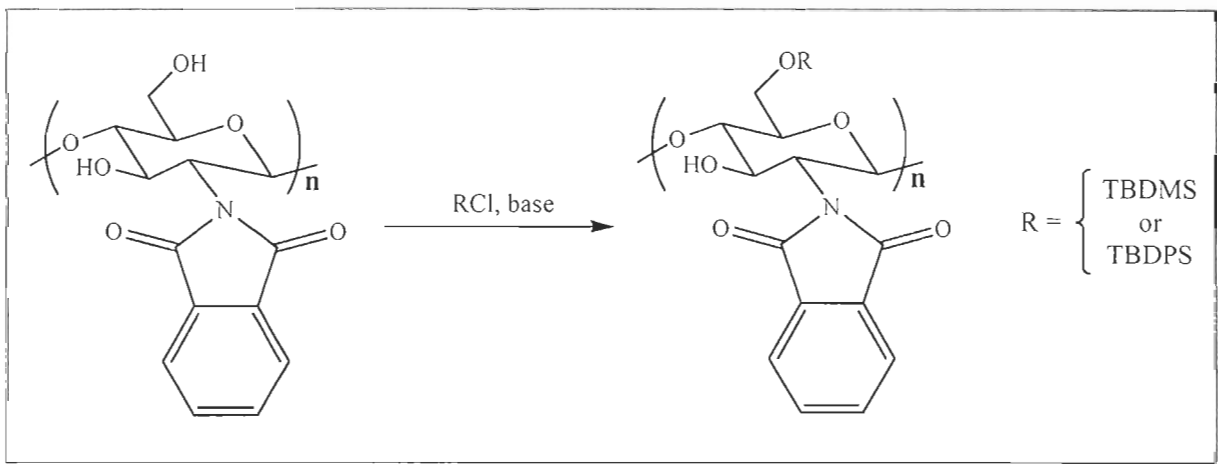


Figure 2 Synthesis of silylated *N*-phthaloylchitosan

Preparation of poly[β-(1→4)-*6-O-tert*-butyldimethylsilyl-2-deoxy-2-phthalimido-D-glucopyranose] (*6-O*-TBDMS-*N*-phthaloylchitosan). A suspension of *N*-phthaloylchitosan with a DS of 1.0 (0.304 g, 1.05 mmol) and an excess of imidazole (0.581 g, 8.53 mmol) in anhydrous DMF (40 mL) was treated with *tert*-butyldimethylsilyl chloride (1.14 g, 7.61 mmol). The suspension was stirred at room temperature for 48 h. The chitosan derivative was precipitated with 50 mL of a water/ethanol (1:1 ($^{v}/_{v}$)) solution. The solid was filtered and washed with 20 mL of water/ethanol solution followed by ethyl ether

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

(3 × 5 mL). An off-white solid corresponding to a yield of 85 % (0.361 g) based on the DS value from the elemental analysis for the introduction of TBDMS groups was obtained. IR 3478 (OH), 2942 (CH), 1779 and 1720 (C=O phth), 1254 (Si-CH_3), 1122 (Si-O-C aliph.), 1150-980 (C-O pyranosyl), 837 (Si-O-CH_3 def), 719 (aromatic) cm^{-1}. CP/MAS ^{13}C NMR -5.75 (CH_3Si), 18.39 ($C_{4°}$), 25.81 (CH_3 *tert*-butyl), 56.15 (C2), 63.64 (C6), 71.06 (C3), 75.58 (C5), 83.52 (C4), 99.21 (C1), 123.28, 132.52 (aromatic carbons), 167.76 (Phth C=O) ppm. Anal. calcd for $C_{20}H_{27}NO_6Si$ with a DS of 0.92: C, 59.15; H, 6.58; N, 3.53. Found: C, 58.50; H, 6.64; N, 3.61.

Poly[β-(1→4)-*6-O-tert*-butyldiphenylsilyl-2-deoxy-2-phthalimido-D-glucopyranose] (*6-O*-TBDPS-*N*-phthaloylchitosan). Yield of 88 % (0.482 g) on the basis of DS value for the introduction of TBDPS groups. IR 3475 (OH), 2930 (CH), 1779 and 1719 (C=O phth), 1113 (Si-O-C aliph), 1150-900 (C-O pyranosyl), 823 (Si-O-CH_3 def), 719 (aromatic) cm^{-1}. CP/MAS ^{13}C NMR δ 19.10 ($C_{4°}$), 26.91 (CH_3), 56.4 (C2), 63 (C6), 70 (C3), 75.6 (C5), 81 (C4), 99 (C1), 122.77, 128.19, 131.74, 134.90 (aromatic carbons), 167.37 (Phth C=O) ppm. Anal. calcd for $C_{30}H_{31}NO_6Si$ with a DS of 0.86: C, 67.07; H, 5.95; N, 2.82. Found: C, 67.65; H, 5.89; N, 2.88.

2.3 RESULTS AND DISCUSSION

In view of selectively protecting primary hydroxyl groups on *N*-phthaloylchitosan, the introduction of steric hindrance TBDMS and TBDPS silyl groups on primary alcohols was achieved. To reach a high DS to maintain a homopolymer (DS of 1.0), the protective group must be used in excess and in mild conditions. In the cases of cellulose and starch, silylations have been realized in liquid ammonia; in contrast, trimethylsilylation of chitin and chitosan with hexamethyldisilazane and trimethylchlorosilane occurs in pyridine (Kurita, Sugita *et al.* 2005). Silylations with TBDMS and TBDPS are recognized to be selective to primary alcohols even in the presence of secondary alcohols and have successfully been applied in carbohydrate synthesis (Greene & Wuts 1999).

2.3.1 Silylations

N-Phthaloylchitosan reacts with silyl chloride derivatives in almost homogeneous conditions to give silylated chitosan derivatives (Figure 2). Degrees of silylation were followed according to reaction time in two different experimental conditions; imidazole/DMF (Im/DMF) and a second one with 4-(*N*,*N*-dimethylamino)pyridine/pyridine (DMAP/py) where pyridine acts as a solvent and a base. Precipitation and purification conditions were investigated to eliminate unreacted silyl agents and side reaction products from the reactional mixture and to obtain a high recovery of the chitosan derivatives. Purification attempts were made with acetone, ethyl ether, methanol, and ethanol. Workup

with a water-ethanol (1:1 ($^{v}/_{v}$)) solution followed by an ethyl ether washing gave a clean product where the precipitation of the polymer was spontaneous and complete. Silylations gave yields above 85%.

Table 1 Degree of substitution of TBDMS groups on *N*-phthaloylchitosan under various conditions.

entry	base/solvent	number of equivalent[a]	temperature (°C)	time (h)	DS[b]
1	Im/DMF	4.8	25	48	0.92
2	Im/DMF	7.3	25	24	0.86
3	Im/DMF	7.3	25	48	0.88
4	DMAP/py	5.2	25	96	0.70
5	DMAP/py	2.2	115	71	0.25
6	DMAP/py	3.5	115	24	0.55
7	DMAP/py	3.5	115	48	0.66
8	DMAP/py	3.5	115	67	0.64
9	DMAP/py	5.1	115	96	0.70
10	Im/py, DMF (1:1)	6.0	25	24	0.76

a) Number of silylating reagent equivalent. b) Degree of substitution calculated from the C/N ratio from elemental analysis.

Table 2 Degree of substitution of TBDPS groups on N-phthaloylchitosan under various conditions.

entry	base/solvent	number of equivalent[a]	temperature (°C)	time (h)	DS[b]
11	Im/DMF	2.4	152	4	0.25
12	Im/DMF	2.4	152	27	0.32
13	Im/DMF	4.8	25	48	0.83
14	Im/DMF	7.3	25	24	0.85
15	Im/DMF	7.3	25	48	0.85
16	DMAP/py	5.1	25	24	0.09
17	DMAP/py	5.1	25	48	0.10
18	DMAP/py	2.5	115	24	0.09
19	DMAP/py	2.5	115	48	0.13
20	DMAP/py	5.2	115	48	0.46
21	Im/py, DMF (1:1)	6.0	25	24	0.45
22	Im/DMF	13.3	25	48	0.86

a) Number of silylating reagent equivalent. b) Degree of substitution calculated from the C/N ratio from elemental analysis.

Protection assays are presented in Tables 1 and 2, respectively, for TBDMS and TBDPS protective groups. Some DS data shown in the tables were obtained by following the same reaction mixture in time. When silylation reactions are realized with 1.2 to 1.5 equiv of silylating reagent, the obtained DS are lower than 0.05. This observation can be explained by the presence, in *N*-phthaloylchitosan, of an average of 0.7 water molecules per repetitive unit as determined by elemental analysis and in accordance with cited literature (Kurita, Ikeda *et al.* 2002). Chitosan is known to be a hygroscopic biopolymer. It was noted, for various experimental conditions, that increasing the number of equivalents over 2.2 of the silylating agent allows the beginning of the silylation of *N*-phthaloylchitosan (entries 5, 11, 12, 18, and 19). Addition of more than 5 equiv of silylating reagents (entries 2, 3 and 15, 22), however, did not permit DS higher than 0.92 and 0.86 to be obtained, respectively, for TBDMS and TBDPS derivatives.

Silylations with TBDMSCl seem to proceed faster than those with TBDPSCl in comparable experimental conditions (entries 1, 13; 2, 14; 3, 15; and 10, 21). Entries (6-8, 18, and 19) that were realized at 115 °C in pyridine with a catalytic amount of DMAP led to a small increase of DS between 24 and 48 h. When silylations are realized at reflux in DMF or in pyridine, the products are brownish, and the calculated DS are lower than 1.0; these silylations also gave equal or higher DS for comparable conditions at room temperature (entries 4, 9 and 17, 20). Therefore, the use of higher temperatures is not an improvement for this type of reaction due to partial decomposition. Silylations with TBDPSCl proceed faster in Im/DMF than in DMAP/pyridine (entries 13, 17 and 12, 18),

which is consistent with the literature (Greene & Wuts 1999). To observe the influence of solvents, silylations were made in a py/DMF (1:1 ($^{v}/_{v}$)) mixture (entries 10 and 21) that led to lower DS than those obtained with Im/DMF (entries 2 and 14). Our best silylating conditions to achieve regioselective protection of primary hydroxyl groups were realized with 4.8 equiv in Im/DMF at room temperature and are reported in entries 1 and 13. In the course of this work, DS higher than 1.00 was never reached, even with the use of an excess of reagents, extended reaction times, or with high-temperature reactions. On the other hand, protection of secondary alcohols with TBDMSCl has already been reported only in strong silylation conditions like solvent-free conditions or the utilization of a strong base as TBDMSCl/KH/18-Crown-6 in THF (Braish & Fuchs 1986; Firouzabadi, Etemadi *et al.* 1998).

Table 3 Solubility of Chitosan Derivatives in Common Organic Solvents[a]

Solvents	*N*-phthaloylchitosan	*6-O*-TBDMS-*N*-phthaloylchitosan	*6-O*-TBDMS-*N*-phthaloylchitosan
acetone	-	-	-
chloroform	-	-	-
DMF	±	±	±
DMSO	±	±	±
methanol	-	-	-
pyridine	±	±	±

[a] + : soluble; ± : swelling; and - : insoluble

2.4 CHARACTERIZATION

Solubilities of silylated chitosan derivatives are reported in Table 3. However, their limited solubilities do not allow the characterization by NMR in solution but can be suitable for synthetic applications.

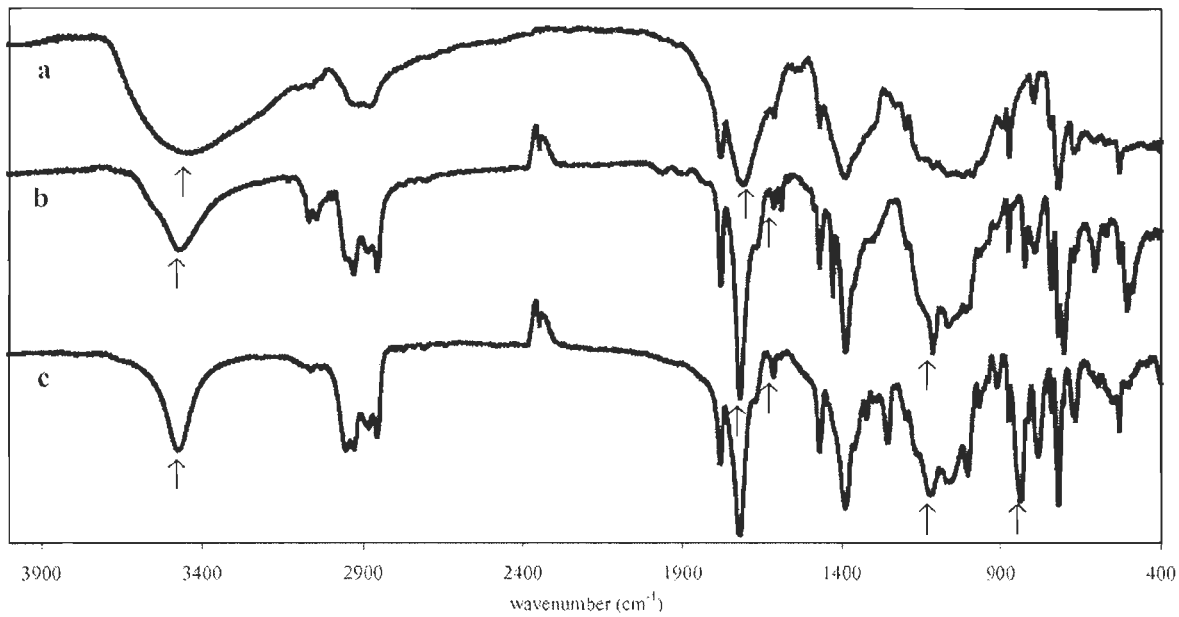


Figure 3 IR spectra of *N*-phthaloylchitosan and its silylated derivatives a) *N*-phthaloylchitosan b) *6-O*-TBDMS-*N*-phthaloylchitosan c) *6-O*-TBDPS-*N*-phthaloylchitosan

2.4.1 Interpretation of IR spectra

The IR spectra of silylated chitosans show two characteristic bands at 1113 and 836 cm^{-1} assigned, respectively, to Si-O and Si-C stretching, where the Si-O band is superimposed with C-O stretching bands of pyranosyl units at 1160-1000 cm^{-1} (Figure 3).

The degree of substitution could be estimated by the decreasing width and intensity of the hydroxyl band at 3300 cm^{-1}. Stretching of carbonyl of *N*-phthaloyl groups of silylated chitosan is observed at higher wavenumbers (1719 *vs* 1702 cm^{-1}) and is narrower than that of *N*-phthaloylchitosan. This is explained by the lower hydrogen bonding donor ability of silylated chitosan derivatives.

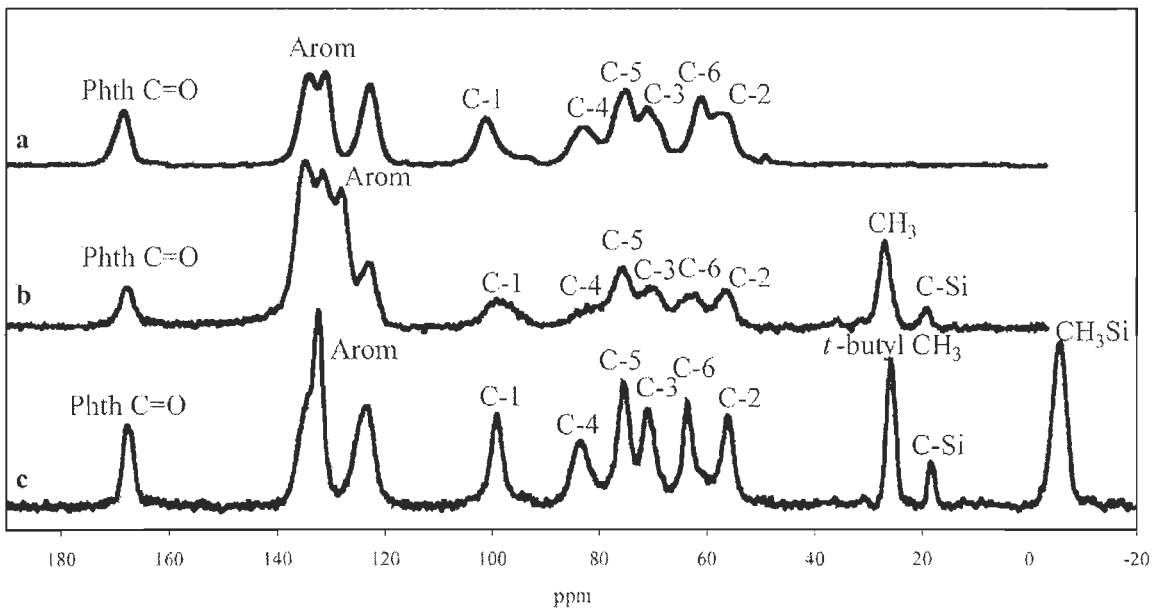


Figure 4 CP/MAS ^{13}C NMR spectra of chitosan derivatives a) *N*-phthaloylchitosan b) *6-O*-TBDPS-*N*-phthaloylchitosan c) *6-O*-TBDMS-*N*-phthaloylchitosan

2.4.2 Interpretation of CP/MAS ^{13}C NMR spectra

The solid-state ^{13}C NMR spectrum of *6-O*-TBDMS-*N*-phthaloylchitosan shows characteristic peaks related to *tert*-butyl and methyl silyl groups, respectively, at around 19, 26, and -5.75 ppm (Figure 4). A downfield shift of 2 ppm is observed for C6 carbon atoms

of silylated chitosan derivatives as compared to *N*-phthaloylchitosan that is explained by the π acceptor ability of the silicon atoms. Pyranosyl carbons of *6-O*-TBDMS-*N*-phthaloylchitosan are not superimposed and are easy to assign. Comparison of pyranosyl carbons between TBDMS- and TBDPS-*N*-phthaloylchitosan shows an upfield shift of 2 ppm for C4 of the TBDPS derivative that also becomes broader and overlaps with C5. This chemical shift variation could be explained from diamagnetic anisotropy created by phenyl groups of TBDPS moieties. C4 carbons of *6-O*-TBDMS and *6-O*-TBDPS derivatives of methyl 2,3,4-triacetyl-α-D-glucopyranose also exhibit a shielding of 1.19 ppm for the TBDPS protected compound (Andrade & Barros 2004). The phthaloyl group of the TBDMS chitosan derivative shows only two peaks as compared to *N*-phthaloylchitosan, where in the former two peaks are superimposed at 133 ppm. In solid-state ^{13}C NMR, peaks are broad due to the magnetic anisotropy environment and are known to be very sensitive to changes in the local structure. Chemical shifts of C1 and C4 carbon atoms in 1,4-linked carbohydrates are believed to be highly sensitive to changes in the glycosidic conformation (Tanner, Chanzy *et al.* 1990; Kawahara, Yui *et al.* 2003). Chemical shifts of these carbon atoms do not significantly change between silylated chitosans and *N*-phthaloylchitosan, indicating that they have similar glycosidic conformations. The peak widths are known to be related to the degree of cristallinity (Focher, Naggi *et al.* 1992; Prashanth, Kittur *et al.* 2002). *N*-Phthaloylchitosan presents some crystallinity, and its line widths are similar to those observed for silylated chitosans that suggests that these derivatives present also comparable crystallinity (Kurita, Ikeda *et al.* 2002).

Rapport-Gratuit.com

2.5 PURIFICATION

Even after many purification steps followed by a drying period of more than a week under vacuum, the silylated chitosan derivatives synthesized in DMF still show a small shoulder around 1612 cm^{-1} linked to traces of DMF, which were also observed in CP/MAS ^{13}C NMR spectra showing methyl carbons around 30 and 36 ppm. Traces of solvent are very difficult to eliminate due to the polymeric nature of these compounds. The presence of residual traces of DMF in chitosan derivatives would affect the quantification of silylated DS by a lower C/N ratio; the reported values of DS were, therefore, slightly underestimated. Series of elemental analysis was made on a single batch of a silyl chitosan derivative to substantiate the reliability of the method for the DS quantification; the calculated standard deviation of DS is 0.011 (n = 10), corresponding to a relative standard deviation of 1.2%.

2.6 CONCLUSION

Regioselective silylations of *N*-phthaloylchitosan with TBDMSCl and TBDPSCl were achieved at *6-O* positions under mild conditions with DS near 1.0 at room temperature, and these new chitosan derivatives were successfully characterized by elemental analysis, IR and solid-state ^{13}C NMR spectroscopies. Influences of experimental

conditions such as time, temperature, choice of base and solvent on DS of silylated N-phthaloylchitosan were studied. The highest DS were obtained at room temperature with an excess of silylating reagent after a reaction time of 48 h. The utilization of silylated N-phthaloylchitosan allows the further modification of 3-*O* positions and the design of novel and numerous chitosan architectures.

2.7 ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) for its financial support.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

CHAPITRE 3: FORMATION OF TRIFLUOROACETATE CHITOSAN SALT SOLUBLE IN ORGANIC MEDIA: A USEFUL REAGENT FOR CHITOSAN REGIOSELECTIVE TRANSFORMATIONS

Alain Binette[1,2], Jonathan Gagnon[1]

[1]*Université du Québec à Rimouski*
Département de biologie, chimie et géographie
300, allée des Ursulines, C. P. 3300, succ. A
Rimouski (Québec) Canada
G5L 3A1

[2]*Institut des sciences de la mer de Rimouski (ISMER)*
310, allée des Ursulines, C.P. 3300
Rimouski (Québec) Canada
G5L 3A1

ABSTRACT

Chitosan trifluoroacetate salt (TFA-chitosan) was synthesized by direct reaction between completely deacetylated high molecular weight chitosan and trifluoroacetic acid in anhydrous DMF. This chitosan salt is soluble in organic solvents like DMF, methanol and ethylene glycol and was found to be a useful reagent for regioselective modifications of chitosan in homogeneous conditions. Indeed, 6-*O* positions of TFA-chitosan were selectively protected using *tert*-butyldiphenylsilyl groups with a degree of substitution (DS) of 0.96 ± 0.01 followed by deprotonation of amine groups in a one-pot procedure. The choice of leaving groups on the silylating agent is crucial to avoid chitosan salt precipitation due to anions exchange. In addition, TBDPS-TFA was found to be an effective silylating reagent compare to *tert*-butylchlorodiphenylsilane.

Keywords: Chitosan trifluoroacetate salt, Regioselective synthesis, Organic soluble, 6-*O* protection, *tert*-Butyldiphenylsilyl trifluoroacetate, NMR

3.1 INTRODUCTION

Chitosan is an abundant biopolymer that can be utilized to develop unique polysaccharide architecture for numerous applications such as drugs, controlled release systems and chromatographic supports (Ravi Kumar, Muzzarelli *et al.* 2004). Protonated chitosan represents an example of polycationic biopolymer. While polycationic biopolymer are rare, polyanionic polymers are abundant in nature like polysaccharides including sulfate groups and/or glucuronic units (Peter 2002). Chitosan salts are intensively studied because they are easily accessible, water-soluble and can form films or fibres. On the other hand,

chemical transformations of chitosan are difficult due to its insolubility in common organic solvent, which limits its field of application (Sashiwa, Shigemasa *et al.* 2000). Selective *N*-phthaloylation of chitosan allows an increasing solubility in some organic media such as *N,N*-dimethylformamide (DMF) and pyridine, which facilitates the chemical modifications of hydroxyl groups on chitosan (Kurita 2001). However, deprotection of amine groups could be achieved by hydrazinolysis which sometime could lead to undesired reactions like ester cleavage (Gagnon). A rapid and very efficient method to quench the nucleophilicity of the amine groups of chitosan is their protonation to form chitosan salts. Protonation as protection method against electrophilic reagent has the advantage of being easily removable without any side reactions.

Generally, inorganic and organic chitosan salts are insoluble in organic solvents. However, Sashiwa, Shigemasa *et al.* (2000) have reported the formation, in water, of some sulfonate chitosan salt such as one made with (1R)-(-)-10-camphorsulfonic acid (CSA) (Sashiwa, Shigemasa *et al.* 2000 A). After drying by lyophilisation, these chitosan-sulfonate salts showed some solubility in dimethylsulfoxide (DMSO). Few months later, the same group reported the utilization of the chitosan-CSA salts for unselective *N,O*-acylation by cyclic acid anhydrides (Sashiwa, Shigemasa *et al.* 2000 B). The presence of residual water in these chitosan salts makes their transformation more difficult with water-sensitive reagents. The utilization of chitosan salts has also been reported for chitosan acetylation from chitosan-methanesulfonate salt, where methanesulfonic acid also acts as the solvent (Sashiwa, Kawasaki *et al.* 2002 A). However, the procedure does not lead to

any regioselectivity. The role of the average molecular weight and the degree of substitution have been identify as key elements in obtaining water soluble derivatives (Sashiwa, Kawasaki *et al.* 2002 A).

We report the formation of chitosan trifluoroacetate salt (chitosan-TFA), a highly soluble chitosan salt in organic solvents and its successful chemoselective protection (DS = 0.96) of primary alcohol functional groups in a one-pot procedure under homogeneous conditions. To our knowledge, chitosan-TFA is one of the first examples of chitosan protonation realized in organic media that leads to a chitosan salt soluble in some organic solvents.

3.2 EXPERIMENTAL SECTION

3.2.1 General information

Completely deacetylated chitosan (F_A = 0) from shrimp shells with a average molecular weight (M_W) of 546 kDa as determined by gel permeation chromatography (GPC) was purchased from Marinard Biotech Inc. (Rivière-au-Renard, Canada). Chitosan was ground to 33 mesh prior utilization. DMF was dried over calcium hydride before distilled under vacuum. FT-IR spectra and elemental analysis were recorded respectively with a Perkin Elmer FT-IR 1600 by KBr pellet method and with a Costech 4010 elemental

analyzer. ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 500 NMR spectrometer in CD_3OD, more than 19 000 scans were accumulated. Reported DS were calculated from the C/N ratio provided by elemental analysis.

3.2.2 Preparation of chitosan derivatives

Preparation of Chitosan trifluoroacetate salt (chitosan-TFA)

A suspension of chitosan (1.00 g, 6.23 mmol of pyranosyl units) in anhydrous DMF (200 mL) was slowly treated with 2.10 mL of TFA (27.3 mmol). The suspension was heated to 80°C for 45 min. The suspension was allowed to reach room temperature and was filtered after 24 h. The solution was precipitated with diethyl ether (300 mL). The solid was filtered and washed with three portions of diethyl ether (15 mL) and the resulting solid was dried under vacuum. A pale yellow solid was obtained with 85 % yield. IR: γ (OH), 3418 cm^{-1}; γ (C=O), 1678 cm^{-1}; γ (NH_3^+), 1529 cm^{-1}; γ (COO^-), 1432 cm^{-1}; γ (C-F), 1205 cm^{-1}; γ (C-O), 1134 cm^{-1} and 1073 cm^{-1}. ^{13}C NMR: C2, 56.3 ppm; C6, 60.4 ppm; C3, 70.60 ppm; C5, 75.2 ppm; C4, 78.1 ppm; C1, 98.1 ppm; CF_3, 116.8 ppm, (q), $^1J_{C-F}$ = 290 Hz; C=O, 161.8 ppm, (q), $^2J_{C-F}$ = 36 Hz.

Preparation of *tert*-Butyldiphenylsilyl trifluoroacetate (TBDPS-TFA)

Sodium trifluoroacetate 5.02 g (36.9 mmol) was dissolved and stirred in dry DMF (25 mL) at room temperature, then 8.0 mL (31 mmol) of TBDPSCl was added to the mixture. The appearance of a fine white crystalline precipitation was observed. The mixture was used without purification nor characterization.

Preparation (one-pot) of Poly[β-(1→4)-2-amino-*6-O-tert*-butyldiphenylsilyl-2-deoxy-D-glucopyranose] (*6-O-tert*-butyldiphenylsilylchitosan).

To a suspension of chitosan 0.502 g (3.12 mmol) in 40 mL of DMF, 0.30 mL (3.9 mmol) of TFA was added. The temperature was raised to 70°C, after 30 min. of stirring, 0.10 mL (13 mmol) of TFA was added. Then a flow of N_2 bubbled in the mixture for 30 min. The heating was stopped and the mixture was allowed to cool to room temperature. A solution of TBDPS-TFA in DMF 25 mL (1.25 M) was added to the mixture using a cannula and stirred for 48 h at room temperature. The reactional mixture was quenched with 100 mL of EtOH-H_2O (1:1 ($^v/_v$)). The mixture was neutralized by dripping a solution of NaOH (0.656 g in 125 mL of EtOH-water (1:1 ($^v/_v$)) until the pH reached 8. The precipitate was filtered and washed with acetone (3 × 15 mL), a drab powder was collected and dried under vacuum. Yield 83 %, 1.02 g (0.259 mmol). IR: γ (OH), 3459 cm^{-1}; γ (CH), 3068 cm^{-1}; γ (phenyl), 2000 - 1700 cm^{-1}; γ (Si-O), 1674 cm^{-1}; γ (NH_2 def), 1113 cm^{-1}; γ (C-O pyranosyl), 1150 – 980 cm^{-1}; γ (Si-O-CH_3 def), 823 cm^{-1}; γ (aro. ring def), 700 cm^{-1}. ^{13}C NMR: $C_{4°}$, 18.9 ppm; CH_3 (*t*-but), 26.4 ppm; C2, 57.2 ppm; C6, 62.7 ppm; C3, 69.3 ppm; C5, 75.5 ppm; C4, 76.0 ppm; C1, 96.4 ppm; C aro. (*m*), 127.7 ppm; C aro. (*p*), 129.9 ppm; Si-C aro. 132.9 ppm; C aro. (*o*), 135.6 ppm. Anal. calcd for $C_{22}H_{30}NO_4Si$ with DS of 0.96: C, 65.50; H, 7.75; N, 3.57. Found: C, 64.87; H, 6.98; N, 3.50.

3.3 RESULTS AND DISCUSSION

3.3.1 Characteristics of trifluoroacetic acid

Trifluoroacetic acid (TFA) is one of the few organic acids to be a strong acid with a pK_a^{water} of -0.26, this particularity is combined with a moderately low molecular weight (114.2 g/mol) and boiling point (71.8 °C) (CRC Handbook 1999). These characteristics make it an interesting candidate for amine group protonation on a polymeric compound in an organic medium. Considering the relatively high volatility of TFA (10 kPa at 16.8°C) compared to water (1.938 kPa at 17°C), any excess could be notably eliminated from the media (DMF) by a light warming of the solution and an inert gas bubbling (CRC Handbook 1999). These features seem ideal for the purpose of forming and dissolving a chitosan salt in an anhydrous organic media and to complete a regioselective protection.

3.3.2 Choice of anion and pKa considerations

Various water-soluble inorganic and organic chitosan salts have been obtained by reaction between chitosan and their corresponding acid in water (Roberts 1992). In an effort to understand the process beneath chitosan salt dissolution toward the choice of anion, we favour an explanation based on pK_a considerations. However, pK_a values are not currently determined in DMF. Maran, Celadon *et al.* (1991) have put forward a linear correlation

between pK_a in DMSO and pK_a in DMF for a series of 51 benzoic acids, phenols, and carboxylic acids (Maran, Celadon *et al.* 1991).

$$pK_a^{DMF} = 1.56 + 0.96\ pK_a^{DMSO}\ (r = 0.991)$$

One of the conclusions stated by Maran *et al.* is that even if the two solvents are not that similar; the results: "support the fact that DMF and DMSO display similar properties at least for OH^- and N-H acids and their conjugate bases." Using the pK_a^{DMSO} for TFA reported by Bordwell, and the relation reported by Maran *et al.* lead us to an estimated pK_a^{DMF} for TFA of 4.87 (Bordwell 1988).

On the other hand, pK_a^{water} of protonated chitosan is reported to be 6.3 which allows its determination in DMF from the correlation equation between pK_a^{DMF} and pK_a^{water} (Perrin, Dempsey 1981; Bartnicka, Bojanowska *et al.* 1991; Matsuyama, Kitamura *et al.* 1999). However, Park, Choi *et al.* 1983 have determined that pK_a of protonated chitosan in water is related to the degree of neutralisation (α) of the substance. The reported values for pK_a are 6.1 for an α less than 0.72 up to 6.7 for an α higher than 0.72. They also noted what appears to be a major change in molecular conformation of protonated chitosan near the degree of neutralisation corresponding to 0.72, the point where chitosan starts to precipitate (pH 6.6). They attributed the precipitation to the "formation of intermolecular hydrogen bonding involving $-NH_2$ groups". The value of the pK_a for protonated chitosan appears to be modestly influenced by the salt concentration of the solution (Park, Choi *et al.* 1983).

Rapport-Gratuit.com

The pK_a^{DMF} value of protonated chitosan is estimated to be 10.6 compared to 13.4 and 4.9, for acetic acid and TFA, respectively (Maran, Celadon *et al.* 1991). This large difference between pK_a^{DMF} and pK_a^{water} is mainly attributable to the difference in hydrogen bonding ability (Matthews, Bares *et al.* 1975; Bordwell 1988). Water acts as a strong proton donor and acceptor whereas DMF acts as a strong hydrogen acceptor but a very poor proton donor (Clare, Cook *et al.* 1966). The medium of chitosan salt formation is also important for the potential solubility of the salt. To demonstrate the importance of the media of salt formation, chitosan-TFA salt was formed in water and dried by evaporation. After several days of observation, we have reached to the conclusion that the salt formed in water is insoluble in DMF showing that residual water molecules are sufficient to spoil its capacity to dissolve in polar organic solvent.

Chitosan protonation is essential to avoid substitution reaction with amine groups and to increase chitosan solubility in organic solvents by decreasing their acceptor hydrogen bonding capacities. The choice of TFA was based on the following fact: TFA is a strong organic acid; its structure is very similar to acetic acid, whose use is known to lead to aqueous soluble chitosan salt (Roberts 1992). Finally, due to its high volatility it should be effortless to remove any excess from the reactional mixture. Moreover, chitosan trifluoroacetate salt allows regioselective protection on hydroxyl groups as shown with TBDPS group. Formation of chitosan-TFA salt was realized by direct protonation of chitosan with trifluoroacetic acid in anhydrous DMF as represented in Figure 5.

3.4 SILYLATION

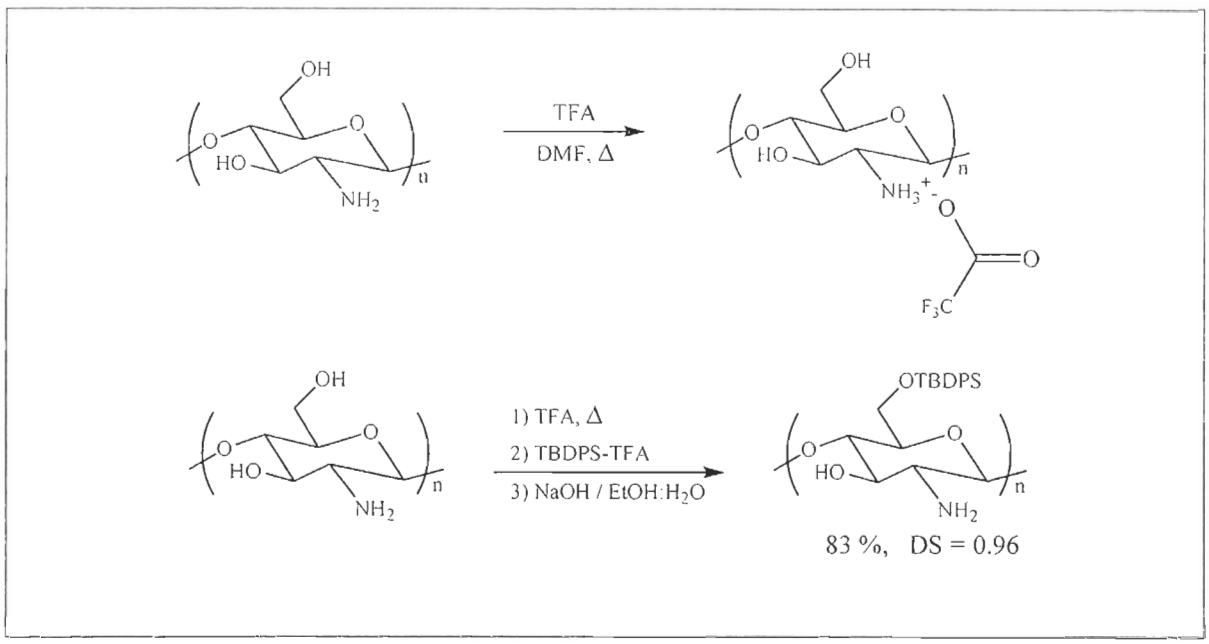


Figure 5 Procedures of dissolution of chitosan by protonation and selective protection of the primary hydroxyl with TBDPS group.

tert-Butyldiphenylsilyl (TBDPS) group is a protecting group well known to be selective to primary alcohols. This silyl ether precursor is commonly used in carbohydrate chemistry due to its stability in various reaction conditions. TBDPS group is effortlessly introduced and can be removed by numerous methods such as mild reaction with fluoride anion (Farras, Serra *et al.* 1998; Greene & Wuts 1999; Gopinath & Patel 2000; Crouch 2004). Regioselective silylation of primary hydroxyl groups with chitosan-TFA salt was first attempted with *tert*-butyldiphenylsilyl chloride (TBDPSCl) in DMF. Instantaneously after addition of the silylating reagent, a white precipitate (chitosan) was observed. This precipitation is attributable to an anion exchange between trifluoroacetate and chloride ions

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

that are formed by nucleophilic substitution reaction of trifluoroacetate on TBDPSCl. Chitosan chloride salt is known to be insoluble in organic solvents (Muzzarrelli 1997). This observation indicated that the leaving group of the silylating agent must be trifluoroacetate or another very weak conjugated base in DMF to avoid precipitation of chitosan before silylation begin. Therefore, selective silylation of chitosan-TFA salt at room temperature for 48 h was completed with *tert*-butyldiphenylsilyl trifluoroacetate obtained from spontaneous reaction of TBDPSCl and sodium trifluoroacetate in anhydrous DMF.

3.5 CHARACTERIZATION

3.5.1 Interpretation of IR spectra

The IR spectrum of *6-O*-TBDPS-chitosan (Figure 6) shows a weaker and sharper hydroxyl band at 3455 cm^{-1} compared to chitosan and a NH_2 deformation at 1674 cm^{-1}. The presence of silyl groups were also confirmed by a strong absorption at 1113 cm^{-1} assigned to the Si-O elongations that are superimposed to the C-O elongations of the pyranosyl units and a band attributable to phenyl groups at 3068 cm^{-1}.

3.5.2 Interpretation of the ^{13}C NMR spectra

^{13}C NMR spectra were realized in solution with deuterated methanol (not shown). Peak assignation is consistent with our previous work (Binette & Gagnon 2007). The spectra show a very low signal to noise ratio. To enhance the signal to noise ratio of the

spectra, they should have been made in solution with DMF-d_7 or in solid state with a CP/MAS protocol.

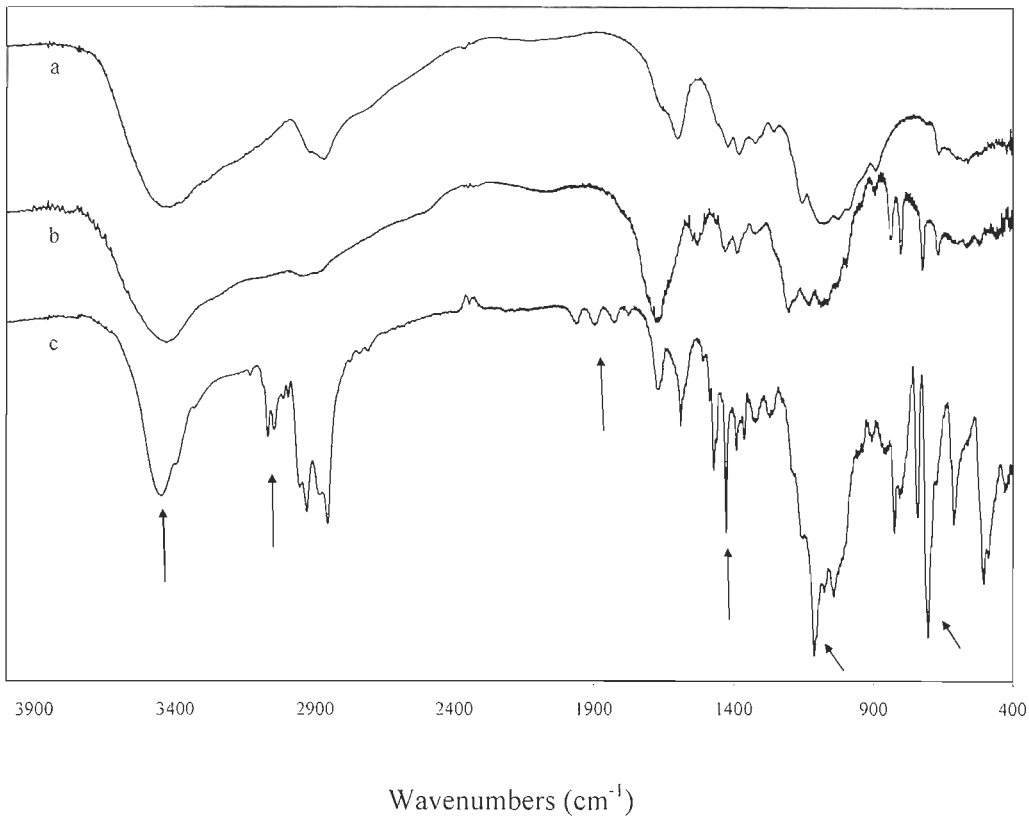


Figure 6 IR spectra of chitosan and its derivatives a) chitosan b) trifluoroacetate chitosan salt c) *6-O*-TBDPS-chitosan

3.6 PURIFICATION

Even after repeating the purification steps followed by a prolonged drying period under vacuum, the IR spectra of the silylated chitosan derivative and the synthesized

chitosan-TFA salt still show a small absorption at 1612 cm^{-1} linked to traces of DMF. The presence of traces of DMF in chitosan-TFA salt and *6-O*-TBDPS-chitosan was also confirmed by ^{13}C NMR spectra showing methyl carbons at 30 ppm and 36 ppm and the carbonyl carbon at 163 ppm. Due to the polymeric nature of these compounds, traces of DMF are very difficult to eliminate completely. Residual traces of DMF induce a negative bias to our DS determination by lowering the C/N ratio from the elemental analysis; all the reported DS are uncorrected.

3.7 SOLUBILITY OF THE REPORTED DERIVATIVES

The procedure is an easy and efficient way to solubilize chitosan in few organic solvents such as DMF, methanol, ethylene glycol, DMSO and in water (Table 4 and Table 5). One of the main interests of this procedure is to decrease drastically the nucleophilicity of the amine in an organic solvent without the use of any classical organic amine protecting group.

Table 4 Solubility of *6-O*-TBDPS-chitosan in various solvents[a]

solvents	*6-O*-TBDPS-chitosan
acetone	-
DMF	-
DMSO	-
pyridine	+/-
methanol	-
ethanol	-
acetonitrile	-
toluene	+/-
chloroforme	-
water	-

a) + soluble: +/- swelling or partially soluble: - insoluble;
DMF: *N,N*-dimethylformamide, DMSO: dimethylsulfoxide

Table 5 Solubility of trifluoroacetate chitosan salt in various solvents[a]

solvents	chitosan trifluoroacetate salt
acetone	-
DMF	+
DMSO	+/-
pyridine	+/-
methanol	+
ethylene glycol	+
water	+

a) + soluble, +/- swelling or partially soluble, - insoluble;
DMF *N,N*-dimethylformamide, DMSO dimethylsulfoxide

3.8 TRIFLUOROACETATE AS A LEAVING GROUP

The use of trifluoroacetate as a leaving group on TBDPS reagent allows reaction to proceed with a higher DS on chitosan-salt (0.96) than the one observed with TBDPSCl on *N*-phthaloylchitosan (0.86) in our previous work for comparable reactional systems (Binette & Gagnon 2007). Indeed, after deprotonation of the alcohol, the generated by-product is TFA, a volatile organic acid, which can be effortlessly eliminated from the reactional media. The elimination of a by-product can act as a driving force for reactions governed by a chemical equilibrium. On the other hand, the compared reactions are not the same; the substrates are different and the silylation procedure implying chitosan-TFA was conducted in homogeneous conditions.

Compared to our previous work (Binette & Gagnon 2007) using TBDPSCl on *N*-phthaloylchitosan, the silylation procedure reported here, was achieved without the use of a base such as imidazole. This new high yield procedure for the introduction of TBDPS protecting group can be a useful alternative to a classical protection procedure. Therefore, a higher reaction rate could be observed for TBDPS-TFA in comparison with TBDPSCl. It is also interesting to note that TFA is cheaper than trifluoromethanesulfonic acid (triflate acid) in which the anion is commonly used as an excellent leaving group (Clayden, Greeves *et al.* 2000).

3.9 CONCLUSION

Chitosan trifluoroacetate salt prepared in DMF is found to be soluble in some organic solvents. Protonation of the amine group allows chemical transformations of alcohol groups onto this abundant biopolymer for numerous application fields. This salt was advantageously utilized for the regioselective silylation of chitosan with TBDPS group affording a DS of 0.96.

3.10 ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) for its financial support.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION GÉNÉRALE

4.1 SILYLATION DU *N*-PHTALOYLCHITOSANE

Les groupes protecteurs TBDMS et TBDPS sont connus pour être sélectifs aux alcools primaires en raison du grand encombrement stérique qu'ils présentent autour de l'atome de silicium (Carey & Sundberg 1997 B). L'utilisation des groupes TBDMS et TBDPS est courante et bien documentée dans le domaine de la chimie des sucres (Collins & Ferrier 1995; Greene & Wuts 1999). L'objectif premier est de réaliser la protection sélective des fonctions alcools primaires du *N*-phtaloylchitosane.

L'introduction des groupes protecteurs TBDMS et TBDPS a été accomplie. Afin que le chitosane ou l'un de ses dérivés conserve son intégrité « homopolymérique » lors d'une réaction de substitution, il est nécessaire que cette dernière conduise à un degré de substitution qui avoisine la valeur de « un » (DS de 1). En raison de son architecture composée d'unités pyranosyles, les transformations chimiques tentées sur le chitosane ont intérêt à être effectuées dans des conditions relativement douces, sans quoi, il y a risque de dégradation du polymère.

Dans le cas de la cellulose, la silylation a été réalisée dans l'ammoniac liquide avec de l'hexaméthyldisilazane (Mormann & Demeter 1999). La triméthylsilylation de la β-chitine a été réalisée dans la pyridine à 70°C avec l'emploi d'un mélange de

chlorotriméthylsilane (10 éq) et de l'hexaméthyldisilazane (10 éq) pour l'obtention d'un DS de 2,00 (Kurita, Hirakawa *et al.* 1999). Quant à la triméthylsilylation du chitosane, elle a aussi été réalisée dans la pyridine avec l'emploi du même mélange de chlorotriméthylsilane (10 éq) et de l'hexaméthyldisilazane (10 éq) mais en présence de DMAP (5 éq) (Kurita, Hirakawa *et al.* 2004).

Les fonctions alcools primaires du *N*-phtaloylchitosane ont réagi sélectivement avec les chlorosilanes TBDMSCl et TBDPSCl, pour former les dérivés silylés *O-6* du *N*-phtaloylchitosane (figure 2). Les degrés de silylation de ces réactions de protection ont été étudiés en fonction du temps de réaction pour deux conditions expérimentales différentes. Ces conditions expérimentales étaient l'imidazole dans le DMF (Im/DMF) et la 4-(*N*,*N*-diméthylamino)pyridine dans la pyridine (DMAP/py). Dans le cas de la DMAP/py, la pyridine remplit deux fonctions soit celle de solvant et de base. La DMAP est un catalyseur nucléophilique dont l'azote pyridinique porte une charge partielle négative élevée (Carey & Sundberg 1997 A). Sa présence facilite le transfert du proton de l'alcool vers la pyridine. Pour les réactions discutées, la DMAP n'était présente qu'en quantité catalytique.

Les conditions de précipitation et de purification ont été optimisées afin d'éliminer les agents silylants non-réagis et autres sous-produits du mélange réactionnel. Des essais de

Rapport-Gratuit.com

purification ont été effectués avec de l'acétone, de l'éther diéthylique, du méthanol, de l'éthanol et de l'eau. Le parachèvement des réactions fait avec un mélange eau-éthanol (1 : 1; ($^{v}/_{v}$)) suivi d'un lavage à l'éther diéthylique a permis la précipitation complète et spontanée du polymère tout en obtenant un produit exempt d'impuretés. Les rendements des réactions de silylations sont dans tous les cas supérieurs à 85 %.

Les résultats des essais de protection des fonctions alcools primaires du *N*-phtaloylchitosane par les groupes TBDMS et TBDPS sont présentés respectivement dans les tableaux 1 et 2.

Quelques données de DS montrées dans les tableaux 1 et 2 ont été obtenues en suivant la même réaction en fonction du temps. Les expériences ont montré que les proportions stœchiométriques entre les réactifs impliqués sont un élément essentiel pour l'atteinte de hauts DS. Lorsque les réactions de silylation ont été tentées avec des proportions d'agent silylant allant de 1,2 à 1,5 équivalent, les DS obtenus sont inférieurs à 0,05, soit moins de 5 %. Cette observation s'explique par la présence d'une moyenne de 0,7 molécule d'eau par unité de *N*-phtaloylchitosane. Ce degré d'hydratation a été déterminé par analyse élémentaire et il concorde avec les valeurs rapportées (Kurita 2003). Le caractère hygroscopique du chitosane est bien connu (Okuyama, Noguchi *et al.* 2000). L'eau a la propriété de réagir avec les chlorosilanes (Greene & Wuts 1999). La présence d'eau dans le milieu réactionnel neutralise et fait diminuer la quantité de réactif (chlorosilane) disponible pour la réaction souhaitée.

Afin de pouvoir observer de substantielles silylations du *N*-phtaloylchitosane, les proportions de réactifs silylants doivent être supérieures à 2,2 équivalents (tableaux 1 et 2). Les expériences où le nombre d'équivalents d'agents silylants était supérieur à 5 n'ont pas permis d'obtenir des DS au-delà de 0,92 pour le groupement TBDMS (tableau 1; entrées 2 et 3) et de 0,86 pour le groupement TBDPS (tableau 2; entrées 15 et 22).

Pour des conditions expérimentales comparables, les réactions de protection effectuées sur le *N*-phtaloylchitosane avec le TBDMSCl se produisent sensiblement plus rapidement que celles réalisées avec le TBDPSCl (tableaux 1 et 2; entrées 1 et 13; 2 et 14; 3 et 15; 10 et 21). Cette observation s'explique par un plus grand encombrement stérique autour de l'atome de silicium pour le TBDPSCl par rapport au TBDMSCl.

Les expériences correspondantes aux entrées : 6, 7, 8, 18 et 19 des tableaux 1 et 2 ont été réalisées dans la pyridine à reflux (115 °C) avec des quantités catalytiques de DMAP. Pour ces dernières, une légère augmentation des DS fut observée en fonction des temps de réaction (24 h à 48 h). Lors des expériences réalisées à reflux, soit dans le DMF ou la pyridine, les produits obtenus étaient apparemment dénaturés (brunâtres). Les DS déterminés demeuraient inférieurs à 1,0. Ces silylations ont également généré des DS comparables ou supérieurs à ceux obtenus lors des expériences réalisées dans des conditions similaires (temps de réaction et de proportions de réactifs) à l'exception de la température qui était ambiante (tableaux 1 et 2; entrées 4 et 9; 17 et 20). L'utilisation de températures plus élevées n'est donc pas appropriée pour l'optimisation de ces réactions.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Elle n'influence que peu ou pas la vitesse de réaction et ne permet pas d'obtenir de meilleurs DS. Par surcroît, tout indique que son utilisation favorise une dégradation du polymère.

Les silylations utilisant le TBDPSCl s'effectuent plus rapidement dans le mélange réactionnel constitué de Im/DMF que dans celui composé de DMAP/pyridine (tableau 2; entrées 13 et 17; 12 et 18). Cette observation est cohérente avec la littérature (Greene & Wuts 1999). Afin d'observer l'influence des solvants, des silylations ont été réalisées dans une solution py/DMF (1 : 1 ($^{v}/_{v}$)) (tableaux 1 et 2; entrées 10 et 21). Il appert que ce système réactionnel ne permet pas d'obtenir une meilleure performance comparativement aux expériences menées avec le mélange Im/DMF (tableaux 1 et 2; entrées 2 et 14).

Les conditions de silylation optimales déterminées lors de cette étude portant sur la protection régiosélective des fonctions alcools primaires du *N*-phtaloylchitosane ont été obtenues avec 4,8 équivalents de TBDMSCl ou de TBDPSCl dans un mélange Im/DMF à température ambiante pour une durée de 48 h (tableaux 1 et 2; entrées 1 et 13).

4.1.1 Caractérisation des dérivés silylés du N-phtaloylchitosane

Les solubilités des dérivés silylés du *N*-phtaloylchitosane sont rapportées dans le tableau 3. Comme les solubilités sont limitées, elles ne permettent pas la caractérisation des

dérivés formés par RMN ^{13}C en solution. Toutefois, comme il est possible d'effectuer des réactions de substitution sur le chitosane à partir de systèmes réactionnels hétérogènes, les dérivés obtenus pourraient convenir à des applications de synthèse.

Les spectres IR des composés silylés du *N*-phtaloylchitosane montrent deux bandes caractéristiques à 1113 cm^{-1} et 836 cm^{-1} qui sont respectivement attribuables à des liaisons Si-O et Si-C. La bande Si-O (1113 cm^{-1}) est superposée aux bandes C-O des unités pyranosyles allant de 1160 à 1000 cm^{-1}. Notons que cette bande Si-O est de plus forte intensité et qu'elle se démarque des absorptions relatives aux liaisons C-O (figure 3). Le DS de la fonction alcool primaire du spectre IR des composés *6-O*-silyl-*N*-phtaloylchitosane peut être estimé par l'imposante diminution de la bande hydroxyle à 3300 cm^{-1}, et ce, tant en intensité qu'en largeur. Les bandes carbonyles des groupements *N*-phtaloyles des dérivés silylés du chitosane sont observées à un plus haut nombre d'onde, 1719 cm^{-1} comparativement à 1702 cm^{-1}. Cette bande est aussi plus fine que celle présente dans le spectre IR du *N*-phtaloylchitosane. Cette variation s'explique par une diminution de la capacité de donneur de ponts hydrogène des dérivés silylés du chitosane.

Le spectre RMN ^{13}C du *6-O*-TBDMS-*N*-phtaloylchitosane montre des pics caractéristiques liés aux groupes *tert*-butyles et méthyles des silanes, soit, 19 ppm, 26 ppm, et -5,75 ppm respectivement (figure 4). On observe un déplacement vers un bas champ de 2 ppm pour les atomes du carbone 6 (C6) des dérivés silylés du chitosane par rapport au

N-phtaloylchitosane. Cette déviation est expliquée par la capacité d'accepteur π des atomes de silicium. Les pics correspondant aux carbones des pyranosyles (C1 à C6) du *6-O*-TBDMS-*N*-phtaloylchitosane ne présentent pas de recouvrement. Elles sont relativement faciles à assigner. La comparaison des pics attribués aux carbones des pyranosyles des dérivés *6-O*-TBDMS-*N*-phtaloylchitosane et *6-O*-TBDPS-*N*-phtaloylchitosane montre un décalage du déplacement chimique de 2 ppm vers un champ supérieur pour le C4 du dérivé de TBDPS. Notons que ce pic devient également plus large et chevauche partiellement le pic du C5. Ce décalage du déplacement chimique est attribuable à un phénomène de cônes d'anisotropie diamagnétique créé par les substituants phényles des groupements TBDPS. Les carbones C4 des dérivés *6-O*-TBDMS et *6-O*-TBDPS du méthyle 2,3,4-triacétyl-α-D-glucopyranose montrent également un blindage (0,19 ppm) pour le C4 du composé protégé par le groupe TBDPS (Andrade & Barros 2004). Le groupe phtaloyle du dérivé TBDMS-*N*-phtaloylchitosane montre deux pics par rapport au spectre du *N*-phtaloylchitosane, dans lequel les deux pics sont superposés à 133 ppm.

En spectroscopie RMN ^{13}C en phase solide, la largeur des pics est due à l'environnement d'anisotropie magnétique. Cette particularité est connue pour être très sensible aux changements de la structure locale. Les déplacements chimiques associés aux atomes de carbone C1 et C4 des sucres liés 1→4 sont extrêmement sensibles aux changements de conformations (Tanner, Chanzy *et al.* 1990; Kawahara, Yui *et al.* 2003). Les déplacements chimiques de ces atomes de carbone (C1 et C4) ne varient pas de façon

significative entre les dérivés silylés du chitosane et le *N*-phtaloylchitosane, indiquant qu'ils auraient des conformations glycosidiques comparables. La largeur des pics est connue pour être inversement proportionnelle au degré de cristallinité présent chez les polymères (Focher, Naggi *et al.* 1992; Prashanth, Kittur *et al.* 2002). La largeur des pics du spectre RMN ^{13}C en phase solide du *N*-phtaloylchitosane est semblable à celle observée pour les spectres du *6-O*-TBDMS-*N*-phtaloylchitosane et du *6-O*-TBDPS-*N*-phtaloylchitosane. Cette similitude suggère que le degré de cristallinité des trois dérivés de chitosane discutés est comparable.

4.2 FORMATION DU SEL DE CHITOSANE-TFA

4.2.1 Le choix de l'acide et du milieu réactionnel

Plusieurs sels de chitosane hydrosolubles ont été obtenus par la réaction, en milieux aqueux, entre différents acides (inorganiques et/ou organiques) et le chitosane (Roberts 1992). Le choix de l'acide trifluoroacétique pour la protonation du chitosane est justifié par sa structure et ses propriétés physico-chimiques. Le TFA est un acide organique fort soit de l'ordre de 10 000 fois plus fort que l'acide acétique (dans l'eau). En raison de sa petite taille et masse molaire (114 g/mol) l'acide trifluoroacétique est réputé être volatil. Cette dernière caractéristique pourra être mise à profit pour faciliter l'élimination de tout excès.

Aussi, l'acide trifluoroacétique est un acide qui possède une grande similitude structurale avec l'acide acétique, dont l'utilisation est connue pour obtenir un sel de chitosane hydrosoluble (Roberts 1992).

Une explication fondée sur les pK_a a été avancée afin de comprendre le mécanisme ou processus qui permet la dissolution des sels de chitosane protoné en fonction du choix de l'anion. Malheureusement, les valeurs de pK_a dans le DMF, le solvant d'intérêt, ne sont pas disponibles dans la littérature. Le groupe de Maran a proposé en 1991 une relation linéaire qui établit une corrélation entre les pK_a dans le DMSO et ceux dans le DMF pour une série de 51 acides (benzoïques, phénoliques et carboxyliques) (Maran, Celadon *et al.* 1991).

$$pK_a^{DMF} = 1{,}56 + 0{,}96\ pK_a^{DMSO} \quad (r = 0{,}991)$$

Parmi les conclusions de l'étude de Maran *et al.*, il est mentionné que malgré que ces deux solvants (DMF et DMSO) ont des propriétés différentes, « les résultats montrent des propriétés semblables au moins pour ce qui a trait à leurs comportements face aux OH^- et des NH-acide et leurs bases conjuguées » (traduction de l'auteur).

En utilisant le pK_a^{DMSO} du TFA rapporté par Bordwell (1988) et l'équation proposée par Maran, Celadon *et al.*, l'estimation du pK_a de TFA dans le DMF est de 4,87 (Bordwell 1988). Le pK_a du chitosane protoné dans l'eau est de 6,3 (Matsuyama, Kitamura *et al.*

1999). Cette valeur et la corrélation pK_a^{DMF} et pK_a^{eau} permettent d'évaluer le pK_a du chitosane protoné dans le DMF (Perrin, Dempsey 1981; Bartnicka, Bojanowska *et al.* 1991).

Toutefois, Park, Choi *et al.* (1983) ont déterminé que le pK_a dans l'eau du chitosane protoné est lié au degré de neutralisation (α) de ce dernier. Les valeurs de pK_a rapportées dans leur étude sont de 6,1 pour un α inférieur à 0,72 et de 6,7 pour un α supérieur à 0,72. Ils ont également observé ce qui semble être un changement important de conformation moléculaire du chitosane protoné au voisinage d'un degré de neutralisation correspondant à 0,72. C'est à ce point (pH 6,6) que s'amorçait la précipitation du chitosane. Ils ont attribué la précipitation du chitosane à « la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires impliquant les groupes $-NH_2$ » (traduction de l'auteur). La valeur du pK_a du chitosane protoné ne serait que peu ou pas influencée par la charge ionique de la solution, c'est-à-dire par la présence d'ions spectateurs (Park, Choi *et al.* 1983).

L'estimation de la valeur du pK_a du chitosane protoné dans le DMF est de 10,6. Cette différence significative entre les valeurs de pK_a pour le chitosane protoné dans le DMF et dans l'eau serait notamment attribuable à la différence de la capacité du solvant (le DMF) à participer à la formation de ponts hydrogène (Matthews, Joseph *et al.* 1975). En tout état de cause, l'eau a la capacité d'agir en tant que donneur et d'accepteur de ponts hydrogène. Cependant, le DMF ne peut agir qu'en tant qu'accepteur de ponts hydrogène (Clare, Cook *et al.* 1966).

Le milieu servant à la formation du sel de chitosane est également d'une grande importance en ce qui a trait à la solubilité du sel formé. Le sel de chitosane-TFA formé dans l'eau et ensuite séché par évaporation sous pression réduite est insoluble dans le DMF, et ce, malgré plusieurs jours de contact. Il semble que la présence de traces d'eau subsistantes soit suffisante pour altérer substantiellement la capacité du sel chitosane-TFA à se dissoudre dans ce solvant organique polaire.

La protonation du chitosane à l'aide du TFA rend ce dernier soluble dans certains solvants organiques. Ce phénomène s'explique par une diminution radicale de la capacité des groupes amines à accepter des ponts hydrogène suite à leur protonation. De plus, cette protonation permet d'éviter qu'une réaction de substitution électrophilique ne se produise sur les fonctions amines. La formation du sel de chitosane-TFA a été réalisée par le traitement direct du chitosane avec l'acide trifluoroacétique (TFA) dans le DMF anhydre.

4.2.2 Silylation du sel de chitosane-TFA

L'utilisation du sel chitosane-TFA a permis la protection régiosélective des groupes hydroxyles primaires par le groupement TBDPS. Le groupe *tert*-butyldiphénylsilyle (TBDPS) est un groupe protecteur connu pour être sélectif aux alcools primaires. Ce précurseur d'éther de silyle est couramment utilisé dans la chimie des sucres, à cause de sa grande stabilité pour de nombreuses conditions réactionnelles.

Le groupement TBDPS s'introduit avec facilité en conditions douces et peut être sélectivement retiré par de nombreuses méthodes telle qu'en présence de l'anion fluorure (Greene & Wuts 1999). La protection sélective des groupements alcools du sel de chitosane-TFA a d'abord été tentée en utilisant le *tert*-butylchlorodiphénylsilane (TBDPSCl) dans le DMF. L'apparition d'un précipité blanc (chitosane) fut observée immédiatement après l'ajout du TBDPSCl. Cette précipitation est attribuable à un échange d'ions impliquant les anions trifluoroacétates du sel de chitosane-TFA et les chlorures du TBDPSCl. Le sel de chitosane protoné dont l'anion est un chlorure est connu pour être insoluble dans les solvants organiques (Roberts 1992).

Cette observation permet de déduire que le groupe sortant du réactif silylant doit être l'ion trifluoroacétate ou une base conjuguée (organique) très faible, ceci, afin d'éviter que la précipitation du chitosane dans le DMF ne se produise avant que la réaction de silylation ne s'effectue.

La silylation sélective du sel de chitosane-TFA a été réalisée à température ambiante en 48 h en présence de 7 équivalents de *tert*-butyl(trifluoroacéto)diphénylsilane. Pour cette réaction le rendement obtenu a été de 83 % avec un DS de 0,96. Le *tert*-butyl(trifluoroacéto)diphénylsilane a été obtenu de la réaction spontanée entre le *tert*-butylchlorodiphénylsilane et le trifluoroacétate de sodium dans le DMF anhydre.

Rapport-Gratuit.com

4.3 CARACTÉRISATION DU *6-O*-TBDPS-CHITOSANE

Le spectre IR du 6-*O*-TBDPS-chitosane montre une bande associée aux fonctions hydroxyles à 3455 cm^{-1}. Cette absorption est de plus faible intensité et nettement plus étroite comparativement à la même bande observée sur le spectre IR du chitosane. La présence de groupes phényles est appuyée par l'observation de la bande d'absorption qui correspond au nombre d'onde de 3068 cm^{-1} attribuable aux élongations C-H de composés aromatiques. En outre, l'introduction des groupements silyles est apparente par une absorption de grande intensité à 1113 cm^{-1}. Cette dernière est imputable aux élongations silicium-oxygène. Ces élongations silicium-oxygène superposent et dépassent en intensité les élongations carbone-oxygène des unités pyranosyles.

Les spectres RMN ^{13}C ont été réalisés en solution dans le méthanol deutéré. L'assignation des pics observés est conforme avec nos travaux précédents, soit la synthèse du *6-O*-TBDPS-*N*-phtaloylchitosane (Binette & Gagnon 2007). Tous les atomes de carbones comparables montrent des déplacements chimiques pratiquement identiques. Sous un autre angle, les spectres effectués montrent un très faible rapport signal-bruit. Afin de confirmer la structure, les spectres RMN ^{13}C seront effectués en solution dans du DMF ou du DMSO deutéré (DMF-d_7 ou DMSO-d_6) ou en phase solide avec l'utilisation d'une technique CP/MAS.

Malgré la répétition des étapes de purification à l'aide d'une solution eau-éthanol, suivie d'un séchage sous vide d'une durée de 7 jours, les spectres IR des dérivés *6-O*-TBDPS-chitosane et du sel chitosane-TFA synthétisés montrent toujours une petite absorption à 1612 cm^{-1}. Cette absorption est produite par la présence de traces de DMF. Les spectres RMN ^{13}C du chitosane-TFA et du *6-O*-TBDPS-chitosane confirment la présence de DMF résiduel. Ces spectres montrent des carbones méthyliques à 30 et 36 ppm et un carbone carbonylique à 163 ppm, ces pics étant imputables au DMF. En raison de la nature polymérique de ces composés et de leur sensibilité à la chaleur, il est pratiquement impossible d'éliminer complètement le DMF à l'aide de la méthode utilisée. La présence de DMF dans les dérivés de chitosane diminue le rapport C/N réel de ces composés et altère les calculs de DS. Les valeurs de DS rapportées (non-corrigées) sont légèrement sous-estimées.

Une série d'analyses élémentaires a été faite avec le dérivé *6-O*-TBDPS-chitosane provenant d'une même réaction. Les objectifs de cet exercice étaient multiples : s'assurer de l'homogénéité des échantillons soumis à l'analyse élémentaire, vérifier la possibilité d'un « emprisonnement » de solvants ou de sous produits de réaction à l'intérieur de la matrice polymérique et valider la fiabilité de la méthode de quantification des DS. L'écart type calculé pour les DS de l'échantillon choisi (DS de 0,96) est de 0,011 (n = 10). Cet écart type correspond à une erreur relative de ± 1,2 %, ce qui est convenable.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

La méthode de dissolution du chitosane dans le DMF anhydre suite au traitement par l'acide trifluoroacétique est une procédure facile et efficace pour solubiliser le chitosane. Le sel chitosane-TFA produit est soluble dans l'eau et dans quelques solvants organiques polaires tels le DMF, le méthanol, l'éthylène glycol et le DMSO. L'utilisation du sel de chitosane-TFA peut servir à la protection sélective des fonctions alcool primaires. Un des intérêts de l'utilisation de cette méthode est la suppression de la nucléophilicité de l'amine par protonation dans un milieu organique anhydre. Comme l'annulation de la nucléophilicité des fonctions amines est une réaction acide-base et ne fait pas appel à un groupe protecteur organique « classique », elle est non seulement très rapide, mais quantitative.

4.4 L'ION TRIFLUOACÉTATE EN TANT QUE GROUPE SORTANT

La présence d'un meilleur groupe sortant sur le réactif silylant permettrait une réaction de substitution donnant lieu à un meilleur rendement. D'ailleurs le DS obtenu pour la réaction de silylation à l'aide du TBDPS-TFA sur le chitosane-TFA est de 0,96 alors que l'utilisation du TBDPSCl sur le *N*-phtaloylchitosane a conduit à un DS de 0,86. En ne considérant que la qualité des groupes sortants (Cl^- *vs* CF_3COO^-) ce résultat n'a rien d'étonnant. En principe, l'efficacité d'un groupe sortant est proportionnelle à sa capacité d'attirer des électrons (Carey & Sundberg 1997 A). L'utilisation de l'ion trifluoroacétate en tant que groupe sortant est connue pour conduire à des vitesses de réactions qui sont plus de

deux fois supérieures à celles observées lors de l'utilisation de chlorure (Carey & Sundberg 1997 A, Noyce & Virgilio 1972). Notons néanmoins que d'autres facteurs que le groupe sortant du réactif silylant distinguent ces deux réactions, à savoir le substrat utilisé et l'homogénéité du milieu réactionnel.

Suite à la coordination de l'atome d'oxygène sur l'atome de silicium, le mécanisme probable impliquerait le transfert du proton de la fonction alcool vers le groupement trifluoroacétate pour produire l'acide trifluoroacétique. Rappelons que le TFA est un composé volatil qui peut être éliminé du milieu réactionnel. L'élimination d'un sous-produit peut agir en tant que force motrice pour des réactions régies par un équilibre chimique. Il est donc tout à fait plausible de s'attendre à une meilleure efficacité réactionnelle de la part du TBDPS-TFA comparativement au TBDPSCl.

La procédure de silylation a été effectuée sans l'emploi d'une base, comme l'imidazole; ce qui pourrait s'avérer une alternative intéressante aux procédures de silylation courantes. Il est opportun de noter que l'acide trifluoroacétique est plus économique que l'acide trifluorométhanesulfonique (acide triflique). L'anion de l'acide triflique (triflate) est fréquemment utilisé en synthèse organique pour son excellente capacité à stabiliser une charge négative ce qui en fait un excellent groupe sortant (Clayden, Greeves *et al.* 2000, Brückner 1999).

La détermination expérimentale par des méthodes électrochimiques des pK_a des molécules mentionnées dans le DMF serait d'un grand intérêt pour valider l'explication proposée des observations. L'étude des cinétiques de réaction de substitution avec l'emploi du groupe trifluoroacétate en tant que groupe sortant sur des biopolymères tel le chitosane permettrait aussi de vérifier certaines hypothèses avancées dans ce travail.

CHAPITRE 5 : CONCLUSION GÉNÉRALE

Les positions O-6 des unités pyranosyles du *N*-phtaloylchitosane ont été régiosélectivement protégées par l'introduction des groupes protecteurs TBDMS et TBDPS en conditions douces avec des DS voisins de 1,0. Ces nouveaux dérivés de chitosane ont été caractérisés avec succès par analyse élémentaire et par spectroscopies RMN ^{13}C et IR.

L'optimisation de ces réactions de protection, en fonction des DS obtenus, a été réalisée en étudiant l'influence des paramètres suivants : les proportions stœchiométriques, la température, le temps de réaction, le choix du solvant et de la base utilisés. Les DS les plus élevés ont été obtenus à température ambiante, en présence d'un excès de réactif silylant (≈ 5 équivalents) dans le DMF avec de l'imidazole en 48 h.

La protonation de la fonction amine du chitosane avec le TFA a été réalisée directement dans le DMF anhydre. Le sel de chitosane (chitosane-TFA) formé s'avère soluble dans l'eau et dans quelques solvants organiques tels le DMF, le méthanol et l'éthylène glycol. La protonation de la fonction amine estompe l'aptitude nucléophile de ce groupe fonctionnel et permet de subséquentes modifications des fonctions alcool du biopolymère.

Le sel chitosane-TFA a été utilisé pour développer une procédure monotope de protection régiosélective de l'alcool primaire du chitosane par le groupe TBDPS dans des

conditions douces et homogènes obtenant un DS de 0,96. Un parachèvement de la réaction impliquant une base minérale (NaOH) dissoute dans un mélange d'eau et d'éthanol permet d'obtenir un dérivé de chitosane dont seules les fonctions alcool primaires sont protégées.

Tous les dérivés silylés formés laissent la fonction alcool secondaire sur le carbone C3 intacte. Ce travail ouvre la voie à d'éventuelles modifications de ces dérivés pour le développement de nouveaux composés, comme des ligands bidentates chiraux, dont l'architecture de base demeurerait ce polysaccharide d'origine marine au grand potentiel qu'est le chitosane.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Andrade, M. M. & M. T. Barros (2004). «Facile conversion of *O*-silyl protected sugars into their corresponding formates using $POCl_3$ • DMF complex.» Tetrahedron **60** (41): 9235-9243.

Arumugam, P.; G. Karthikeyan, *et al.* (2004). «A mild, efficient, and inexpensive protocol for the selective deprotection of TBDMS ethers using $KHSO_4$.» Chemistry Letters **33** (9): 1146-1147.

Bartnicka, H.; I. Bojanowska, *et al.* (1991). «Solvent effect on the dissociation-constants of aliphatic carboxylic-acids.» Australian Journal of Chemistry **44** (8): 1077-1084.

Binette, A. & J. Gagnon (2007). «Regioselective silylation of N-phthaloylchitosan with TBDMS and TBDPS groups.» Biomacromolecules **8** (6): 1812-1815.

Bordwell, F. G. (1988). «Equilibrium acidities in dimethyl sulfoxide solution.» Accounts of Chemical Research **21** (12): 456-463.

Boulet, L.; F. Coulombe, *et al.* (2006). «La crevette. Analyse de l'industrie.» Québec, ministère de l'Agriculture, des Pêches et de l'Alimentation (Québec)**:** 94.

Braish, T. F. & P. L. Fuchs (1986). «KH / 18-crown-6 : A powerful base for the protection of hindered alcohols with *t*-butyldimethylsilylchloride.» Synthetic Communications **16**: 111-115.

Brückner, R. (1999). «Mécanismes réactionnels en chimie organique; Méthodes synthétiques, stéréochimie et réactions modernes» (trad. 1ière Éd. par Suffert J. & Suffert, J.-J.), Bruxelle, De Boeck Université.

Carey, F. A. & R. J. Sundberg (1996 A). «Chimie organique avancée; Tome 1. Structures moléculaires et mécanismes réactionnels.» 3ième Éd., Bruxelle, De Boeck Université.

Carey, F. A. & R. J. Sundberg (1996 B). «Chimie organique avancée; Tome 2. Réactions et synthèses.» 3ième Éd., Bruxelle, De Boeck Université.

Cho, Y. W.; J. Jang, *et al.* (2000). «Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins.» Biomacromolecules **1** (4): 609-614.

Clare, B. W.; D. Cook, *et al.* (1966). «Solvation of ions. IX.1 The effect of anion solvation on acid dissociation constants in methanol, water, dimethylformamide, and dimethyl sulfoxide.» Journal of the American Chemical Society **88** (9): 1911-1916.

Clayden, J.; N. Greeves, *et al.* (2001). Organic Chemistry. 1ière Éd., Oxford, Oxford University Press.

Collins, P. M. & R. J. Ferrier (1995). Monosaccharides: Their Chemistry and Their Roles in Natural Products. 1ière Éd., New York, John Wiley & Sons Ltd.

CRC Handbook of Chemistry and Physics (1999). 79ième Éd. (Éditeur en chef : D. R. Lide) Boca Raton, CRC Press.

Crouch, R. D. (2004). «Selective monodeprotection of bis-silyl ethers.» Tetrahedron **60** (28): 5833-5871.

Farras, J.; C. Serra, *et al.* (1998). «Cleavage of *tert*-butyldimethylsilyl ethers by chloride ion.» Tetrahedron Letters **39** (3-4): 327-330.

Firouzabadi, H.; S. Etemadi, *et al.* (1998). «Efficient and chemoselective protection of alcohols and phenols with *tert*-butyldimethylchlorosilane (TBDMCS) under solvent-free conditions.» Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements **143**: 45-51.

Focher, B.; A. Naggi, *et al.* (1992). «Chitosan from *Euphausia superba*. 2: Characterization of solid-state structure.» Carbohydrate Polymers **18** (1): 43-49.

Gagnon, J. Communication Personnelle.

Gopinath, R. & B. K. Patel (2000). «Tetrabutylammonium tribromide (TBATB)-MeOH: An efficient chemoselective reagent for the cleavage of *tert*-butyldimethylsilyl (TBDMS) ethers.» Organic Letters **2** (26): 4177-4180.

Greene, T. W. & P. G. M. Wuts (1999). Protective Groups in Organic Synthesis. 3ième Éd., New York, John Wiley & Sons Ltd.

Guibal, E. (2005). «Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: a review.» Progress in Polymer Science **30** (1): 71-109.

Holappa, J.; T. Nevalainen, *et al.* (2004). «Synthesis and characterization of chitosan *N*-betainates having various degrees of substitution.» Macromolecules **37** (8): 2784-2789.

Holappa, J.; T. Nevalainen, *et al.* (2005). «*N*-chloroacyl-*6*-*O*-triphenylmethylchitosans: Useful intermediates for synthetic modifications of chitosan.» Biomacromolecules **6** (2): 858-853.

Rapport-Gratuit.com

Jeuniaux, C. & M. F. Vossfoucart (1991). «Chitin biomass and production in the marine-environment.» Biochemical Systematics and Ecology **19** (5): 347-356.

Karimi, B.; A. Zamani, *et al.* (2004). «N-iodosuccinimide (NIS) as a mild and highly chemoselective catalyst for deprotection of *tert*-butyldimethylsilyl ethers.» Tetrahedron Letters **45**(49): 9139-9141.

Kawahara, M.; T. Yui, *et al.* (2003). «Fourth 3D structure of the chitosan molecule: Conformation of chitosan in its salts with medical organic acids having a phenyl group.» Bioscience Biotechnology and Biochemistry **67** (7): 1545-1550.

Kurita, K. (2001). «Controlled functionalization of the polysaccharide chitin.» Progress in Polymer Science **26** (9): 1921-1971.

Kurita, K.; M. Hirakawa, *et al.* (1999). «Silylated chitin: A new organosoluble precursor for facile modifications and film casting.» Chemistry Letters **28** (8): 771-772.

Kurita, K.; M. Hirakawa, *et al.* (2004). «Trimethylsilylation of chitosan and some properties of the product.» Carbohydrate Polymers **56** (3): 333-337.

Kurita, K.; H. Ikeda, *et al.* (2002). «Chemoselective protection of the amino groups of chitosan by controlled phthaloylation: Facile preparation of a precursor useful for chemical modifications.» Biomacromolecules **3** (1): 1-4.

Kurita, K.; K. Sugita, *et al.* (2005). «Preparation and evaluation of trimethylsilylated chitin as a versatile precursor for facile chemical modifications.» Biomacromolecules **6** (3): 1414-1418.

Kurita, K.; M. Uno, *et al.* (2000). «Regioselectivity in protection of chitosan with the phthaloyl group.» Chitin and Chitosan Research **6**: 43-50.

Liu, L.; Y. P. Li, *et al.* (2004). «Rapid N-phthaloylation of chitosan by microwave irradiation.» Carbohydrate Polymers **57** (1): 97-100.

Macquarrie, D. J. & J. J. E. Hardy (2005). «Applications of functionalized chitosan in catalysis.» Industrial & Engineering Chemistry Research **44** (23): 8499-8520.

Maran, F.; D. Celadon, *et al.* (1991). «Electrochemical determination of the pK_a of weak acids in *N,N*-dimethylformamide.» Journal of the American Chemical Society **113** (24): 9320-9329.

Matsuyama, H.; Y. Kitamura, *et al.* (1999). «Diffusive permeability of ionic solutes in charged chitosan membrane.» Journal of Applied Polymer Science **72** (3): 397-404.

Matthews, W. S.; J. E. Bares, *et al.* (1975). «Equilibrium acidities of carbon acids. VI. Establishment of an absolute scale of acidities in dimethylsulfoxide solution.» Journal of the American Chemical Society **97**: 7006 - 7014.

Mormann, W.; J. Demeter (1999). «Silylation of cellulose with hexamethyldisilazane in liquid ammonia - First examples of completely trimethylsilylated cellulose.» Macromolecules **32**: 1706-1710.

Muzzarrelli, R. A. A.; M. G. Peter, Eds. (1997). Chitin Handbook. Grottammare, Atec.

Nelson, T. D. & R. D. Crouch (1996). «Selective deprotection of silyl ethers.» Synthesis-Stuttgart (9): 1031-1069.

Nishimura, S. I.; O. Kohgo, *et al.* (1990). «Syntheses of novel chitosan derivatives soluble in organic-solvents by regioselective chemical modifications.» Chemistry Letters(2): 243-246.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Nishimura, S. I.; O. Kohgo, *et al.* (1991). «Chemospecific manipulations of a rigid polysaccharide - Syntheses of novel chitosan derivatives with excellent solubility in common organic-solvents by regioselective chemical modifications.» Macromolecules **24** (17): 4745-4748.

Noyce, D. S., & Virgilio, J. A. (1972) «Synthesis and solvolysis of 1-phenylethyl disubstituted phosphinates.» Journal of Organic Chemistry **37** (17) 2643-2647.

Okuyama, K.; K. Noguchi, *et al.* (2000). «Structural diversity of chitosan and its complexes.» Carbohydrate Polymers **41**(3): 237-247.

Park, J. W.; K.-H. Choi, *et al.* (1983). «Acid-Base equilibria and related propreties of chitosan.» Bulletin of Korean Chemical Society **4** (2): 68-72.

Perrin, D. D.; B. Dempsey, *et al.* (1981). pK_a Prediction for Organic Acids and Bases. London, Chapman and Hall.

Peter, M. G.(2002). «Chitin and Chitosan from Animal Sources» dans: Biopolymers; Volume 6; Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes. (Eds: E. J. Vandamme, S. De Baets, S. Steinbüchel) Weinheim, Wiley-VCH.

Petzold, K.; L. Einfeldt, *et al.* (2001). «Regioselective functionalization of starch: Synthesis and ^{1}H NMR characterization of *6-O*-silyl ethers.» Biomacromolecules **2** (3): 965-969.

Prashanth, K. V. H.; F. S. Kittur, *et al.* (2002). «Solid state structure of chitosan prepared under different *N*-deacetylating conditions.» Carbohydrate Polymers **50** (1): 27-33.

Ravi Kumar, M. N. V. (2000). «A review of chitin and chitosan applications.» Reactive & Functional Polymers **46** (1): 1-27.

Ravi Kumar, M. N. V.; R. A. A. Muzzarelli, *et al.* (2004). «Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives.» Chemical Reviews **104** (12): 6017-6084.

Roberts, G. A. F. (1992). Chitin Chemistry. London, MacMillan.

Sashiwa, H.; N. Kawasaki, *et al.* (2002 A). «Chemical modification of chitosan. 14: Synthesis of water-soluble chitosan derivatives by simple acetylation.» Biomacromolecules **3** (5): 1126-1128.

Sashiwa, H.; N. Kawasaki, *et al.* (2002 B). «Dissolution of chitosan in hexafluoro-2-propanol.» Chitin and Chitosan Research **8**: 249-251.

Sashiwa, H.; Y. Shigemasa, *et al.* (2000 A). «Dissolution of chitosan in dimethylsulfoxide by salt formation.» Chemistry Letters(6): 596-597.

Sashiwa, H.; Y. Shigemasa, *et al.* (2000 B). «Chemical modifications of chitosan. Part 5 - Homogeneous *N,O*-acylation of chitosan in dimethylsulfoxide with cyclic acid anhydrides.» Chemistry Letters(10): 1186-1187.

Sharma, G. V. M.; B. Srinivas, *et al.* (2003). «A facile zirconium(IV) chloride catalysed selective deprotection of t-butyldimethylsilyl (TBDMS) ethers.» Tetrahedron Letters **44** (25): 4689-4691.

Solomons, T. W. G. ; C. B. Fryhle (2000). Chimie organique (trad. de la 7ième Éd., adap. de N. Voyer). Montréal, Modulo Éditeur.

Srinivasa, P. C. & R. N. Tharanathan (2007). «Chitin/chitosan - Safe, ecofriendly packaging materials with multiple potential uses.» Food Reviews International **23** (1): 53-72.

Synowiecki, J. & N. A. Al-Khateeb (2003). «Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives.» Critical Reviews in Food Science and Nutrition **43** (2): 145-171.

Tanner, S. F.; H. Chanzy, *et al.* (1990). «High-resolution solid-state ^{13}C nuclear-magnetic-resonance study of chitin.» Macromolecules **23** (15): 3576-3583.