

Verena Kaltenhauser

**Potentielle neue antimikrobielle
Verbindungen**

MASTERARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades einer
Diplom-Ingenieurin

der Studienrichtung Technische Chemie
erreicht an der

Technischen Universität Graz

Dipl.-Chem. Univ. Ass. Dr. rer.nat. Frank Wiesbrock
Institut für Chemische Technologie von Materialien
Technische Universität Graz

2010

Inhaltsverzeichnis

I	EINLEITUNG	1
II	AUFGABENSTELLUNG	3
III	BISHERIGER KENNTNISSTAND.....	5
1	Die Zelle.....	5
1.1	Struktur von Prokaryoten	5
1.2	Bakterielle Zellwand.....	7
2	Bildung von Biofilmen	12
3	Antimikrobielle Systeme.....	14
3.1	Antimikrobieller Effekt	15
3.2	Niedermolekulare antibakterielle Wirkstoffe.....	16
3.3	Mikrobiozide Materialmodifikationen.....	17
3.4	Antibakterielle Polymersysteme.....	18
4	Die ionische Polymerisation der 2-Oxazoline.....	24
4.1	2-Oxazoline.....	24
4.2	Polymerisationsmechanismus der 2-Oxazoline	25
4.3	Poly(2-Oxazolin)e als antimikrobielle Verbindungen.....	27
4.4	Mikrowellen unterstützte Polymerisation.....	28
IV	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	32
1	Einleitung	32
2	Partielle Hydrolyse von PEtOx und Charakterisierung der resultierenden Copolymere.....	33
2.1	Kinetik der Hydrolyse des Poly(2-Ethyl-2-oxazolin)s	33
2.2	Charakterisierung.....	36
3	Partielle Hydrolyse von PNonOx und Charakterisierung der resultierenden Copolymere.....	45

3.1	Kinetik der Hydrolyse des Poly(2-Nonyl-2-oxazolin)s	45
3.2	Charakterisierung.....	47
4	Vergleich der Hydrolyse von PEtOx mit PNonOx sowie der korrespondierenden Copolymere.....	54
4.1	Hydrolyse	54
4.2	DSC-Vergleich	54
4.3	TA-Vergleich	55
5	Gegenionenaustausch des protonierten Polyamin.....	56
5.1	Rücktitration mit HCl	56
5.2	Gegenionenaustausch mit H ₂ SO ₄	56
6	Antibakterieller Test mit Life/Dead Kit.....	58
V	ZUSAMMENFASSUNG	60
VI	ABSTRACT	63
VII	EXPERIMENTELLER TEIL.....	66
1	Geräte.....	66
1.1	Nuclear Magnetic Resonance NMR.....	66
1.2	Thermoanalyse TA.....	66
1.3	Differential Scanning Calorimetry DSC	66
1.4	Antimikrobielle Bestimmungen.....	66
1.5	Mikrowellenreaktor.....	67
2	Chemikalien/Materialien.....	67
3	Synthese	68
3.1	Synthese von Poly(2-Ethyl-2-oxazolin)	68
3.2	Synthese Poly(2-Ethyl-2-oxazolin)-co-(Aziridinium Chlorid)	68
3.3	Synthese von Poly(2-Ethyl-2-oxazolin)-co-(Aziridin)	68
3.4	Synthese von Poly(2-Nonyl-2-oxazolin)	69
3.5	Synthese Poly(2-Nonyl-2-oxazolin)-co-(Aziridinium Chlorid)	70
3.6	Gegenionenaustausch vom protonierten Polyamin	71
4	Antibakterielle Tests.....	72

4.1	Probenvorbereitung	72
4.2	Antibakterielle Tests.....	72
VIII	DANKSAGUNG	73
IX	LITERATUR.....	74

I Einleitung

Im täglichen Leben ist der Mensch in ständigem Kontakt mit Mikroorganismen. Zahlreiche Mikroben leben auf und im menschlichen Körper, und bilden so die reguläre Mikroflora. Die meisten Mikroorganismen sind harmlos; für viele gibt es nützliche Anwendungen. In diese Kategorie fällt die Produktion von Milchprodukten wie Käse, Joghurt und Buttermilch, aber auch die Herstellung von anderen Produkten wie Backwaren und alkoholischen Getränken, die ohne Mikroorganismen, in diesen Fällen ohne Fermentationsaktivität der Hefe, nicht möglich wären. Mikrobielle Gärungsprozesse spielen auch in der Energiegewinnung eine wichtige Rolle. So sind phototrophe Mikroorganismen zum Beispiel in der Lage, mit Hilfe von Lichtenergie Biomasse zu produzieren, die zur Energiegewinnung eingesetzt werden kann. Weiters gibt es Bakterien, die biologisch abbaubare Kunststoffe produzieren, welche zum Beispiel als Implantatmaterial verwendet werden können. Bestimmte Mikroorganismen können auch zur biologischen Sanierung eingesetzt werden, indem man sie dazu verwendet, ausgelaufenes Öl, Lösungsmittel, Pestizide und andere Umweltgifte abzubauen. Viele Arzneimittel, wie zum Beispiel Antibiotika und Insulin können mit Hilfe von Mikroorganismen hergestellt werden.

Es gibt aber auch schädliche Mikroorganismen, die Pathogene genannt werden. Diese versuchen, in den Körper eines Wirts einzudringen, ihn zu kolonialisieren und zu schädigen. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts waren Infektionskrankheiten die am häufigsten indizierte Todesursache, heute haben sie in den meisten Industrieländern nur geringe Bedeutung. Dies ist auf das umfassende Verständnis der Krankheitsverläufe, die verbesserten hygienischen Bedingungen und die Entdeckung und Anwendung von antimikrobiellen Verbindungen zurückzuführen. Dennoch sind pathogene Bakterien auch heute noch eine große Bedrohung; insbesondere in den Entwicklungsländern sind Infektionskrankheiten von großer Bedeutung und viele Menschen sterben nach wie vor an Malaria, Tuberkulose, Cholera oder einfachen Durchfallerkrankungen.¹ Die meisten Infektionskrankheiten werden

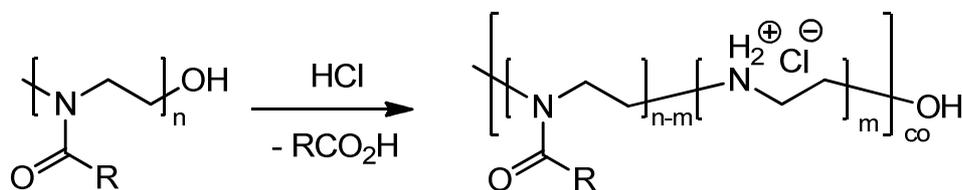
in Entwicklungsländern durch Wasser verbreitet. Die Weltgesundheitsorganisation berichtet, dass alle acht Sekunden ein Kind an einer Infektionskrankheit stirbt, die durch Wasser übertragen wurde. Jedes Jahr sterben mehr als 5 Millionen Menschen aufgrund von Krankheiten, die durch schmutziges Trinkwasser oder ungenügend aufbereitetes Wasser übertragen werden.²

Hieraus ergibt sich die Motivation, weiter auf dem Gebiet antimikrobieller Agenzien zu forschen. Von besonderem Interesse ist hierbei die Klasse der antimikrobiellen Polymere, die unter anderem im Bereich der Trinkwasserversorgung eingesetzt werden können. Die Beschichtung von Wasserrohren mit langzeitstabilen und -aktiven Polymeren, die als Kontaktbiozide wirken, ist eine mögliche Strategie, um die Ansiedlung und Vermehrung der Bakterien in den Rohren zu verhindern, sodass eine bessere Trinkwasserqualität gewährleistet werden kann.

II Aufgabenstellung

Am Institut für Chemische Technologie von Materialien (ICTM) wurde in den letzten Jahren intensiv auf dem Gebiet der kontaktaktiven, bioziden Polymere geforscht. Unter anderem wurde die hohe biozide Aktivität des protonierten, vollständig hydrolysierten Poly(2-Ethyl-2-oxazolin)s nachgewiesen.³

Ziel dieser Diplomarbeit war es, Poly(2-Oxazolin)e partiell zu hydrolysieren (Schema II-1), um den Einfluss der Seitenketten sowie der Länge der Seitenketten auf die thermische Stabilität und die antimikrobielle Aktivität zu testen.



Schema II-1: Partielle Hydrolyse von Poly(2-Oxazolin)en.

Dazu mussten zuerst die Synthesebedingungen sowie die Isolation der resultierenden Copolymere definiert und in weiterer Folge optimiert werden, sodass ein leichter Transfer auf einen 100 g Pilot-Maßstab möglich ist. Weiters sollten thermoanalytische Bestimmungen durchgeführt werden um die Stabilität der Copolymere zu bestimmen. Abschließend sollte die biozide Aktivität ausgewählter Copolymere mit einem Schnelltest bestimmt werden.

Für diese Untersuchung wurden die Hydrolyseprodukte von Poly(2-Ethyl-2-oxazolin) (PEtOx) und Poly(2-Nonyl-2-oxazolin) (PNonOx) gewählt.

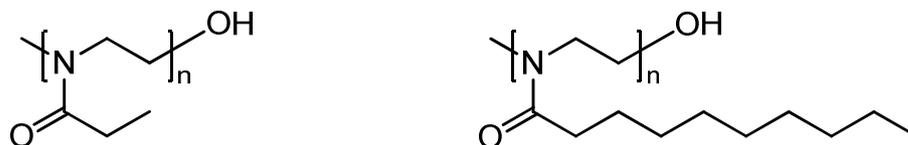


Abb. II-1: Strukturen der Ausgangspolymere PEtOx (links) und PNonOx (rechts).

PEtOx wurde gewählt, da das Monomer 2-Ethyl-2-oxazolin kostengünstig kommerziell erhältlich ist; PNonOx wurde aufgrund seiner längeren Kette und den damit verbundenen speziellen Eigenschaften herangezogen: Hierbei

waren insbesondere die Oberflächenenergien der korrespondierenden Copolymerfilme von entscheidendem Interesse, da diese im Falle des PNonOx niedriger sind als die ähnlicher Poly(2-Oxazolin)e (Abb.II-2),⁴ sodass das Anhaften von Bakterien erschwert und somit die Biofilmbildung unterdrückt wird („Anti-fouling“).

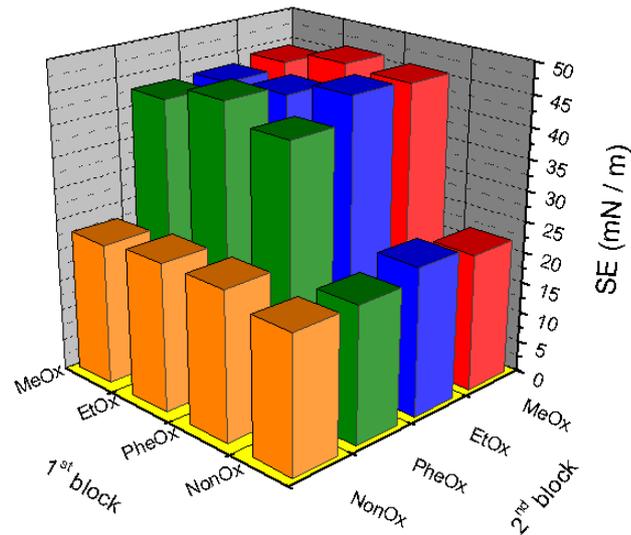


Abb. II-2: Oberflächenenergien von Poly(2-oxazolin)en.⁴

Für den eventuellen Einsatz in Wasserrohren ist besonders bemerkenswert, dass PEtOx und PNonOx bereits von der Food and Drug Administration (FDA) auf ihre Biokompatibilität hin getestet und als Konservierungsmittel zugelassen worden sind.

III Bisheriger Kenntnisstand

1 Die Zelle

Das Leben beruht auf einer morphologischen Einheit, den Zellen. Diese können in zwei Klassen eingeteilt werden, einerseits die Prokaryoten, welche alle Typen von Bakterien umfassen und eine einfache und ausnahmslos einzellige Struktur besitzen, und andererseits die Eukaryoten, die ein- und mehrzellig vorliegen können.

In dieser Arbeit wird der Typ der Prokaryoten beschrieben, um den Aufbau von Bakterien besser verständlich zu machen.

Die Prokaryoten sind die weitverbreitetsten Organismen auf der Erde; sie besitzen einen variablen und hochangepassten Metabolismus, wodurch sie viele verschiedene Lebensräume nutzen können. Bestimmte Typen von Bakterien wachsen sogar in unüblicher chemischer Umgebung, wie z.B. bei hohen Temperaturen bis zu 115 °C und/oder unter sauerstoffarmen Bedingungen. Darüber hinaus besitzen sie sehr schnelle Reproduktionsraten von weniger als 20 min pro Zellteilung bei vielen Spezies. Diese ermöglichen vielen Bakterien die Bildung resistenter Sporen, wodurch sie sogar unter formal ungünstigen Bedingungen bestehen können.⁵

1.1 Struktur von Prokaryoten

Prokaryoten sind 1-10 µm groß, und können in drei Grundformen vorkommen: sphärisch, stangenähnlich oder Helix-artig.

Sie sind von einer ca. 70 Å dicken Zellwand umgeben (Plasmamembran), die aus Lipiddoppelschichten besteht. Diese beinhalten verankerte Proteine, die den Transport von Molekülen nach innen und nach außen kontrollieren sowie eine Vielzahl an Reaktionen katalysieren.

Die Zellen der meisten Prokaryoten sind von einer steifen 30-250 Å dicken Polysaccharidschicht umgeben, um Zelllysis in verdünnten osmotischen Medien zu verhindern. Einige Bakterien ummanteln sich selbst mit einer gelatineartigen Polysaccharidkapsel, die sie vor den Angriffen exogener Organismen schützt.

Die Plasmamembran der Prokaryoten kann gefaltet werden, sodass sie Multilayer-Strukturen aufweist, die Mesosomen genannt werden. Mesosomen dienen zum Schutz der DNA Replikation und anderer enzyspezifischer Reaktionen.

Der Zellinhalt, das Cytoplasma, besitzt ein einziges chromosomales Molekül, das Nukleoid, und beinhaltet weiters viele Arten der RNA, lösliche Enzyme und Ribosomen. Viele Bakterien besitzen zur Fortbewegung sogenannte Flagella: Hierbei handelt es sich um schlangenartige Schwänzchen. (Abb.III-1).⁵

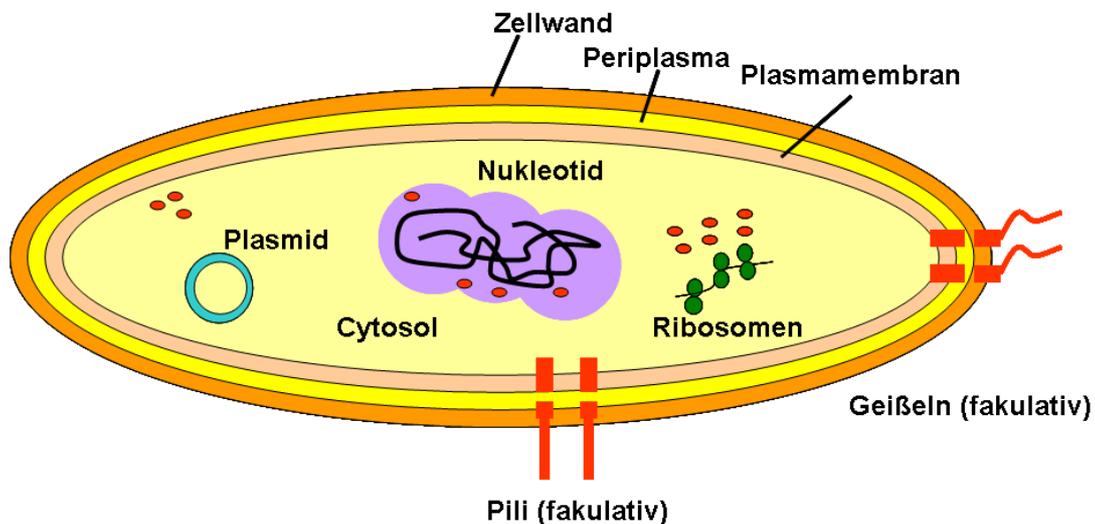


Abb. III-1: Schematischer Aufbau der prokaryotischen Zelle.

Es gibt verschiedene Arten von Prokaryoten. Autotrophe Bakterien benötigen nur einfache Moleküle wie H_2O , CO_2 , NH_3 und H_2S als Nährmedien. Chemolithotrophe Bakterien gewinnen Energie aus der Oxidation anorganischer Verbindungen wie zum Beispiel NH_3 und H_2S . Photoautotrophe Bakterien sind eine Untergruppe der autotrophen Bakterien und gewinnen Energie aus der Photosynthese. Heterotrophe Bakterien wiederum gewinnen die benötigte Energie durch die Oxidation von organischen Verbindungen. Weiters kann man Prokaryoten aufgrund ihres Sauerstoffsbedarfs einteilen. Obligat aerobe Bakterien brauchen Sauerstoff zum Überleben, während anaerobe Bakterien auch Sulfate und Nitrate verwenden können. Obligate anaerobe Bakterien hingegen werden in der Gegenwart von Sauerstoff abgetötet.

Es gibt drei Hauptgruppen von Prokaryoten: Mycoplasma-Bakterien, grampositive Bakterien und gramnegative Bakterien.

Den Mycoplasma-Bakterien fehlt die steife Zellwand von anderen Prokaryoten. Sie sind die kleinsten lebenden Zellen (0.12 µm Durchmesser) und besitzen ca. 20% der DNA der E. coli. Diese Menge an DNA entspricht in etwa der geringsten Menge an DNA, die für die Zelle lebensnotwendig ist. Grampositive und gramnegative Bakterien unterscheiden sich aufgrund ihrer vorhandenen oder nicht vorhandenen Gramfärbung.⁵ Nach der Gramfärbung färben sich grampositive Bakterien violett und gramnegative rot. Die unterschiedliche Reaktion der Zellen auf die Gramfärbung hängt mit dem unterschiedlichen Aufbau der Zellwand beider Bakterien zusammen, der in Abschnitt 1.2 näher beschrieben wird. Der unterschiedliche Aufbau führt dazu, dass gramnegative Zellen durch Ethanol entfärbt werden, grampositive Zellen jedoch nicht (Abb. III-2).⁶

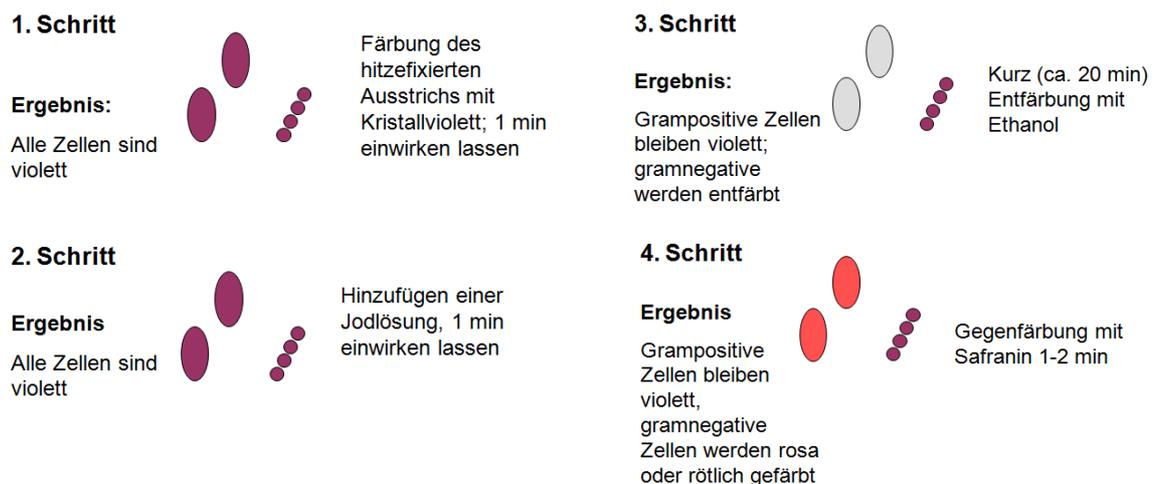


Abb. III-2: Versuchsablauf bei der Gramfärbung.⁶

1.2 Bakterielle Zellwand

Bakterien sind umgeben von einer steifen Zellwand, die ihnen ihre charakteristische Form verleiht und ihnen ermöglicht, in hypertonischer Umgebung, also in einem Milieu mit geringerer Salzkonzentration als in der Zelle, zu leben. Ohne diese Schicht würde die Zelle bis zur Zelllyse osmotisch anschwellen.

Bakterielle Zellwände sind von medizinischer Bedeutung, weil sie für die bakterielle Virulenz verantwortlich sind. Symptome von vielen bakteriellen Erkrankungen können durch Injektion von bakteriellen Zellwänden bei Tieren

hervorgerufen werden. Darüber hinaus sind die charakteristischen Antigene der Bakterien Komponenten der Zellwände, sodass durch Injektion dieser Zellwände die Immunität erweckt wird.

Wie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt, werden Bakterien in grampositive und gramnegative Vertreter unterteilt. Grampositive Bakterien besitzen eine direkte Zellwand ($\sim 250 \text{ \AA}$) um die Plasmamembran, während gramnegative Bakterien von einer dünneren Zellwand ($\sim 30 \text{ \AA}$) umgeben sind, die dann allerdings wieder von einer komplexen äußeren Membran überdeckt wird (Abb.III-3). Die Zellwände von grampositiven und gramnegativen Bakterien bestehen aus kovalent verbundenen Polysaccharid- und Polypeptid-Ketten, die die Zelle komplett einschließen. Dieses Gerüst wird Peptidoglycangerüst oder Murein genannt.⁷

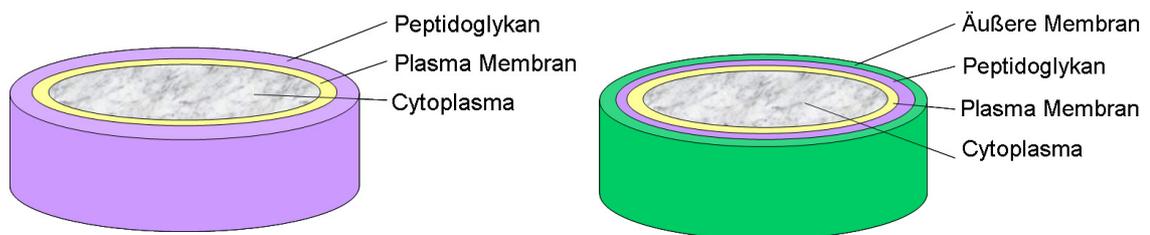


Abb. III-3: Aufbau einer grampositiven Zelle (links) und einer gramnegativen Zelle (rechts).

1.2.1 Cytoplasmamembran

Die Cytoplasmamembran ist ca. 8 nm dick und trennt die innere Zelle von ihrer Umgebung. Durch eine Beschädigung dieser Membran wird der Zusammenhalt der Zelle zerstört, wodurch das Cytoplasma ausläuft und die Zelle stirbt. Weiters dient die Membran als selektive Permeabilitätsbarriere: Einerseits können spezifische Metabolite konzentriert, andererseits Abfallprodukte ausgeschieden werden.

Die Cytoplasmamembran besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht. Die Phospholipide (Abb. III-4) bestehen aus einer hydrophoben Fettsäuren- und einer hydrophilen Glycerinphosphat-Komponente.⁷

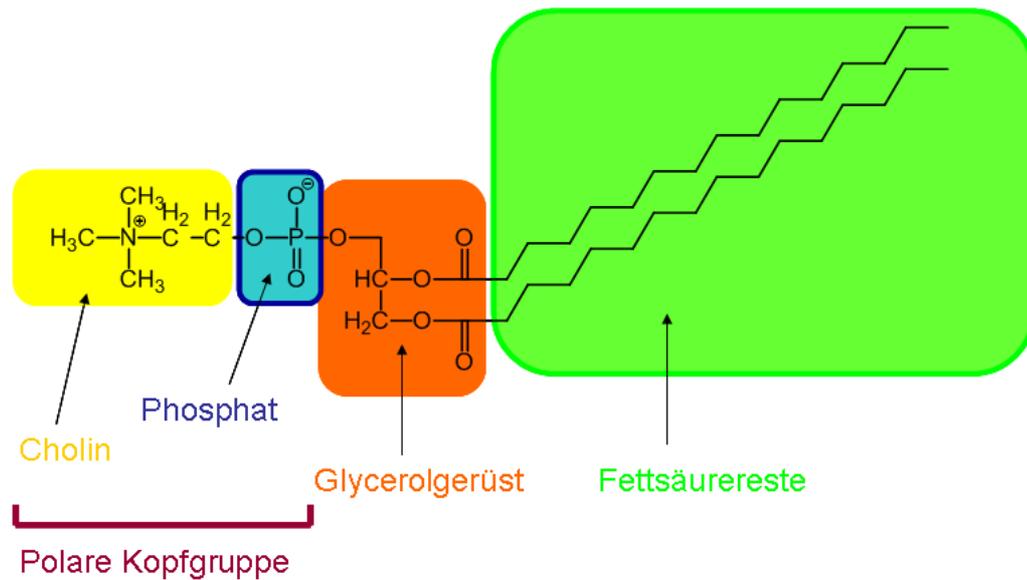


Abb. III-4: Ein Phospholipid besteht aus den abgebildeten vier Hauptkomponenten.

Durch die Aggregation in wässriger Lösung bilden sich spontan Doppelschichten aus. Die Fettsäuren richten sich in den Doppelschichten nach innen aus, wodurch eine hydrophobe Umgebung gebildet wird. Die gesamte Struktur der Cytoplasmamembran wird durch Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert. Weiters tragen Kationen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} zur Stabilisierung bei, indem sie mit den negativen Ladungen der Phospholipide Ionenbindungen ausbilden.

Es gibt zwei Arten von Proteinen, die in der Membran vorkommen. Die integralen Membranproteine sind fest in die Membran integriert, während es sich bei den peripheren Membranproteinen um Lipoproteine handelt, die am Aminoende einen Lipidschwanz besitzen, der das Protein in der Membran verankert. Die Cytoplasmamembran dient nicht nur als Permeabilitätsbarriere und Aufenthaltsort vieler Proteine, sondern ist auch der wichtigste Ort der Energiespeicherung.⁷

1.2.2 Peptidoglykan

Zellen beinhalten eine hohe Konzentration an gelösten Stoffen, wodurch sich ein hydrostatischer Druck ausbildet, der bei *E. coli* ca. 2 atm beträgt. Um diesem Druck Stand zu halten, benötigen sie Zellwände; weiters verleihen diese der Zelle auch ihre Form und Stabilität.

Die Zellwände besitzen eine starre Schicht, die für die mechanischen Eigenschaften verantwortlich ist.

Die Zellwand ist aus Peptidoglycan (Abb: III-5), einem Polysaccharid, das aus zwei Zuckerderivaten besteht, aufgebaut. Die Derivate sind *N*-Acetylglucosamin und *N*-Acetylmuraminsäure, weiters sind im Peptidoglycan noch eine geringe Anzahl an Aminosäuren enthalten. Diese Bestandteile sind zu einer sich wiederholenden Struktur verbunden, die man Glykantetrapeptid nennt.

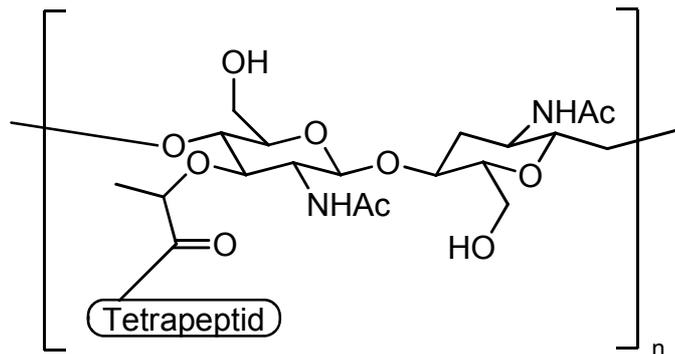


Abb. III-5: Schematischer Aufbau des Peptidoglycans.

Die Grundstruktur des Peptidoglycans ist aus einzelnen, nebeneinanderliegenden Peptidoglycansträngen aufgebaut, die durch Tetrapeptidquervernetzungen verknüpft sind. Die Quervernetzungen liegen je nach Bakterium in verschiedenen Ausprägungen vor. Je komplexer die Quervernetzung ist, desto größer ist die Festigkeit.

Bei grampositiven Bakterien bestehen ca. 90% der Zellwand aus Peptidoglycan, während bei gramnegativen Zellen die Peptidoglykanschicht nur ca. 10% der Zellwand ausmacht; der Großteil besteht aus einer komplexeren äußeren Membran.

In der Zellwand der grampositiven Zellen sind säurehaltige Substanzen eingebettet, die Teichonsäuren (Abb: III-6), also die Wand-, Membran- und Kapselpolymere, die Glycerolphosphate oder Ribitolphosphatreste enthalten. Die Teichonsäuren sind negativ geladen und daher auch zum Teil für die negative Ladung der gesamten Zelloberfläche verantwortlich. Einige von ihnen sind kovalent an die Membranlipide gebunden, diese werden Lipoteichonsäuren genannt.

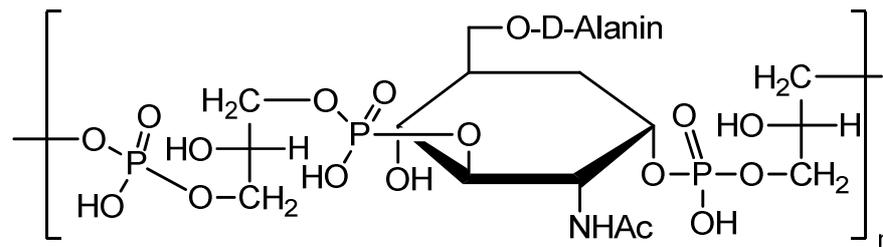


Abb. III-6: Strukturbeispiel einer Teichonsäure.

Die gramnegativen Bakterien besitzen noch eine äußere Membran, sozusagen eine zweite Lipidschicht, die aus Lipopolysacchariden, Proteinen und Lipoproteinen aufgebaut ist. Die Lipide und die Polysaccharide sind in der äußeren Membran verknüpft und bilden einen Lipopolysaccharidkomplex (LPS). Porine sind Proteine und sind für die Permeabilität der äußeren Membran verantwortlich. Das Periplasma ist der Raum zwischen den Membranen. Es enthält viele verschiedene Proteine, die bei wichtigen Zellfunktionen mitwirken.⁸

2 Bildung von Biofilmen

Die antimikrobielle Aktivität von Stoffen, also die vermittelte Tötung von Mikroorganismen, ist von genereller Bedeutung für hygienische Oberflächen. Bei Biofilmen handelt es sich um die Ablagerung von abgetöteter Biomasse auf Oberflächen. Diese Filme bestehen hauptsächlich aus Wasser, Polysacchariden, Zellfragmenten, toten Mikroorganismen und anderen Komponenten. Da diese Biofilme ideale Lebensräume für Bakterien darstellen, ist sowohl die Bildung als auch die Anlagerung von ihnen auf Substraten unerwünscht. Antimikrobielle Eigenschaften von Oberflächen reduzieren nicht unbedingt die Entstehung von Biofilmen, sondern können sie im Gegenteil begünstigen. Neben der Fähigkeit, Mikroorganismen zu töten, spielt auch die Rauigkeit, die Polarität und die Hydrophilie der Oberflächen eine wichtige Rolle, um die Biofilmbildung zu verhindern.⁹

Mikroben in Biofilmen produzieren eine Matrix aus Biopolymeren, wodurch sie sehr gut zusammengehalten werden. Diese Matrix besteht überwiegend aus Polysacchariden, Proteinen und DNA und dient zur strukturellen Stabilität, also auch zum Schutz der Mikroben.

Die Bildung von Biofilmen wird durch frei bewegliche Bakterien initiiert, die sich zuerst an den Oberflächen anhaften. In diesem Stadium sind die Bakterien noch sehr anfällig auf Antibiotika, infolge dessen also auch auf Bakterizide. Im nächsten Schritt erfolgt die irreversible Bindung an die Oberfläche. Die Bakterien vermehren sich unter Bildung von Mikrokolonien, wobei die Polymermatrix um diese Kolonien herum produziert wird. Die Biofilme werden höher; es können Dicken von bis zu 50 µm erreicht werden. In diesem Stadium tritt die maximale Toleranz (= Resistenz) gegenüber Antibiotika auf. Zu einem späteren Zeitpunkt können sich auch Kernflächen von solchen Biofilmen lösen, wodurch die Bakterienzellen befreit werden und sie die Möglichkeit haben, an anderen Orten neue Kolonien zu bilden. In-vitro-Untersuchungen von Biofilmen haben gezeigt, dass die Sauerstoffkonzentration an der Oberfläche der Filme hoch ist, im Inneren jedoch gering, sodass eher anaerobe Bedingungen vorherrschen. Auch das Wachstum, die Proteinsynthese und die metabolische Aktivität finden in Biofilmen geschichtet statt. Das führt folglich zu einer hohen Aktivität an der

Oberfläche und langsamen oder keinem Wachstum im Zentrum, was eine der Erklärungen dafür ist, dass Biofilme weniger anfällig auf Antibiotika sind¹⁰. Dementsprechend zeigt ein antimikrobielles Polymer, welches zwar die untersten Schichten der Bakterien tötet, in dieser Schicht keine antibakterielle Wirkung. Um eine bessere längerfristige Wirkung zu erzielen, muss also die Ausbildung eines Biofilms bzw. das Anlagern von Bakterien verhindert werden (Abb. III-7).

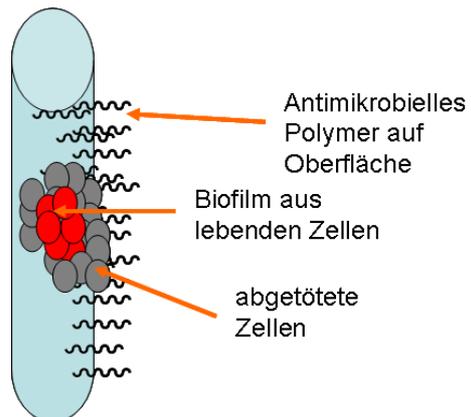


Abb. III-7: Biofilmbildung auf mit herkömmlichen antimikrobiellen Polymeren modifizierter Oberfläche.

3 Antimikrobielle Systeme

Es gibt diverse Gründe für noch immer bestehende bakterielle Infektionen und deren Ausbreitung. Bakterien überleben aufgrund ihrer dicken, komplexen Schutzschicht unter extremen Bedingungen wie z.B. Hitze, Kälte, Strahlung oder Trockenheit, was durch ihr Zusammenleben und -arbeiten in Biofilmen zusätzlich begünstigt wird. Sie wachsen schnell mit enorm hohen Reproduktionsraten und vielen Evolutionszyklen und stellen lebende, anpassungsfähige Organismen dar, die mit ihrer Umwelt interagieren und auf diese auch reagieren, z.B. in Form von Entwicklung von Verteidigungsstrategien gegen feindliche Stoffe. Aus diesen Gründen wird ersichtlich, welche große Herausforderung und Komplexität die Entwicklung von antibakteriellen Verbindungen und Systemen in sich birgt.¹¹

In der globalen Welt kommt es zu einer immer schnelleren Verbreitung von Krankheiten, wodurch die Notwendigkeit immer hygienischerer Lebensbedingungen begünstigt ist. Es werden neue Antibiotika, Biozide und dauerhaft sterile Materialien entwickelt.¹²

Von vielen Materialien wird erwartet, dass sie antimikrobielle Eigenschaften aufweisen. Meistens werden die Materialien mit Bioziden imprägniert, die dann freigesetzt werden und Mikroorganismen töten.^{13,14} Ein Nachteil dieser Systeme ist, dass durch die konstante und oft unnötige Freisetzung von Bioziden resistente Mikroben entwickelt werden, was eines der größten Probleme in der Medizin darstellt.^{14,15} Ein weiterer Nachteil ist, dass durch die Freisetzung von Bioziden die Umwelt kontaminiert wird, und dass die antimikrobielle Aktivitäten der Systeme stetig nachlässt.¹⁴

Antimikrobielle Polymere sind wichtige Alternativen zu niedermolekularen Bioziden. Sie lassen sich einerseits als Additive mit niedrigem Gasdruck einsetzen, andererseits als Beschichtungen, die die Mikroben durch Kontakt töten, und nicht durch Freisetzung von Chemikalien.^{12,16}

In der Literatur ist beschrieben, dass antimikrobielle Polymere nicht nur in Summe der bioaktiven Funktionen der Monomere reagieren, sondern auch anders als diese niedermolekularen Gruppen.^{12,17}

Die Entwicklung von antimikrobiellen Polymeren fing mit der Polymerisation von niedermolekularen Bioziden an.¹⁸

3.1 Antimikrobieller Effekt

Biozide können bakteriostatische und bakterizide Effekte ausüben. Bakteriostatische Effekte werden meistens durch metabolische Verletzungen ausgelöst, die reversibel sind, wenn man das Biozid wieder entfernt oder neutralisiert. Bakterizide Effekte hingegen sind irreversibel. Biozide können an unterschiedlichen Stellen der Zelle angreifen. Mögliche Wirkungsziele sind bei gramnegativen Zellen die Zellwand (Peptidoglykan und LPS), bei grampositiven Zellen die Cytoplasmamembran und das Cytoplasma. Zuerst dringt das Biozid in die Zelle ein und zerstört sie. Der Vorgang wird durch die Migration des Biozides von der wässrigen Phase zur Zelloberfläche initiiert und wird von den physiochemischen Eigenschaften von der Zelle und des Biozides reguliert. Der biozide Effekt tritt sofort in Kraft, wenn das Biozid erfolgreich mit dem jeweiligen Ziel interagiert ist. Hier gibt es allerdings Unterschiede zwischen den Zellen, da gramnegative Zellen mit der LPS Schicht eine zusätzliche Barriere aufweisen, die grampositive Zellen nicht besitzen. Diese Struktur nimmt einen wesentlichen Einfluss auf die Eindringtiefe. Durch die Einführung bestimmter Substanzen, wie zum Beispiel Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), kann die Permeabilität der äußeren Membran von gramnegativen Zellen verbessert werden.

Auch Faktoren wie der pH-Wert, welche die Chemie des Biozides und/oder die mikrobielle Physiochemie beeinflussen, üben einen Einfluss auf die Wechselwirkung des Biozides mit der Zelle aus. Schwache Säuren sind deshalb am reaktivsten bei pH-Werten unterhalb ihres pKa-Werts, während kationische Oberflächen am besten bei pH-Werten wirken, welche die negative Oberflächenladung des Bakteriums sicherstellen.

Biozide können nach unterschiedlichen Gesichtspunkten unterteilt werden, zum Beispiel nach ihrem Wirkungsort oder nach ihrem Wirkmechanismus.¹⁹

3.2 *Niedermolekulare antibakterielle Wirkstoffe*

3.2.1 *Antibiotika*

Das Wort Antibiotikum ist aus dem Altgriechischen abgeleitet: $\acute{\alpha}\nu\tau\acute{\iota}$ = gegen, $\beta\acute{\iota}\omicron\varsigma$ = Leben.

Antibiotika sind dementsprechend Verbindungen, die in den Stoffwechsel von Bakterien eingreifen und diese dadurch entweder am Wachstum hindern (bakteriostatische Wirkung) oder abtöten (bakterizide Wirkung), wobei beides in letzter Konsequenz zum Zelltod führt.²⁰

Der Begriff Antibiotika wurde ursprünglich nur für natürlich entstehende Stoffwechselprodukte von Pilzen und Bakterien verwendet.²¹ Heute fallen unter diesen Begriff auch Derivate der Naturstoffe oder künstliche, auf synthetischem oder gentechnischem Weg hergestellte Wirkstoffe.

Die Modifizierung von Antibiotika ist sehr wichtig, um deren Wirksamkeit trotz der Ausbildung von Resistenzen zu erhalten. Antibiotika werden in unterschiedliche Klassen, je nach Wirkmechanismus- und orten eingeteilt.²²

3.2.2 *Antiseptika und Desinfektionsmittel*

Diese Mittel dienen dazu, den Befall mit Bakterien, deren Verbreitung, und daraus resultierende Infektionen zu verhindern.

Unter den Begriff Antiseptika fallen Substanzen, die zur Abtötung bzw. Wachstumsinhibition von Bakterien auf lebendem Gewebe dienen, während Desinfektionsmittel eher auf unbelebten Objekten eingesetzt werden.

Weitere wichtige Begriffe sind die Sterilisierung und die Konservierung, wobei erstere die vollständige Zerstörung oder Beseitigung jeglicher Mikroorganismen durch physikalische oder chemische Prozesse beschreibt. Mit dem zweiten Begriff der Konservierung wird die Verhinderung der Vermehrung von Mikroorganismen in beispielsweise Nahrungsmitteln oder Medikamenten beschrieben.

Eine bedeutende Verbindungsklasse solcher antimikrobiellen Systeme sind quaternäre Ammoniumverbindungen, deren bakterizide Wirkung bekannt ist und in folgende Teilprozessschritte eingeteilt werden kann.^{23,24} Zuerst kommt es zu einer Adsorption an der Oberfläche der Bakterien, dann zur Diffusion durch die Zellwand, gefolgt von der Destabilisierung der zytoplasmatischen

Membran. Im nächsten Schritt werden Kaliumionen und andere Bestandteile der zytoplasmatischen Membran freigesetzt und im letzten Schritt kommt es zum Zelltod.

Die Adsorption kommt durch elektrostatische Wechselwirkungen zusammen, da die bakterielle Oberfläche oft eine negative Nettoladung aufweist und beispielsweise quaternäre Ammoniumverbindungen positiv geladen sind. Durch hydrophobe Ketten an kationischen Gruppen kommt es zu Wechselwirkungen mit den hydrophoben Bestandteilen der Zelle, was zur Destabilisierung der Membran führt.²⁵

3.3 Mikrobiozide Materialmodifikationen

Materialien, die im täglichen Leben verwendet werden, wie zum Beispiel Holz, Kunststoff, Glas oder Stahl, haben keine antimikrobiellen Eigenschaften und müssen im gegebenen Fall modifiziert werden. Diese Modifizierungen können auf Mikroorganismen wachstumshemmend, abweisend, adsorbierend oder letal wirken.²⁶ Hier soll auf die zwei wichtigsten Modifikationsarten eingegangen werden.

3.3.1 Nicht tödliche, bakterienabweisende Modifikationen

Zu diesen modifizierten Stoffen gehören hydrophile Oberflächen, Materialien mit niedrigerer Oberflächenenergie und geladene Oberflächen.

Hydrophile Oberflächen kann man mittels Beschichtung, Mischung oder durch kovalente Bindung mit entsprechenden Polymeren generieren. In diesem Bereich hat Polyethylenglykol eine große Bedeutung erlangt, welches schon zur Modifikation von Glas, Polyurethan, Polypropylen und Nylon eingesetzt wurde. Die antimikrobielle Wirkung kommt wahrscheinlich daher, dass dieses wasserlösliche, quellbare Polymer, das große Mengen an geliertem Wasser speichern kann, abstoßend auf die Bakterien wirkt, bzw. nicht adsorbierende Wechselwirkungen verursacht.²⁷ Da die meisten Bakterien eine negative Nettoladung aufweisen, führen negativ geladene Oberflächen zur Abstoßung, wie zum Beispiel bei deprotonierten Methylmethacrylat/Methacrylsäure-Copolymeren.

Aber auch positive Oberflächen können einen antimikrobiellen Effekt auslösen, da hier die Bakterien evtl. zu stark gebunden werden können.

Dadurch kommt es zwar zu einer Begünstigung der Adhäsion, aber die Zellteilung und die Vermehrung wird aufgrund der zu starken Bindung negativ beeinflusst. Dies ist zum Beispiel bei positiv geladenen Copolymeren aus Methylmethacrylat/Trimethylaminoethylmethacrylat der Fall.²⁸

3.3.2 *Bakterizide Materialmodifikationen*

Materialmodifikationen mit bakterizider Wirkung erfolgen durch kovalente Immobilisierung oder durch Freisetzungssysteme für Biozide. Zu dieser Freisetzung kann es durch eine Mischung bzw. Imprägnierung mit antimikrobiellen Systemen kommen, die in Folge konstant an die Umgebung abgegeben werden. Ein Beispiel hierfür sind mit Silber beladene Polymernetzwerke. Es gibt allerdings einige Nachteile solcher Systeme. Durch den kontinuierlichen Ausstoß kommt es zum vollständigen Aktivitätsverlust; resistente Mikroorganismen werden verstärkt ausgebildet und sind gegen durch die Luft übertragene Mikroorganismen unwirksam.

Biozide, die kovalent gebunden sind, sind auch gegen Mikroorganismen, die durch die Luft übertragen werden, aktiv; es kommt zu keinem Herauswaschen des bioziden Materials.¹¹

3.4 *Antibakterielle Polymersysteme*

Antimikrobielle Verbindungen mit geringer molekularer Masse werden zur Sterilisation, als antimikrobielle Medikamente und als Konservierungsmittel verwendet. Allerdings sind sie in ihrer Anwendung durch eine gewisse Resttoxizität limitiert, auch wenn geeignete Mengen der Verbindung eingesetzt werden.

Viele Arten von Kunststoffen werden gewöhnlich durch trockene/nasse Hitze oder ionische Bestrahlung sterilisiert. Allerdings können diese Polymere wieder mit Mikroorganismen kontaminiert werden, sobald sie der Atmosphäre ausgesetzt sind. Deshalb ist es notwendig, neue Materialien mit antimikrobiellen Eigenschaften zu entwickeln.

Die ideale Lösung ist die Entwicklung von Biomaterialien, die resistent gegenüber mikrobiellen Besiedelungen sind. Antimikrobielle Polymere könnten eine relativ einfache Lösung für dieses Problem darstellen.

Die Verwendung von antimikrobiellen Polymeren ermöglicht die Verbesserung von einigen existierenden, antimikrobiellen Verbindungen, vermindert jedoch die Umweltprobleme, sowie die Resttoxizität der Verbindungen und erhöht dabei die Effizienz und Selektivität, sowie auch die Lebenszeit. Weitere Vorteile von antimikrobiellen Polymerverbindungen sind, dass sie nicht flüchtig und chemisch stabil sind, und nicht durch die Haut dringen.²⁹ Durch synergetische Effekte kommt es zu einer höheren antimikrobiellen Aktivität, es sind umfangreiche antiseptische Materialmodifikationen möglich, und einige bedeutende Abwehrmechanismen der Bakterien sind gegen Polymere ineffektiv.¹¹

Die Wirkungsweisen und Generierung solcher Polymersysteme sind vielfältig. Es können Biozide polymerisiert werden, wobei hier bereits die aufbauende Monomereinheit antimikrobiell wirkt. Ein Ansatz in diese Richtung ist die Polymerisation von Antibiotika oder Desinfektionsmittel, die vorher mit funktionellen Gruppen modifiziert worden sind.³⁰ Weiters gibt es makromolekulare Biozide, das sind Polymere, die formal nicht aus bioziden Wiederholungseinheiten aufgebaut sind und wo erst das Vorliegen in der Polymerkette zur antimikrobiellen Wirkung führt.³¹

Bei Freisetzungssystemen auf Polymerbasis werden bekannte niedermolekulare Biozide von Makromolekülen an die Umwelt abgegeben, wo sie dann aktiv werden. Dies kann durch kovalente Bindung der Biozide an die Makromoleküle verwirklicht werden; die Freisetzung erfolgt dann meist durch hydrolytische Abspaltung.³²

3.4.1 *Grundanforderungen für antimikrobielle Polymere*

Das ideale antimikrobielle Polymer sollte leicht und billig zu synthetisieren sein. Es sollte auch unter Langzeitverwendung und Lagerung bei den für die jeweiligen Anwendungen benötigten Temperaturen stabil bleiben. Weiters sollte es für wasserdesinfizierende Anwendungen nicht in Wasser löslich sein. Es sollte nicht giftig sein und sich nicht zersetzen oder giftige Produkte freisetzen. Es sollte regenerierbar sein, ohne Aktivität einzubüßen, und die biozide Wirkung sollte gegen ein breites Spektrum an pathogenen Mikroorganismen in kurzer Zeit einsetzen.²⁹

3.4.2 *Faktoren, welche die antimikrobielle Aktivität beeinflussen.*

Der Einfluss des Molekulargewichtes auf die antimikrobielle Wirksamkeit wurde von verschiedenen Gruppen untersucht, wobei allerdings unterschiedliche Ergebnisse erzielt wurden. Laut Ikeda und Kanazawa nimmt die antimikrobielle Aktivität mit steigendem Molekulargewicht zu, während die Chen und Tokura einen parabolischen Effekt beobachteten. Alle Gruppen untersuchten unterschiedliche Polymere; außerdem wurden nicht immer die gleichen Bakterienstämme verwendet. Hier sei erneut auf den bereits oben diskutierten unterschiedlichen Aufbau von grampositiven und gramnegativen Bakterien hingewiesen.

Sterische Effekte wie Spacer-Länge und Konformation können ebenfalls einen Einfluss auf die bakterizide Wirkung haben. Beides sollte je nach Biozid auf die optimale Wechselwirkung mit der Cytoplasmamembran abgestimmt werden. Aufgrund der Amphiphilie der Cytoplasmamembran muss ein Kompromiss zwischen Hydrophilie und Hydrophobie gefunden werden.²⁹

3.4.3 *Wirkmechanismus*

Der Mechanismus der Wechselwirkung zwischen bakterieller Membran und amphiphilen kationischen Makromolekülen ist noch nicht ganz geklärt, doch gibt es zur Zeit drei Hauptmodelle von Peptidwechselwirkungen mit der Phospholipid-Membran, die auf synthetisierte Makromoleküle übertragen werden können: (1) „barrel-stave“ Modell, (2) „toroid“ Modell, (3) „carpet“ Mechanismus. Bei allen drei Modellen kommt es zuerst zu einer elektrostatischen Wechselwirkung zwischen dem positiv geladenem Peptid und dem negativ geladenen Phospholipid. Bei den ersten zwei Modellen kommt es zur Porenbildung, die durch das Peptid induziert wird. Im „barrel-stave“ Modell formen die Peptide die Wand der Pore, wobei der hydrophobe Teil des Peptides mit der nicht-polaren Lipidalkylkette interagiert, während die hydrophilen Segmente das Innere der Pore ausbilden. Im „toroid“ Modell bilden die Peptidketten mit den Lipidkopfgruppen gemeinsam die Poren aus. Im „carpet“ Modell bleiben die Peptide an der Oberfläche der Bilayer und durch deren Ansammlung kommt es zur Zersetzung der Membran. Dieses

Modell ist das generellste und lässt sich leicht auf synthetische Polymere übertragen.³³

In den folgenden Abbildungen wird die wahrscheinliche Wirkungsweise, ausgelöst durch die elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem polymeren Wirkstoff und der Cytoplasmamembran der Mikroorganismen veranschaulicht.³

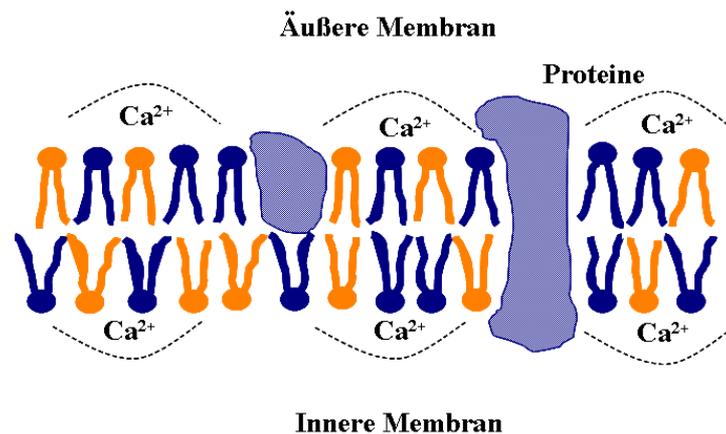


Abb. III-8: Cytoplasmamembran von Bakterien, entsprechend dem Fluid Mosaic Modell, stabilisiert durch Calcium-Ionen und verteilte Phospholipide.

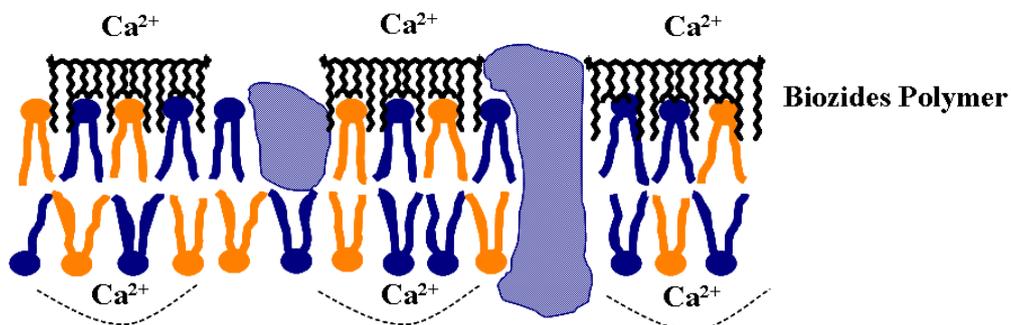


Abb. III-9: Verdrängung von gebundenem Calcium und Anbinden von einem bioziden Polymer an die Phospholipide.

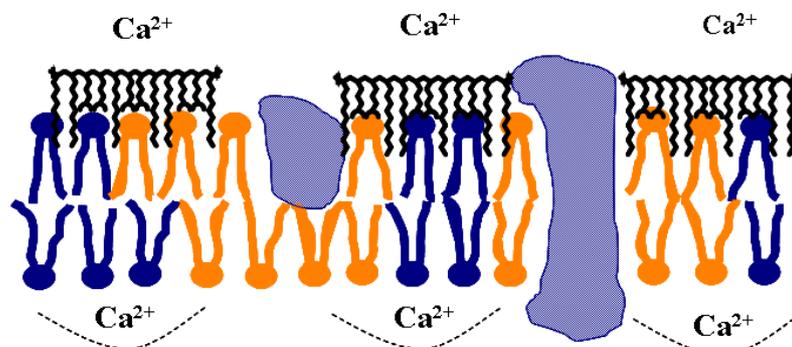


Abb. III-10: Durch das Polymer induzierte Phasenseparation von geladenen und ungeladenen Lipiden.

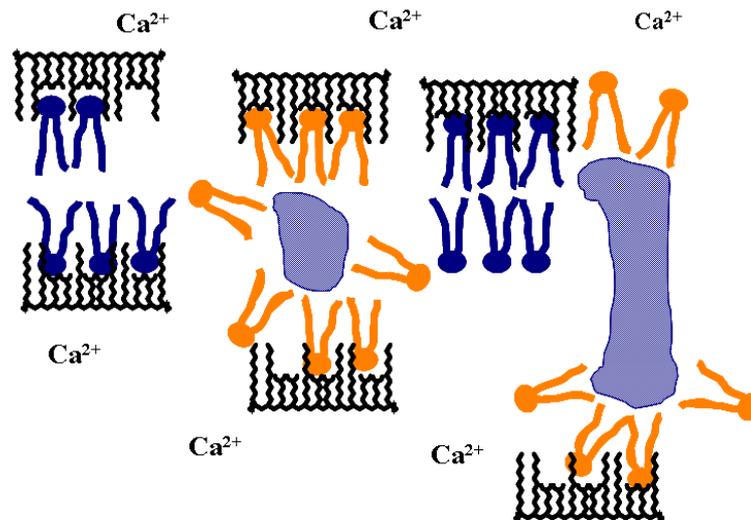


Abb. III-11: Zerfall der Cytoplasmamembran, hervorgerufen durch die Phasenseparation.

3.4.4 Potentielle Anwendungen biozider Polymere

Neben Anwendungen im Gesundheitswesen, wie Implantaten, Badematten etc. gibt es auch in vielen anderen Bereichen Verwendungsmöglichkeiten für antimikrobielle Kunststoffe.

Um Wasser zu desinfizieren, werden häufig Chlorverbindungen oder wasserlösliche Desinfektionsmittel eingesetzt. Diese löslichen Desinfektionsmittel weisen allerdings eine gewisse Resttoxizität auf, auch wenn nur geringe Mengen verwendet werden. Beim Einsatz von diesen Desinfektionsmitteln oder antimikrobiellen Verbindungen können Rückstände nicht vermieden werden, was zu einer Aufkonzentration in der Umwelt führt. Freie Chloratome und andere verwandte Chemikalien können weiters leicht mit organischen Substanzen reagieren, wobei Analoge von Trihalogenmethan entstehen können, die krebserregend sind, weshalb deren Verwendung vermieden werden sollte. Optimal wäre die Entfernung der Mikroorganismen aus dem Wasser mit Hilfe unlöslicher Substanzen. Dies könnte zum Beispiel durch Kontakt-Desinfektionsmittel erfolgen, welche die jeweiligen Zielmikroorganismen, nur durch Kontakt und ohne irgendwelche reaktiven Substanzen freizulassen, desaktivieren, töten oder entfernen. Antimikrobielle Polymere wären für diese Anwendung ideal, da sie durch mehrere Techniken synthetisiert werden können und sie so modifiziert werden können, dass sie unlöslich in Wasser sind.

Mikrobielle Verunreinigungen reduzieren die Haltbarkeit von Nahrungsmitteln und erhöhen das Risiko von Krankheiten. Die Nachfrage nach frischen Lebensmitteln und Fertigprodukten bei Globalisierung des Handels und den damit verbundenen langen Transportwegen, eröffnet neue Herausforderungen. Man sucht nach Möglichkeiten, das Wachstum der Mikroorganismen zu verhindern, ohne dabei die Qualität und Frische der Produkte einzubüßen. Traditionelle Methoden, um Nahrungsmittel vor mikrobiellem Wachstum zu schützen, sind zum Beispiel Temperaturbehandlung, Gefriertrocknung, Kühlung, Bestrahlung und Zugabe von antimikrobiellen Verbindungen oder Salz. Diese Methoden können allerdings nicht bei allen Nahrungsmitteln angewandt werden, wie zum Beispiel bei frischem Fleisch oder bei Fertigprodukten. Doch auch hier steigt die Nachfrage nach Produkten ohne chemische Konservierung. Antimikrobielle Verpackungen aus bioziden Polymeren könnten mikrobielle Verunreinigungen kontrollieren, indem sie die Wachstumsrate reduzieren oder die Mikroorganismen durch Kontakt deaktivieren.²⁹

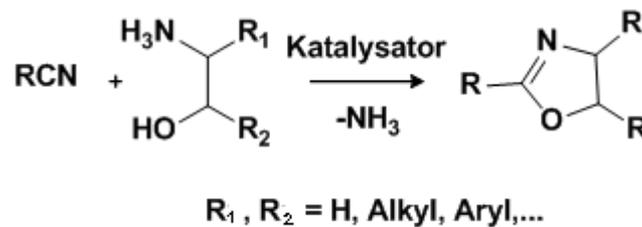
4 Die ionische Polymerisation der 2-Oxazoline

Die ionische Polymerisation erfolgt durch Addition von Monomeren an wachsende Makroionen, wobei hier im Gegensatz zur Polykondensation und Polyaddition nicht jeder einzelne Schritt katalysiert werden muss. Die Polymerisation wird durch Initiatoren initiiert, welche Kationen generieren. Da die Initiatoren oft spontan dissoziieren, benötigt die Reaktion nur eine kleine Aktivierungsenergie. Der Polymerisationsgrad kann durch das Monomer/Initiatorverhältnis eingestellt werden. Wenn alle initiierenden Spezies vorhanden sind, die Startreaktion sehr schnell stattfindet, es zu keinen Abbruch- und Übertragungsreaktionen sowie zu keinen Diffusionseffekten kommt, entstehen Polymere mit enger Molmassenverteilung. Bei der kationischen Polymerisation werden Olefinderivate mit elektronenreichen Substituenten, Monomere mit Doppelbindungen, die Heteroatome enthalten, und bestimmte Heterocyclen eingesetzt. Als Initiatoren dienen Brønsted Säuren und Lewis Säuren mit Co-Initiatoren. Das wachsende Makrokation ist thermodynamisch und kinetisch instabil, und versucht sich durch Addition nukleophiler Spezies selbst zu stabilisieren. Das führt einerseits bei Anlagerung von Monomeren zu hohen Reaktionsgeschwindigkeiten, andererseits bei Reaktionen mit anderen Spezies, wie Gegenion oder Lösungsmittel, zu einer Vielzahl an Übertragungs- und Abbruchreaktionen. Aus diesem Grund werden technisch nur wenige Monomere kationisch polymerisiert, wie zum Beispiel Isobutylen, Vinylether, Formaldehyd, Ethylenimin und Tetrahydrofuran.³⁴

4.1 2-Oxazoline

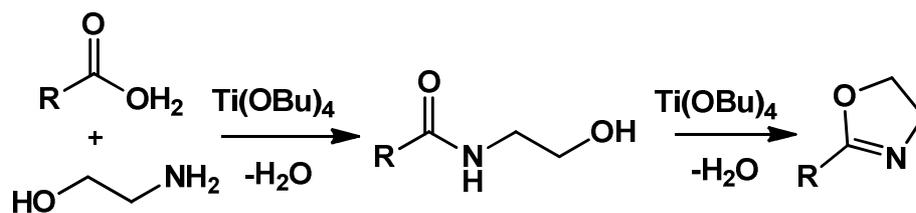
2-Oxazoline sind organische Verbindungen, die in einer Reihe komplexer biologischer Strukturen inkludiert sind und eine wichtige Rolle als Liganden für Katalysatoren und als Zwischenprodukte einnehmen. Weiters dienen sie als Monomere für die kationische ringöffnende Polymerisation und können auch als Schutzgruppen eingesetzt werden. Für die Synthese von 2-Oxazolinen gibt es verschiedene Methoden. Die wichtigsten Ausgangsmaterialien für die Synthese sind korrespondierende Nitrile³⁵, Carbonsäuren³⁶ und deren Derivate wie Ester³⁷ oder Acyl-Benzotriazole.³⁸

In den letzten Jahren wurden neben diesen bekannten Methoden neue Wege entwickelt, 2-Oxazoline zu synthetisieren, wie zum Beispiel die Umwandlung von einem Alkohol oder einem Aldehyd mit molekularem Iod oder Pyridinium Hypobromid-Perbromid.³⁹ Die Synthese mit dem Nitril als Ausgangsprodukt wurde von Witte und Seeliger 1974 beschrieben.⁴⁰ Hier handelt es sich um eine einstufige Reaktion, in der das Nitril mit Aminoethanol in der Gegenwart eines Lewisäure-Katalysators umgewandelt wird (Schema III-1). Es ist von großem Interesse, viele verschiedene 2-Oxazoline zu synthetisieren, da der Substituent der Seitenkette im Polymer entspricht, und dieser die Eigenschaften stark beeinflusst.⁴¹



Schema III-1: Synthese von 2-Oxazolinen mit Nitril als Ausgangsprodukt.

Für die Herstellung von Monomeren mit längererkettigen Substituenten ist die Synthese über die Carbonsäure gut geeignet. Hierbei wird die Carbonsäure mit Ethanolamin und Katalysator nach folgender Reaktionsgleichung umgesetzt.⁴²

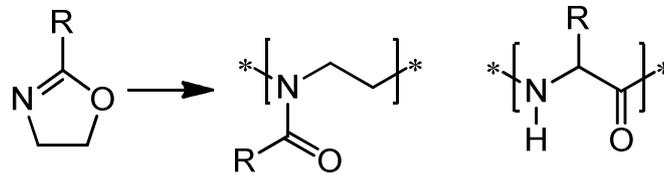


Schema III-2: Synthese von 2-Oxazolinen über Carbonsäure und Ethanolamin.

4.2 Polymerisationsmechanismus der 2-Oxazoline

Lebende Polymerisationstechniken eröffnen die Möglichkeit, Polymere mit definierter Zusammensetzung und enger Molekulargewichtsverteilung zu synthetisieren. Weiters können verschiedene Strukturen hergestellt werden, wie zum Beispiel lineare Polymere, sternförmige und Graft(co)polymere.^{43,44,45,46}

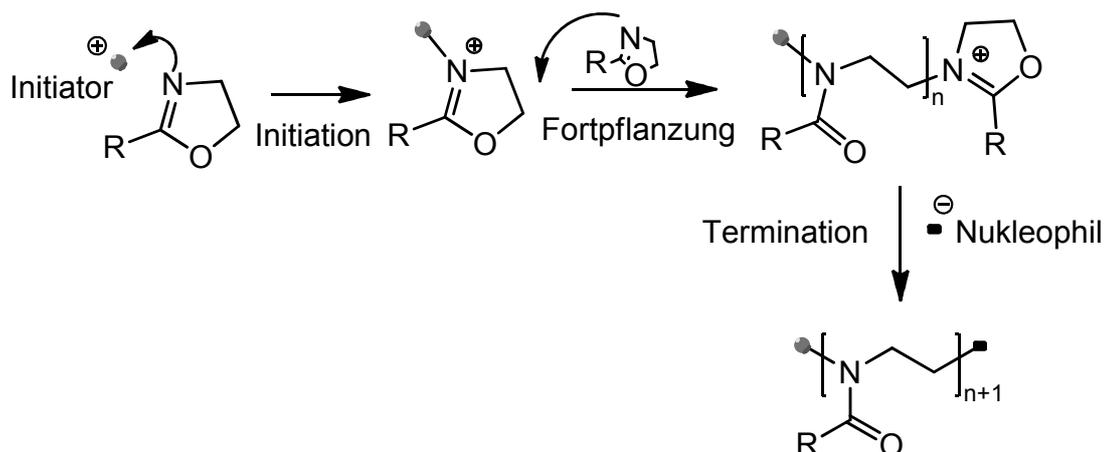
Hierbei spielt die kationische ringöffnende Polymerisation (CROP) von 2-Oxazolinen eine wichtige Rolle. Die resultierenden Polyamide können als Analoge von Polyaminosäuren gesehen werden, die man auch als Pseudopeptide bezeichnen kann.⁴⁷ (Schema III-3)



Schema III-3: Oxazolin Polyoxazolin und strukturell ähnliche Polyaminosäure.

Über die CROP von 2-Oxazolinen wurde 1966 das erste Mal von vier unabhängigen Gruppen berichtet.^{48,49,50,51}

Die Initiation erfolgt durch ein Elektrophil, wie Protonen oder Methylkationen, wodurch die C-O Bindung des gebildeten Oxazoliniumions geschwächt wird, sodass sie von dem Stickstoffatom eines anderen Monomers nukleophil angegriffen werden kann.⁵² Durch weitere nukleophile Angriffe kommt es zur Kettenfortpflanzung, die mit der Entstehung des Poly(2-Oxazolin)s einhergeht. Durch die Zugabe eines Nucleophils kann die Reaktion gestoppt werden, und es kann dazu genutzt werden, eine funktionelle Endgruppe einzuführen (Schema III-4). Da es sich um eine lebende Polymerisation handelt, kann ein zweites Monomer zugegeben werden, wodurch man einfach Block-Copolymere synthetisieren kann.⁵³



Schema III-4: Reaktionsmechanismus der CROP von 2-Oxazolinen.

Durch unterschiedliche Substituenten der verwendeten Monomere können die Eigenschaften der Poly(2-Oxazoline) leicht variiert werden.⁵⁴ Funktionelle

Gruppen können auch durch Initiatoren und Kettenabbruchreagenzien eingeführt werden. Multi- und monofunktionelle Alkylchloroformate, Dialkylsulfate, Alkyltoluensulfonate, Allyl-, Benzyl- und Propargylhalide bieten die Möglichkeit, funktionelle Gruppen am Start der wachsenden Polymerkette einzubauen. Die oben genannten Initiatoren gehören zu der Klasse der langsamen Initiatorsysteme, da sie relativ wenig elektrophil sind, was wiederum zu einer breiteren Molekulargewichtsverteilung führen kann. Die Ester der Trifluoromethansulfonsäure zeigen im Gegensatz dazu eine schnelle Initiation, was zu einer höheren Reaktionskontrolle und geringeren Polydispersitäten führt. Mono- und divalent Alkyl- und Fluoralkyltrifluoromethansäureester wurden als gut geeignete Initiatoren für diese Reaktion beschrieben.⁵⁵ Im Gegensatz zu den kurzen Alkylketten führen sowohl lange Ketten als auch aromatische Substituenten zu wasserunlöslichen Polymeren.⁵⁶ Dadurch ist es einfach möglich, amphiphile Systeme zu generieren, die zum Beispiel als micellare Katalysatoren⁵⁷, nichtionische Tenside⁵⁸ oder Hydrogele⁵⁹ ihre Anwendung finden.

4.3 *Poly(2-Oxazolin)e als antimikrobielle Verbindungen*

Antimikrobielle Polymere sind gute Alternativen zu niedermolekularen antimikrobiellen Verbindungen. Der größte Vorteil von antimikrobiellen Polymeren ist sowohl ihre niedrige Toxizität als auch ihre geringere Tendenz zu mikrobieller Resistenz. Darüber hinaus verfügen die Polymere über eine längere Lebenszeit und oft besitzen sie eine verbesserte Effizienz und Selektivität gegenüber niedermolekularen Verbindungen.

Laut dem Review-Artikel von R. Hoogenboom⁶⁰ berichteten Waschinski und Tiller, dass Poly(2-Ethyl-2-oxazolin) (PEtOx), welches mit einem quaternären Ammoniumsalz funktionalisiert war, höhere antimikrobielle Aktivität gegen *S.Aureus* aufweist als analog endfunktionalisierte Poly(2-Methyl-2-oxazolin) (PMeOx). Weiters fanden sie heraus, dass die Kettenlänge die Aktivität nicht beeinflusst, während die funktionelle Gruppe am Polymerende, die auch Satellit-Gruppe genannt wird, die antimikrobielle Aktivität jedoch deutlich beeinflusst. Der Satellit-Gruppen Effekt wurde durch Veränderung der Struktur genauer untersucht, wobei es zu besserer antimikrobieller Aktivität kam, wenn das quaternäre Ammoniumsalz und die Satellit-Gruppe in einer

unimolekularen Mizelle aggregieren. Der nachfolgende gemeinsame Angriff beider Gruppen der Phospholipidmembran führt zur Durchlöcherung der Membran. Neben diesen löslichen antimikrobiellen Poly(2-Oxazolin)en wurde auch die Herstellung von antimikrobiellen Oberflächen über zwei verschiedene Vorgehensweisen untersucht. Einerseits wurde ein amphiphiles Blockcopolymer, bestehend aus Poly(2-Phenyl-2-oxazolin) (PMeOx) als hydrophober Block, und Poly(2-Methyl-2-oxazolin) (PMeOx) als hydrophiler Block, mit quaternärem Stickstoff als Endgruppe am PMeOx hergestellt. Dieses Polymer wurde als Stabilisator für die Emulsionspolymerisation von Styrol/Butylacrylat Mischungen eingesetzt, um Poly(2-Oxazolin)-modifizierte Gitter zu erhalten. Die daraus erhaltenen Polymerfilme weisen eine gute antimikrobielle Wirksamkeit gegen *S. Aureus* auf, welche unabhängig von dem Styrol/Butylacrylat Verhältnis ist. Im zweiten Versuch wurden Poly(2-Oxazolin)e, die einerseits über polymerisierbare Endgruppen, andererseits über eine quaternäre Stickstoff-Endgruppe verfügten, mit Hydroxyethylmethacrylat und Glyceroldimethacrylat copolymerisiert, wodurch ein Polymernetzwerk entstand. Die erhaltenen Polymerfilme zeigten antibakterielle Eigenschaften mit längerer Wirksamkeit als bei niedermolekularen copolymerisierbaren Additiven, obwohl geringere Mengen an bioziden Gruppen von Nöten waren.⁶⁰

4.4 Mikrowellen unterstützte Polymerisation

Mikrowellenbestrahlung ist eine gut bekannte Methode, um Materialien zu erwärmen oder zu trocknen, und sie wird in vielen privaten Haushalten sowie in der Industrie verwendet. Sie eröffnet eine Vielzahl an Vorteilen gegenüber konventionellen Heizmethoden, da sie ohne direkten Kontakt erhitzt und der Heizvorgang unmittelbar, schnell und sehr spezifisch erfolgt.^{61,62}



Abb. III-12: Mikrowelle von Biotage.⁶³

Mikrowellen arbeiten mit elektromagnetischer nicht-ionischer Strahlung mit Frequenzen zwischen 300 GHz und 300 MHz. Die korrespondierenden Wellenlängen reichen von 1 mm bis zu 1 m, sodass sie zwischen Infrarot- und Radiowellen liegen.

Die meisten kommerziell erhältlichen Mikrowellen verwenden eine Strahlung mit einer standardisierten Frequenz von 2450 MHz (Wellenlänge $\lambda = 0,122$ m), um Interferenzen mit dem Mobilfunk zu vermeiden.

Das korrespondierende elektrische Feld oszilliert $4,9 \cdot 10^9$ Mal pro Sekunde und verursacht die ständige Umorientierung dipolarer Spezies und ionischer Partikel. Diese starke Anregung führt zu einer schnellen sehr gleichmäßig Aufheizung in der Bestrahlungskammer ohne direkten Kontakt.⁶¹

Es gibt signifikante Unterschiede zwischen der Mikrowellenbestrahlung und konventionellen Heizmethode. Mit Hilfe der Mikrowellenbestrahlung können Heizraten von 2-4 °C/min erreicht werden, wenn mindestens eine Komponente der chemischen Reaktion von Mikrowellen angeregt werden kann. Beim dielektrischen Heizvorgang handelt es sich um einen sehr schnellen Aufheizprozess, die Energie wird schnell generiert. Es ist auch möglich, die Wände der Mikrowellengefäße mit einem Kühlmittel zu kühlen, welches nicht durch Mikrowellen angeregt werden kann. Dadurch bleiben die Wände kalt, während im Inneren die Reaktanden weiter aufgeheizt werden. Bei herkömmlichen Heizmethoden werden hauptsächlich die Wände des Gefäßes erhitzt. (Abb. III-13)

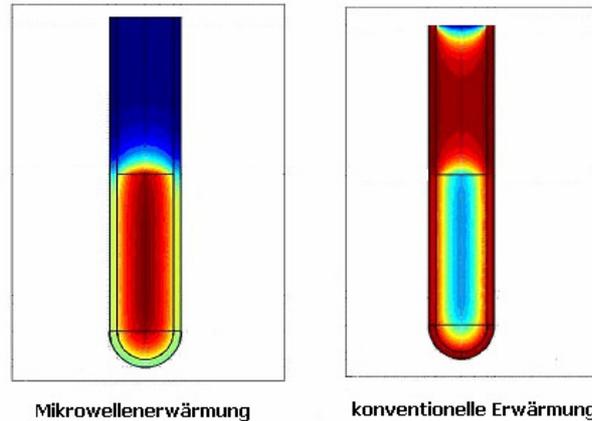


Abb. III-13: Unterschied in der Erwärmung mit der Mikrowelle und durch herkömmliche Methoden.⁶⁴

Bei Lösungen ist allerdings selektives Heizen nur bedingt bis gar nicht möglich. Wenn man zum Beispiel eine Mischung aus Methanol (2%) und Benzol (98%) mit Mikrowellenbestrahlung aufheizt, kommt es zu einer raschen Erwärmung der gesamten Mischung, obwohl Benzol nur schwer durch Mikrowellen angeregt wird. Dies liegt daran, dass ursprünglich zwar nur die Methanol-Moleküle angeregt werden, die Energie dann aber so schnell weiter übertragen wird, dass die ganze Mischung aufgeheizt wird.

Das Sieden ist sowohl ein kinetischer, als auch ein thermodynamischer Prozess. Es hängt vom Leistungsinput, von der Effizienz des Rührens und von dem Vorhandensein fester Bestandteile in der Lösung ab. Der Siedepunkt kann erhöht werden, indem man bei Überdruck arbeitet. So ist es möglich, bis zu 100 °C über den konventionellen Siedepunkt von organischen Lösungsmitteln zu gelangen. Ethanol siedet zum Beispiel unter konventionellen Methoden bei 79 °C, unter Mikrowellenbestrahlung kann dieser jedoch bei 12 atm auf einen Wert von 164 °C angehoben werden. Durch die bessere Löslichkeit in halogenfreien Lösungsmitteln bei hohen Temperaturen kann deshalb vermehrt auf halogenhaltige Lösungsmittel verzichtet werden. Mit Hilfe von Mikrowellenbestrahlungen ist es also möglich, außerhalb von konventionellen Gleichgewichtsbedingungen zu arbeiten.⁶⁵

Diese Bedingungen erfordern jedoch bestimmte Eigenschaften der Reaktionsgefäße. Die meisten Mikrowellen arbeiten mit standardisierten Gefäßen, die mit einem Septum verschlossen werden. Als

Reaktionsparameter sind die Temperatur und die Reaktionszeit einstellbar. Die Reaktionslösung wird unter anderem durch Erhöhung des Drucks auf die gewünschte Temperatur gebracht. Der Temperaturverlauf während der Reaktion kann durch einen IR-Sensor überwacht und reguliert werden, was es ermöglicht, die Reaktion bis zu einem gewissen Grad zu verfolgen.⁶¹

IV Ergebnisse und Diskussion

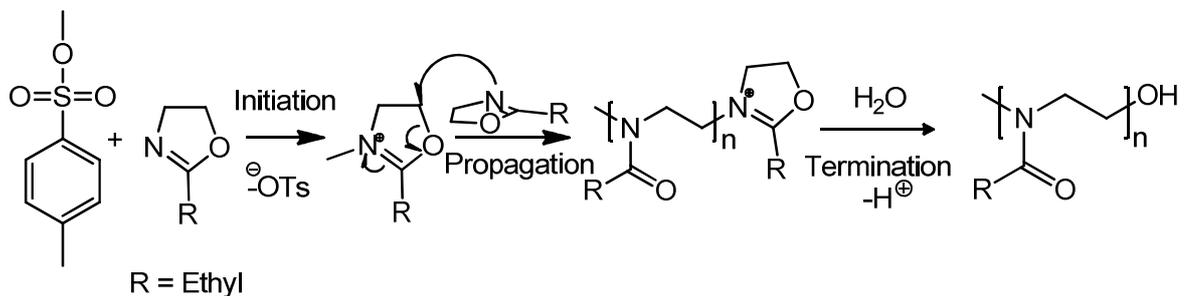
1 Einleitung

Da das protonierte Polyamin, das durch vollständige Hydrolyse aus Poly(2-Oxazolin)en synthetisiert werden kann, eine gute antimikrobielle Wirksamkeit aufwies, wurde in der vorliegenden Arbeit eine partielle Hydrolyse durchgeführt, um den Einfluss der Seitenketten auf die antimikrobielle Aktivität und die thermische Stabilität zu untersuchen. Als Ausgangspolymere wurden Poly(2-Ethyl-2-oxazolin) (PEtOx) sowie Poly(2-Nonyl-2-oxazolin) (PNonOx) gewählt. Für den eventuellen Einsatz in Wasserrohren ist besonders bemerkenswert, dass PEtOx und PNonOx bereits von der Food and Drug Administration (FDA) auf ihre Biokompatibilität getestet und als Konservierungsmittel zugelassen worden sind. Sowohl die Polymerisation als auch die Hydrolyse wurden in der Mikrowelle durchgeführt, wobei verhältnismäßig kurze Reaktionszeiten erreicht werden konnten. Als thermische Analysenmethoden wurden die Differential Scanning Calorimetry (DSC) und thermogravimetrische Messungen (STA-MS) herangezogen. Abschließend wurde ein Schnelltest mit dem Life/Dead Kit von Invitrogen™ durchgeführt, um die antimikrobielle Aktivität der Ausgangspolymere und ausgewählter Copolymere zu bestimmen.

2 Partielle Hydrolyse von PEtOx und Charakterisierung der resultierenden Copolymere

2.1 Kinetik der Hydrolyse des Poly(2-Ethyl-2-oxazolin)s

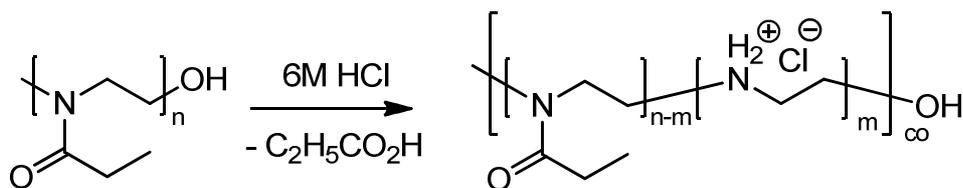
Poly(2-Ethyl-2-oxazolin) wurde mittels mikrowellenunterstützter kationischer ringöffnender Polymerisation (CROP) synthetisiert. 20 g 2-Ethyl-2-oxazolin und Methyltosylat wurden unter Schutzgas eingewogen, in absolutem Dichlormethan gelöst und anschließend in der Mikrowelle bei 140 °C für 12 min polymerisiert. Es wurde ein Polymerisationsgrad von 60 erreicht.



Schema IV-1: Synthese von PEtOx.

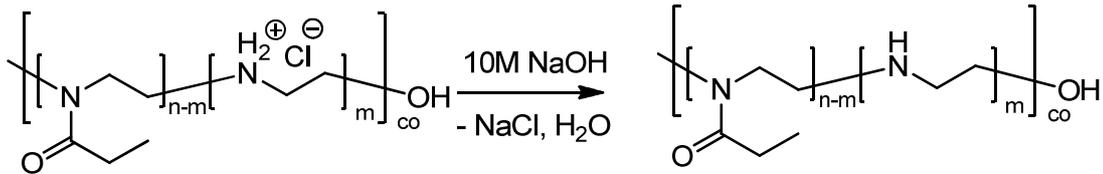
Poly(2-Ethyl-2-oxazolin)-co-(Aziridinium Chlorid) wurde durch partielle Hydrolyse des Poly(2-Ethyl-2-oxazolin)s synthetisiert.

Dazu wurden 0,5 g des vorher hergestellten Poly(2-Ethyl-2-oxazolin)s in 6 M HCl gelöst und in der Mikrowelle bei 160 °C für unterschiedliche Zeiten umgesetzt.



Schema IV-2: Partielle Hydrolyse von PEtOx.

Das synthetisierte Poly(2-Ethyl-2-oxazolin)-co-(Aziridinium Chlorid) wurde zur Isolation mit 10 M NaOH gefällt, wodurch Poly(2-Ethyl-2-oxazolin)-co-(Aziridin) entstand. Dieses Copolymer konnte danach durch Zugabe von 6 M HCl wieder in das Ausgangsprodukt zurückgeführt werden.



Schema IV-3: Isolierung des Copolymers.

In Abhängigkeit von der Reaktionszeit konnten unterschiedliche Hydrolysegrade erreicht werden, wobei jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt wurden (Tab. IV-1).

Tab. IV-1: Ergebnisse der partiellen Hydrolyse von PEtOx.

Zeit / min	Hydrolysegrade / %		
	1.Durchgang	2.Durchgang	Mittelwerte
0,5	11,7	14,4	10,3
1,0	22,7	18,4	21,4
1,5	21,6	25,9	22,4
2,0	35,2	45,5	39,6
2,5	50,7	42,8	46,8
3,0	62,7	56,9	51,5
3,5	60,8	59,4	60,1
4,0	59,7	64,2	61,9
4,5	70,0	68,6	69,3
5,0	75,7	74,6	75,2
5,5	79,0	83,6	81,3
6,0	86,0	85,3	85,6
6,5	88,9	85,0	86,9
7,0	87,9	91,3	89,6
7,5	92,1	87,5	89,8
8,0	92,8	89,2	91,0
9,0	94,9	94,7	94,8
10	95,8	94,9	95,4

Am Anfang steigt der Hydrolysegrad schnell mit der Zeit an, doch nach ungefähr 6 min beginnt die Kurve abzuflachen (Abb. IV-1). Der gewünschte Grad der Hydrolyse kann gut eingestellt werden, da die Doppelbestimmungen sehr gut miteinander korrelieren. Innerhalb von 10 min kann eine vollständige Hydrolyse unter Mikrowellenbestrahlung erreicht werden.

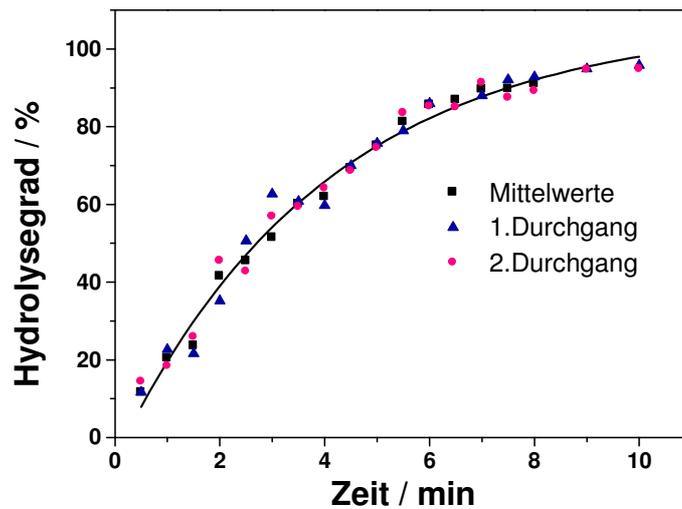


Abb. IV-1: Zeitabhängigkeit des Hydrolysegrades des partiell hydrolysierten PEtOx.

Die logarithmische Auftragung gegen die Zeit in der Abbildung IV-2 zeigt, dass es sich bei der Hydrolyse von Poly(2-Ethyl-2-oxazolin) um eine Reaktion erster Ordnung handelt.

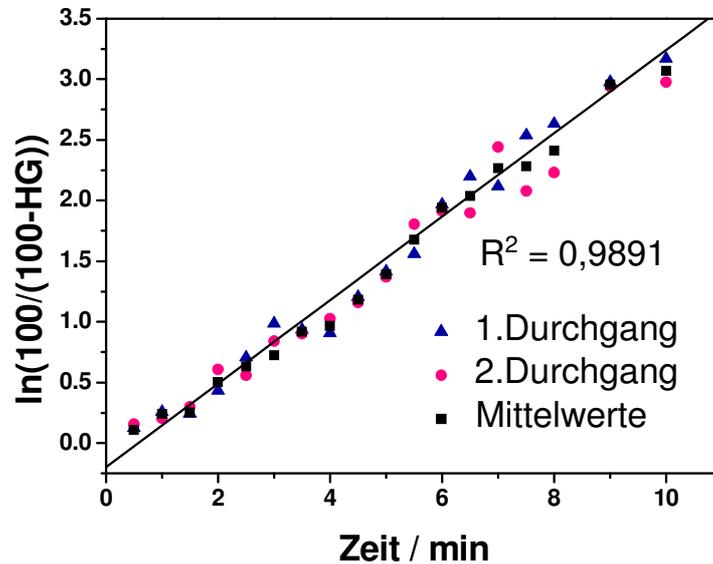


Abb. IV-2: Logarithmische Auftragung der partiellen Hydrolyse von PEtOx.

Die Hydrolyse von Poly(2-Methyl-2-oxazolin) und Poly(2-Ethyl-2-oxazolin) wurde bereits von R. Hoogenboom⁶⁶ durchgeführt. Hoogenboom et al benötigten deutlich längere Reaktionszeiten bis zum Erreichen der vollständigen Hydrolyse.

Diese unterschiedlichen Reaktionszeiten sind hauptsächlich auf die unterschiedlich gewählten Reaktionstemperaturen zurückzuführen. Hoogenboom und Mitarbeiter hydrolysierten bei 100 °C während in dieser Arbeit 160 °C für die Hydrolyse gewählt wurde. Bemerkenswert ist zudem die andere Kinetik der Hydrolyse in der Arbeit von Hoogenboom et al.

2.2 Charakterisierung

2.2.1 NMR-spektroskopische Analyse

Mittels NMR-spektroskopischer Messungen wurden die Produkte charakterisiert und der Hydrolysegrad der Copolymere bestimmt. Zur Bestimmung der Hydrolysegrade wurden die Integrale der CH₂-Gruppen der Hauptkette neben dem Amid mit der durch die Hydrolyse entstehenden benachbarten CH₂-Gruppe des Amins verglichen (Abb. IV-3 bis IV-6).

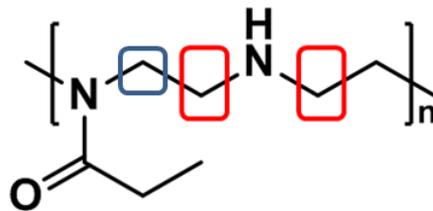


Abb. IV-3: CH₂-Gruppen des partiell hydrolysierten PEtOx mit unterschiedlichen chemischen Verschiebungen.

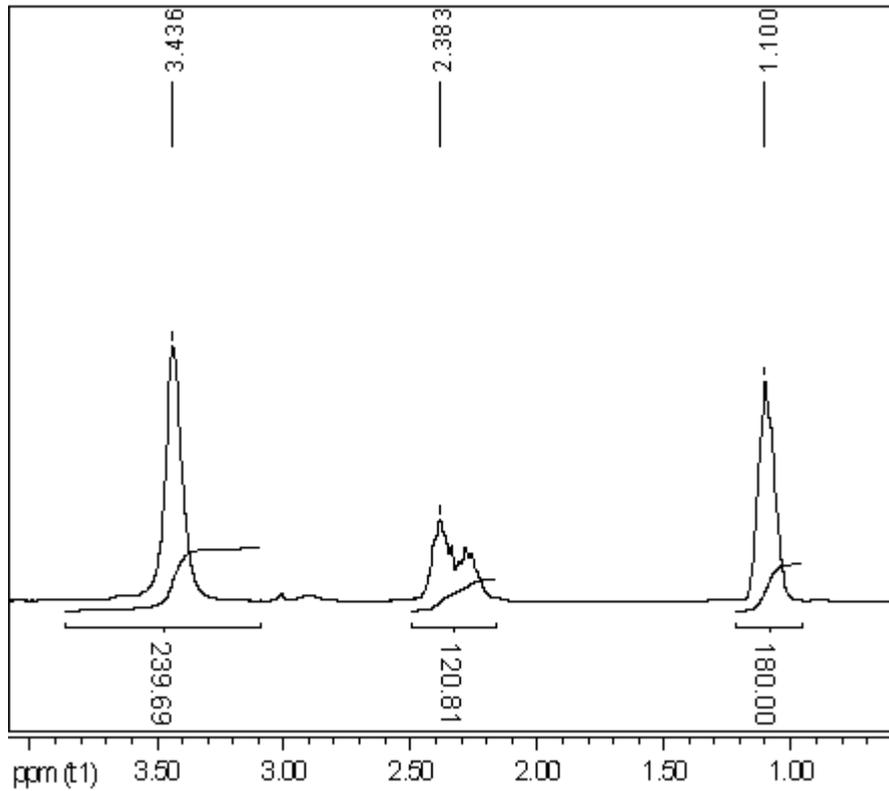


Abb. IV-4: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des Poly(2-Ethyl-2-oxazolin)s: 0,980-1,20 (m; 180 H; COCH_2CH_3), 2,13-2,46 (m; 120 H; COCH_2CH_3), 3,44 (s; 240 H; $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), PD = 60.

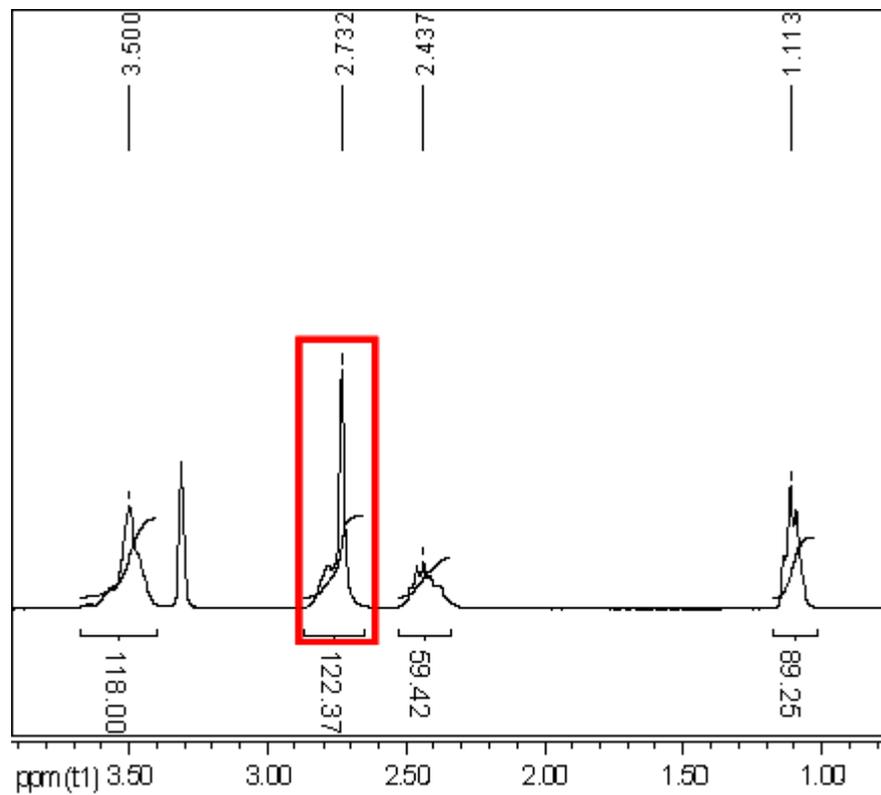


Abb. IV-5: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum eines Copolymeren: 1,00-1,18 (t; 89 H $\text{NCOCH}_2\text{CH}_3$), 2,31-2,52 (m; 59 H; $\text{NCOCH}_2\text{CH}_3$), 2,63-2,87 (m; 122 H; NHCH_2CH_2), 3,40-3,70 (m; 118 H; $\text{NCOC}_2\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}_2$) PD = 60. Der Hydrolysegrad wird durch das Integralverhältnis errechnet; in diesem Fall handelt es sich um einen Hydrolysegrad von 50%.

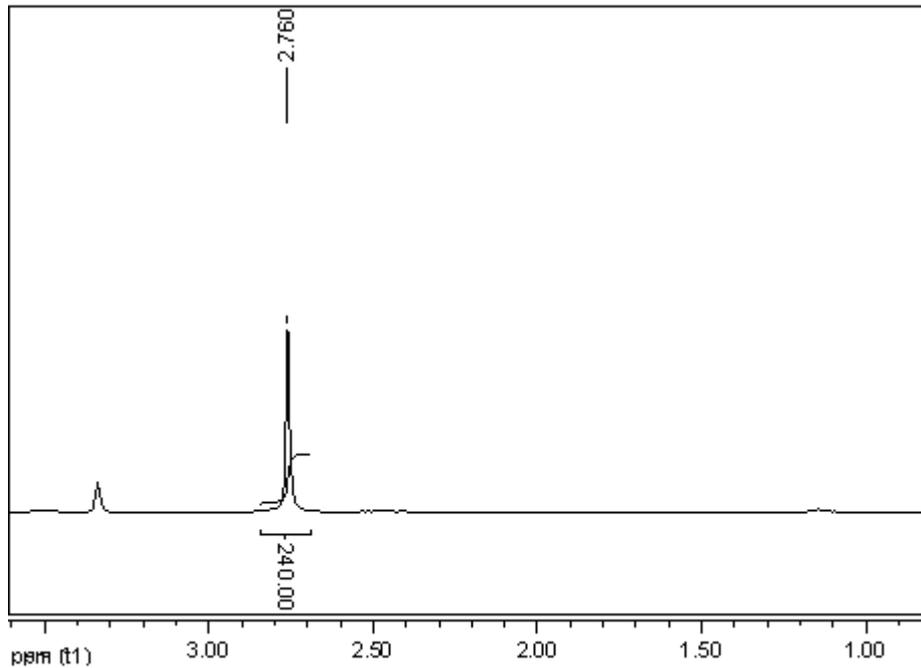


Abb. IV-6: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des Polyamins: 2,76 (s; 240 H; NHCH_2CH_2), PD = 60.

2.2.2 DSC-Analyse

Mit Hilfe der Differential Scanning Calorimetry (DSC) wurden die Glasübergangstemperaturen der Poly(2-Ethyl-2-oxazolin)-co-(Aziridinium Chlorid)e und des Poly(2-Ethyl-2-oxazolin)s bestimmt.

Tab. IV-2: Abhängigkeit des Glasübergangs vom Hydrolysegrad.

Hydrolysegrad / %	T_g / °C
0	56
18,4	65
42,8	66
56,9	68
79,0	-
95,8	-

Die Glasübergangstemperatur ist ein Maß für die Kettenbeweglichkeit. Je höher die Glasübergangstemperatur ist, desto niedriger ist die Beweglichkeit der Ketten. Die Glasübergangstemperatur der Proben nimmt mit steigendem Hydrolysegrad zu, da weniger flexible Seitenketten vorhanden sind. Weiters fällt auf, dass die Glasübergangstemperatur des reinen PEtOx noch am deutlichsten ausgeprägt ist, während die der Copolymere sehr verschwommen sind, bis die Proben ab ca. 60% Hydrolyse keinen

Glasübergang mehr aufweisen. Ab diesem Wert überwiegen somit die Eigenschaften des Polyaziridins.

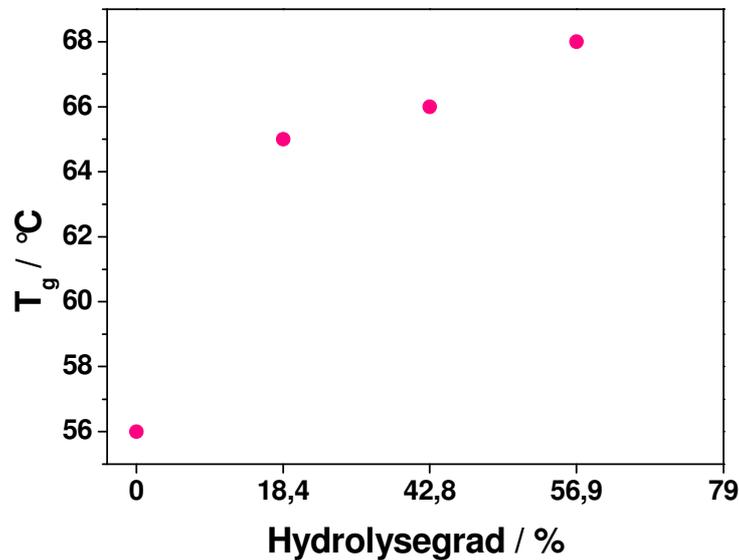


Abb. IV-7: Abhängigkeit der Glasübergangstemperatur vom Hydrolysegrad.

2.2.3 TA-Analyse

Zur Bestimmung der Temperaturstabilität der Poly(2-Ethyl-2-oxazolin)-co-(Aziridin)e wurden thermogravimetrische Messungen (STA-MS) durchgeführt.

Durch die TA-Analyse wurde die Temperatur bei 5% Gewichtsverlust der Poly(2-Ethyl-2-oxazolin)-co-(Aziridin)e ermittelt. Es wurde zuerst eine Temperatur von 20 °C eingestellt, diese für 5 min gehalten und danach wurde weiter auf 550 °C mit einer Heizrate von 37 °C/min aufgeheizt. Während dieser 5 min bei 20 °C kam es schon zu geringen Massenverlusten im Bereich von 0-1,3%. Der Grund dafür könnte einerseits die Restfeuchtigkeit der Copolymere sein, da diese sehr vorsichtig getrocknet wurden, um die Produkte nicht vor der Messung zu zerstören. Andererseits könnte in dieser Zeit auch schon die Zersetzung des Produktes bei bestimmten Proben angefangen haben, da manche Proben thermisch instabil sind. Die ermittelten Zersetzungskurven sind in Abb. IV-8 bis Abb. IV-14 als blaue Kurven abgebildet.

IV Ergebnisse und Diskussion

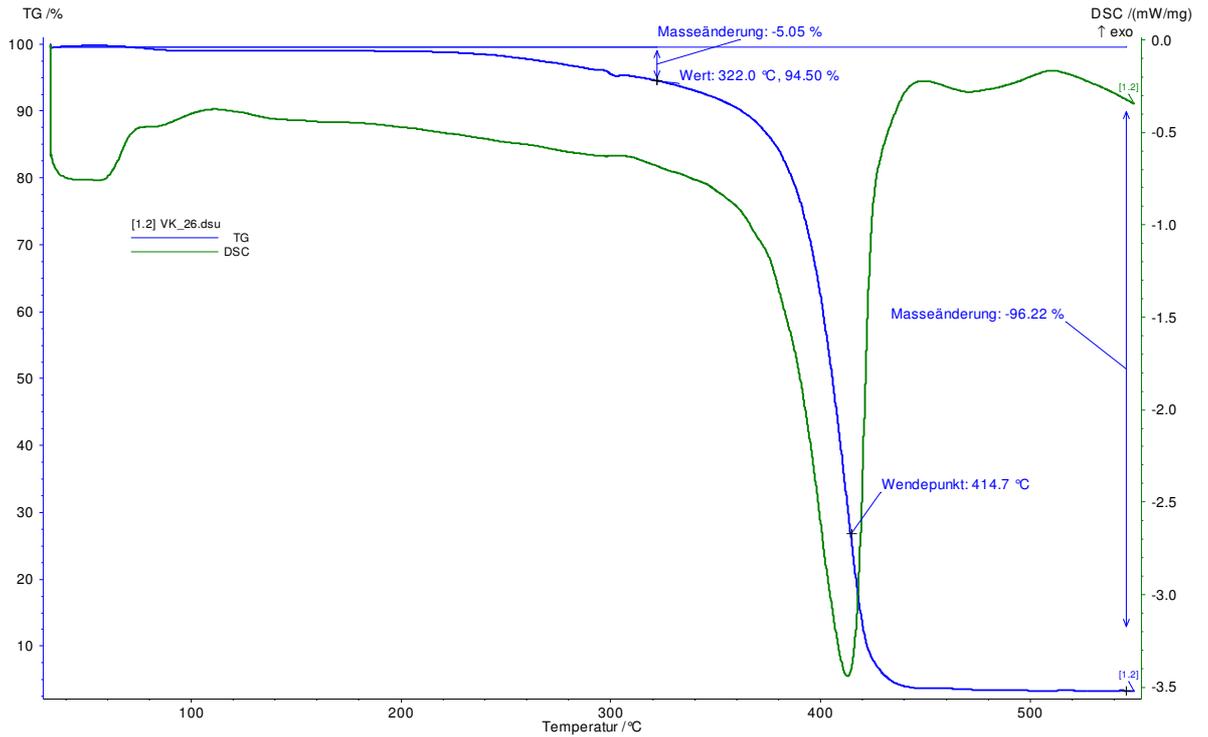


Abb. IV-8: STA-MS Kurve von Poly(2-Ethyl-2-oxazolin): Ab ca. 200 °C ist der Beginn der Zersetzungskurve zu sehen. Bis 322 °C kommt es zu einem Massenverlust von ca. 5%.

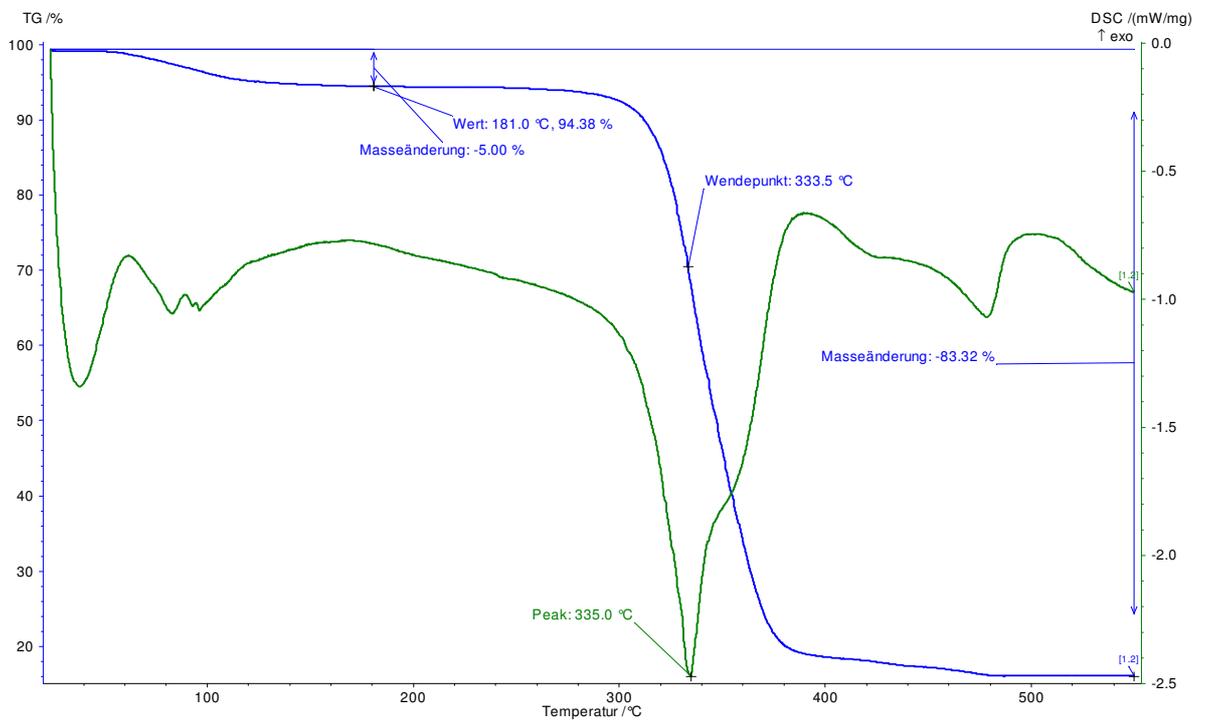


Abb. IV-9: STA-MS Kurve von 18,4% hydrolysierten PEtOx. Bis ca. 40 °C ist das Copolymer stabil. Bis 181 °C ist ein Massenverlust von ca. 5% zu beobachten.

IV Ergebnisse und Diskussion

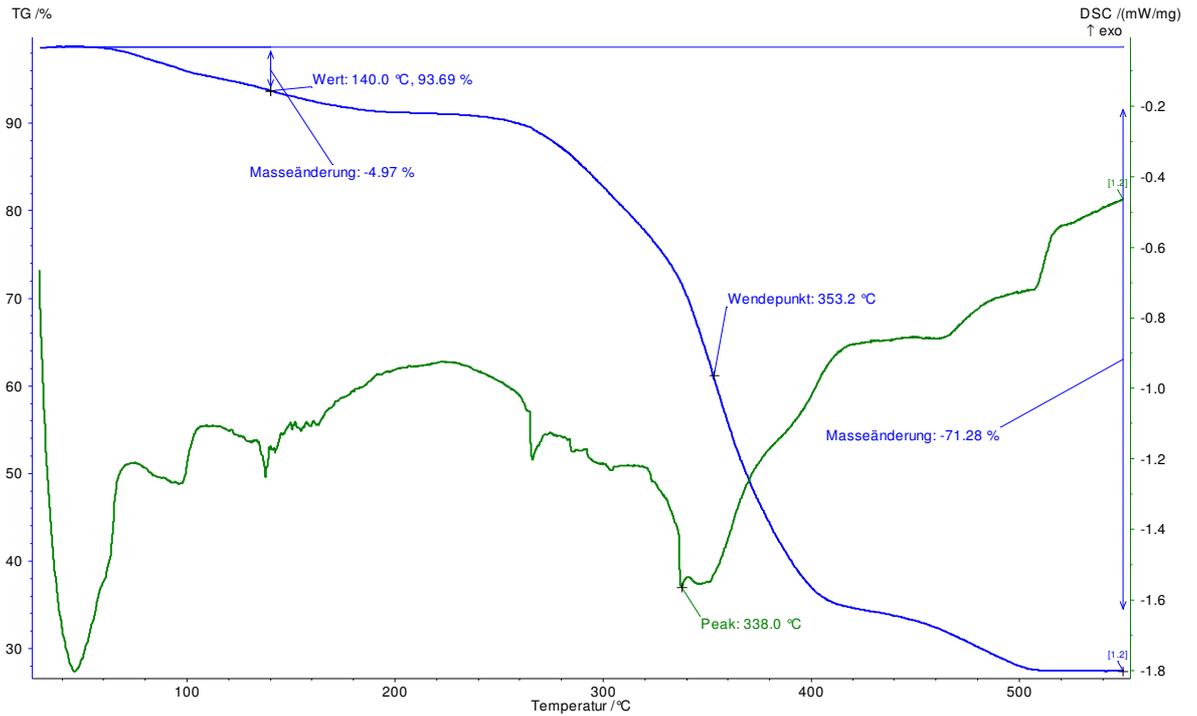


Abb. IV-10: STA-MS Kurve des zu 42,8% hydrolysierten PEtOx: Ab ca. 55 °C ist die Zersetzung zu sehen. Es kommt bis zu einer Temperatur von 140 °C zu einem Massenverlust von ca. 5%.

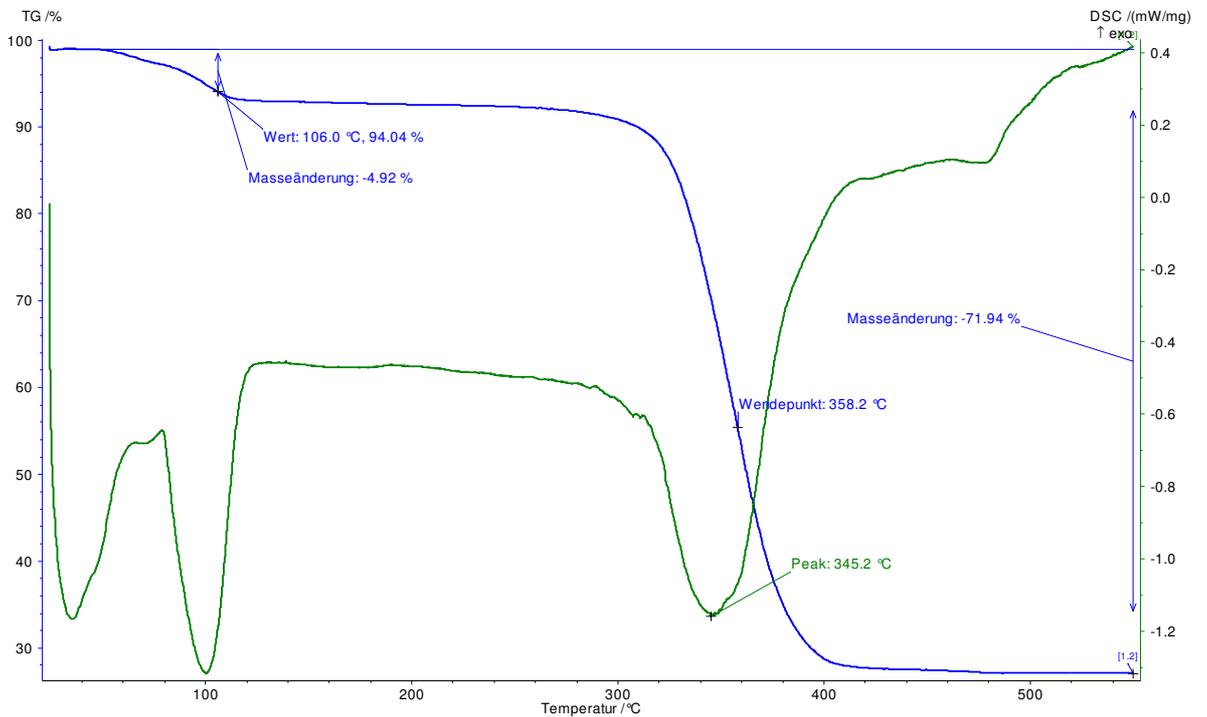


Abb. IV-11: STA-MS Kurve des zu 59,4% hydrolysierten PEtOx: Die Zersetzung beginnt bei ca. 46 °C. Es folgt 5%iger Massenverlust bis zu einer Temperatur von 106 °C.

IV Ergebnisse und Diskussion

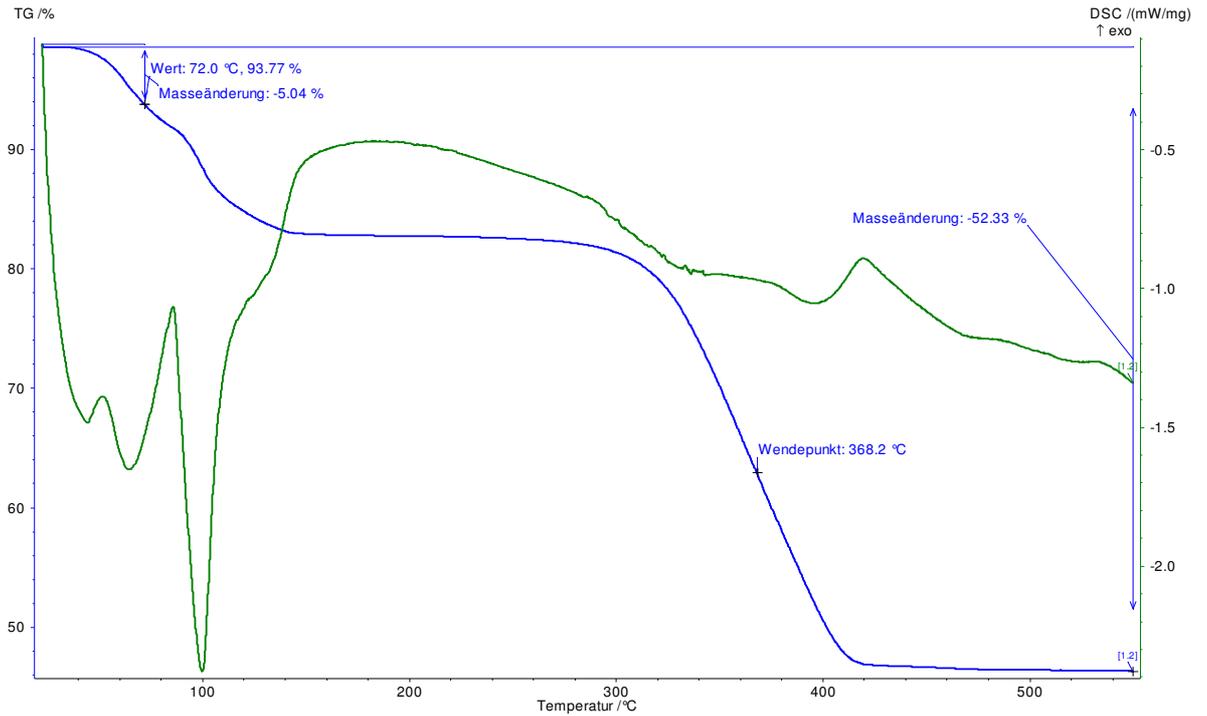


Abb. IV-12: STA-MS Kurve des zu 79% hydrolysierten PEtOx: Die Temperaturstabilität ist bis zu einer Temperatur von ca. 24 °C gegeben. Bis 72 °C kommt es zu einem Massenverlust von 5%.

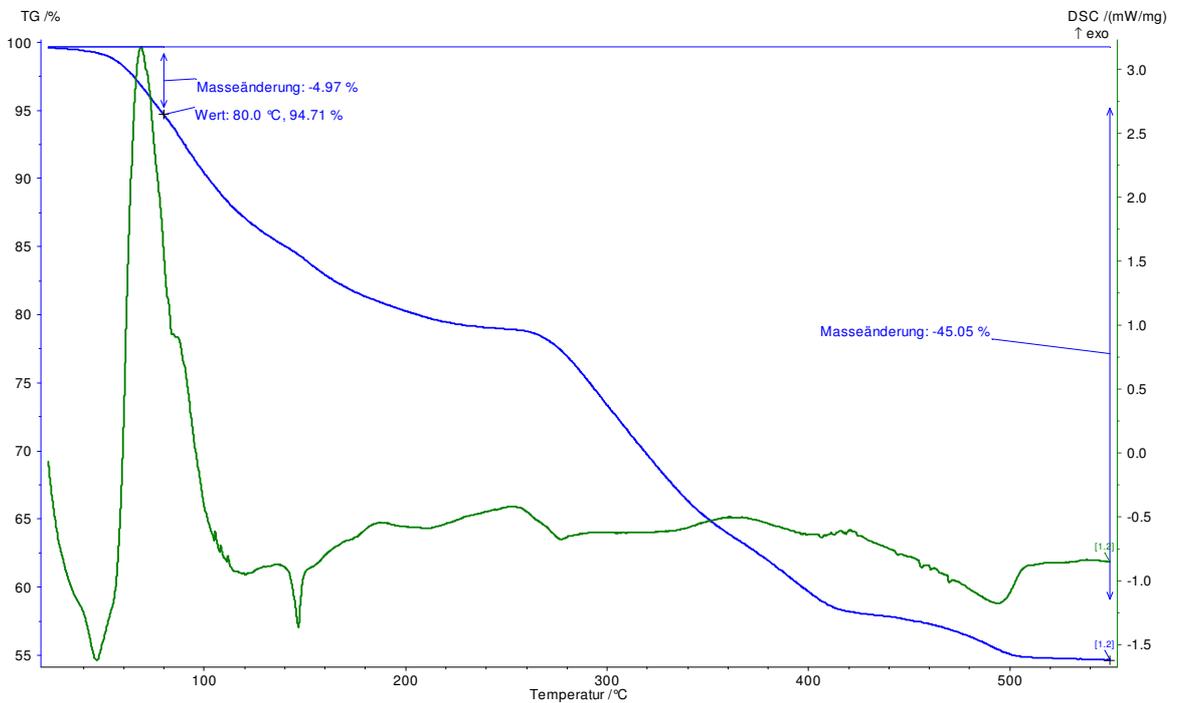


Abb. IV-13: STA-MS Kurve des zu 87,5% hydrolysierten PEtOx: Die Zersetzung beginnt schon bei ca. 20 °C. Es folgt 5%iger Massenverlust bis zu einer Temperatur von 80 °C.

IV Ergebnisse und Diskussion

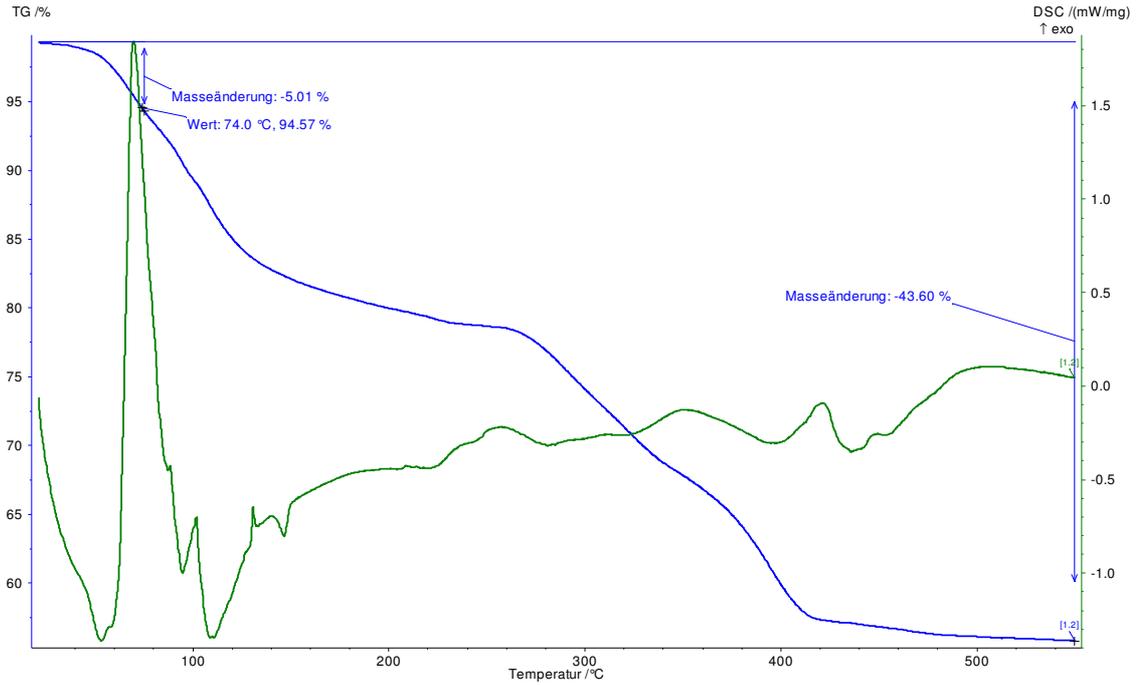


Abb. IV-14: STA-MS Kurve des zu 95% hydrolysierten PETox: Das Copolymer weist keine Temperaturstabilität mehr auf. Bis 74 °C tritt ein Massenverlust von 5% auf.

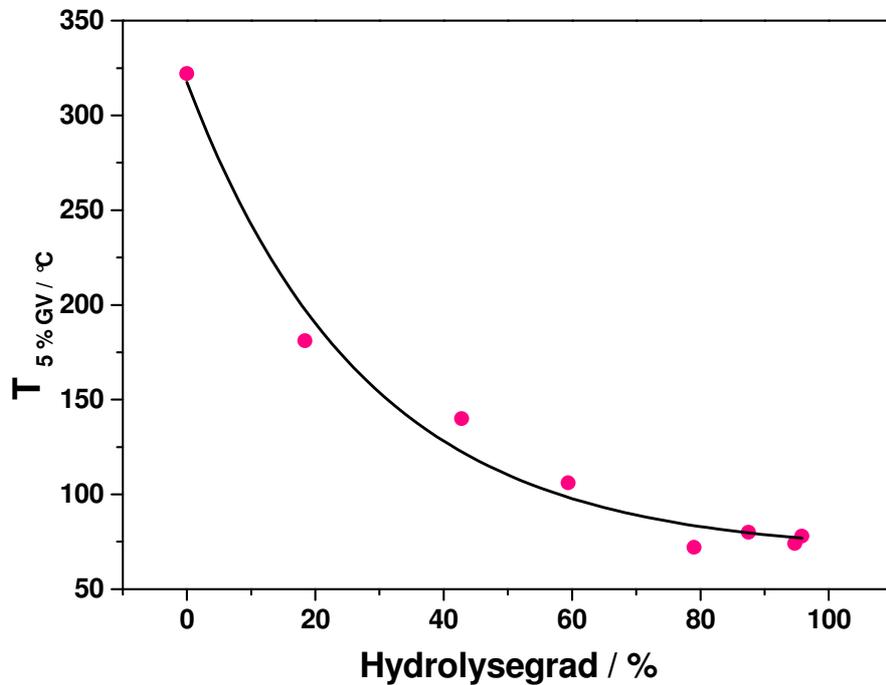


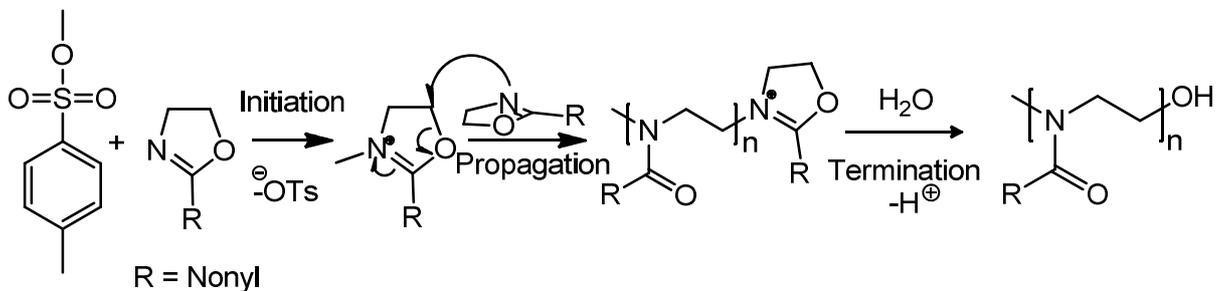
Abb. IV-15: Vergleich der STA-MS Ergebnisse der unterschiedlich hydrolysierten Proben.

Das nicht hydrolysierte Poly(2-Ethyl-2-oxazolin) weist die höchste Temperaturstabilität auf. Die Temperaturstabilität nimmt mit steigendem Hydrolysegrad ab, wobei es zwischen den Proben mit 20% Hydrolyse bis 80% Hydrolyse zu einem starken Abfall kommt. Nach 80% sinkt die Stabilität zwar weiter, aber weist eine deutlich geringere Steigung auf.

3 Partielle Hydrolyse von PNonOx und Charakterisierung der resultierenden Copolymere

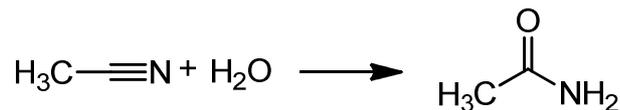
3.1 Kinetik der Hydrolyse des Poly(2-Nonyl-2-oxazolin)s

Die Synthese von Poly(2-Nonyl-2-oxazolin) wurde mittels mikrowellenunterstützter kationischer ringöffnender Polymerisation (CROP) durchgeführt. 15 g 2-Nonyloxazolin, das vorher von der Arbeitsgruppe selbst synthetisiert wurde, und Methyltosylat wurden unter Schutzgas eingewogen, in Acetonitril gelöst und anschließend in der Mikrowelle bei 150 °C für 16 min polymerisiert (Schema IV-4). Es wurde ein Polymerisationsgrad von 60 erreicht.



Schema IV-4: Synthese von PNonOx.

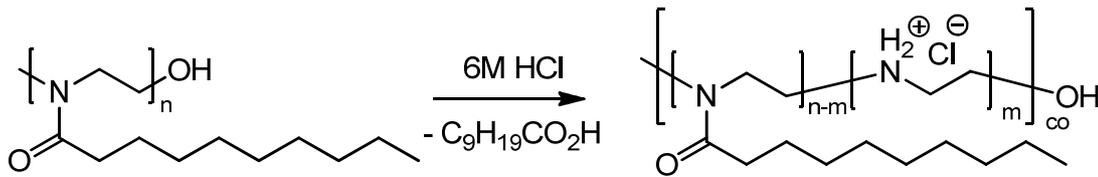
Als Nebenprodukt entstand Acetamid (Schema IV-5), welches durch Abziehen des Lösungsmittels am Rotavapor entfernt werden konnte, wo es mit Chloroform codestilliert wurde.



Schema IV-5: Hydrolyse von Acetonitril zu Acetamid.

Poly(2-Nonyl-2-oxazolin)-co-(Aziridinium Chlorid) wurde durch partielle Hydrolyse von Poly(2-Nonyl-2-oxazolin) synthetisiert.

Dazu wurden 0,5 g des bereits selbst synthetisierten Poly(2-Nonyl-2-oxazolin)s mit 6 M HCl versetzt und bei 160 °C für unterschiedliche Zeiten umgesetzt. Das erhaltene Produkt wurde abfiltriert und die entstandene Decansäure mittels Aceton entfernt.



Schema IV-6: Partielle Hydrolyse von PNonOx.

Auch hier konnten in Abhängigkeit von den Reaktionszeiten unterschiedliche Hydrolysegrade erreicht werden (Tab. IV-3).

Tab. IV-3: Ergebnisse der partiellen Hydrolyse von PNonOx.

Zeit / min	Hydrolysegrade / %		
	1.Durchgang	2.Durchgang	Mittelwerte
5	24,0	23,5	23,7
10	42,7	38,8	40,7
20	61,9	61,4	61,7
25	68,6	73,5	71,0
30	79,5	71,0	75,3
35	78,5	83,2	80,8
40	84,9	86,7	85,8
45	86,6	86,6	86,6

Ähnlich wie bei PEtOx steigt auch hier der Hydrolysegrad zuerst schnell mit der Zeit an, wobei es nach einer Reaktionszeit von 20 min zu einem Abflachen der Kurve kommt (Abb. IV-16).

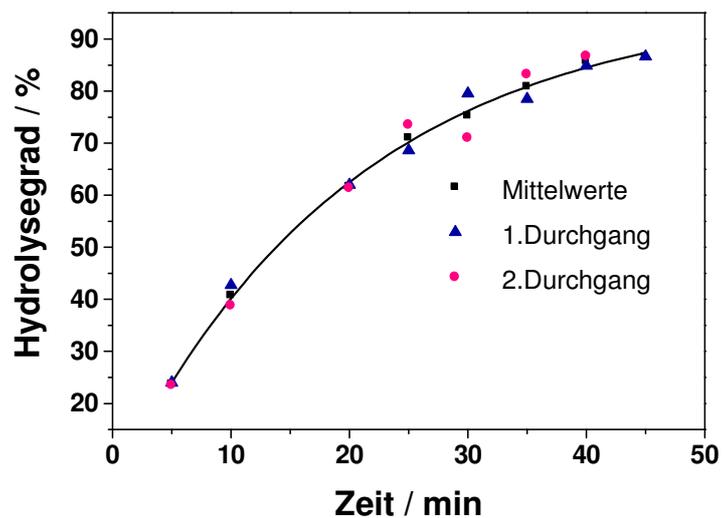


Abb. IV-16: Partielle Hydrolyse des PNonOx.

Bei Poly(2-Nonyl-2-oxazolin) handelt es sich ebenfalls bei der Hydrolyse um eine Reaktion erster Ordnung, wie man in der untenstehenden Abbildung anhand der logarithmischen Auftragung erkennen kann.

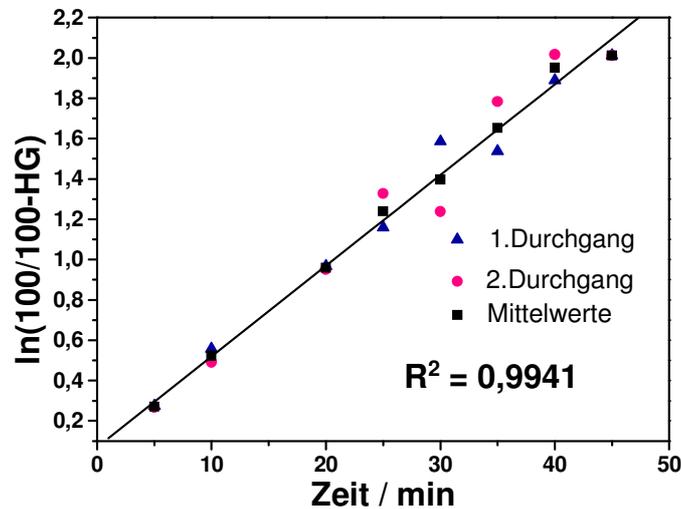


Abb. IV-17: Logarithmische Auftragung der Ergebnisse der partiellen Hydrolyse von PNonOx.

3.2 Charakterisierung

3.2.1 NMR-Analyse

Die NMR-spektroskopischen Messungen dienen zur Produktcharakterisierung und zur Bestimmung des Hydrolysegrades der Copolymere. Zur Bestimmung der Hydrolysegrade wurde das Gesamtintegral der CH₂-Gruppen der Hauptkette neben dem Amid und der neuen CH₂-Gruppen neben dem Amin, mit dem bei steigendem Hydrolysegrad immer kleiner werdenden Integral der CH₃-Gruppe der Seitenkette verglichen (Abb. IV-18 bis IV-20).

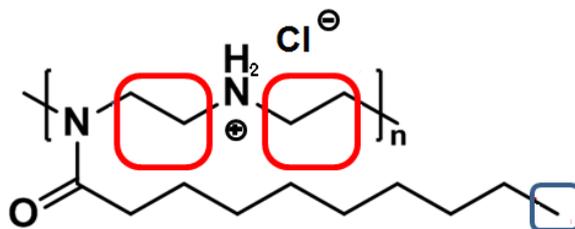


Abb. IV-18: Partiiell hydrolysiertes PNonOx. Das Verhältnis des Gesamtintegrals der CH₂-Gruppen der Hauptkette zur CH₃-Gruppe der Nebenkette gibt Aufschluss über den Hydrolysegrad.

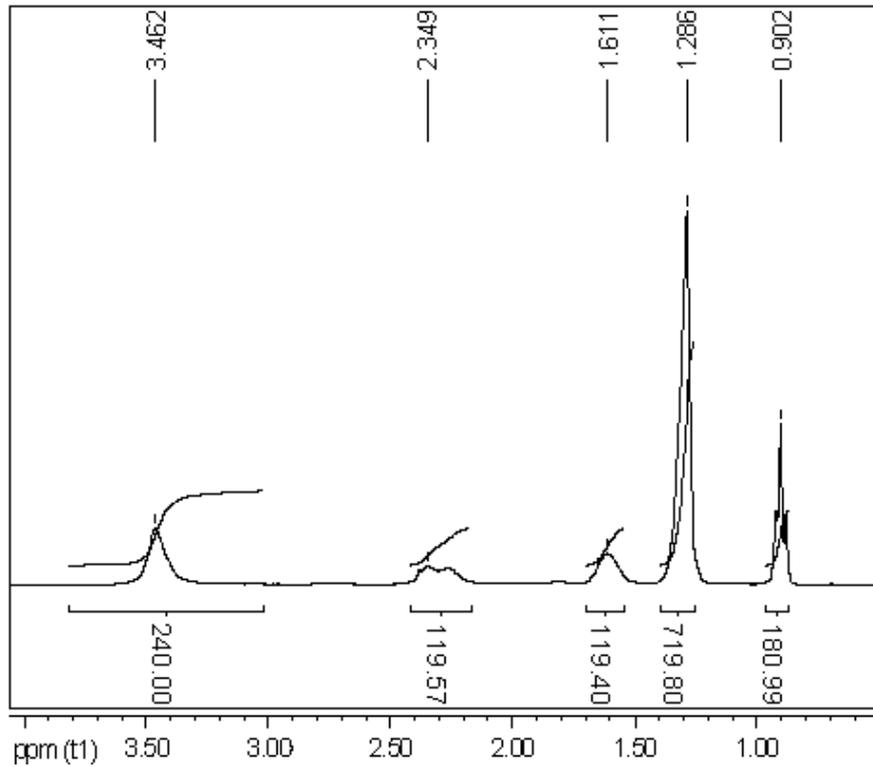


Abb. IV-19: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des unhydrolysierten Poly(2-Nonyl-2-oxazolin)s: 0,853-0,95 (t; 180 H; $\text{COC}_8\text{H}_{16}\text{CH}_3$), 1,22-1,39 (m; 720 H; $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_{12}\text{CH}_3$), 1,61 (s; 120 H; $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{R}$), 2,17-2,42 (m; 120 H; COCH_2R), 3,03-3,81 (pr-s; 240 H; CH_2CH_2), PD = 60.

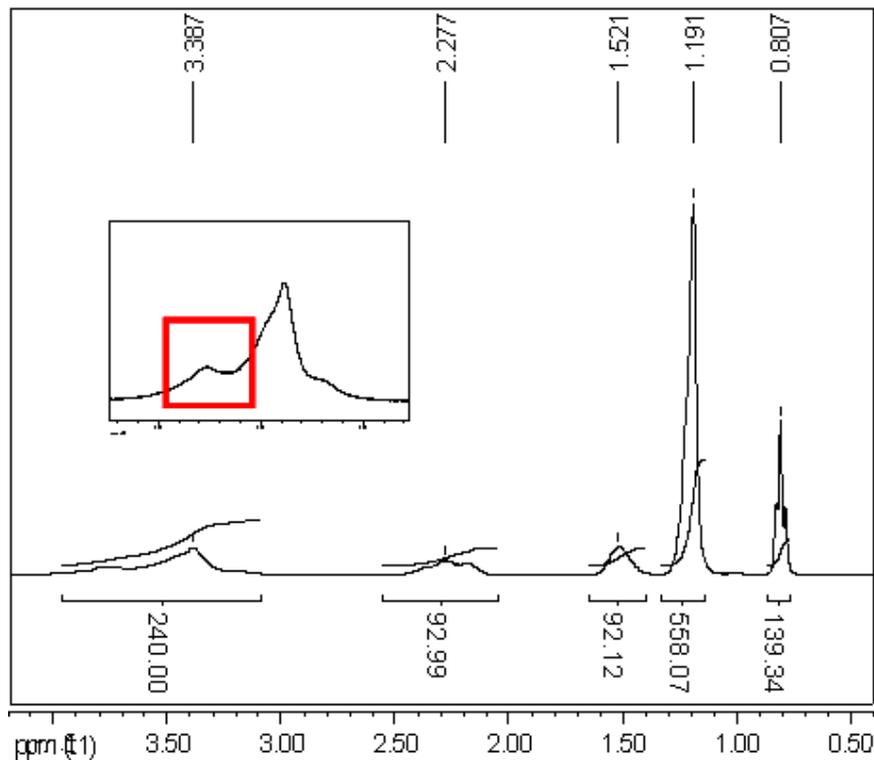


Abb. IV-20: $^1\text{H-NMR}$ des Copolymers: 0,751-0,865 (t; 139 H; $\text{COC}_8\text{H}_{16}\text{CH}_3$), 1,12-1,33 (s; 558 H; $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_{12}\text{CH}_3$), 1,40-1,65 (s; 92 H; $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{R}$), 2,02-2,53 (m; 92 H; COCH_2R), 3,08-3,96 (m; 240 H; $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), PD = 60. Der Hydrolysegrad wird mit Hilfe der Integralverhältnisse berechnet; in diesem Fall handelt es sich um einen Hydrolysegrad von 23%.

3.2.2 DSC-Analyse

Mit Hilfe der Differential Scanning Calorimetry (DSC) wurden die Glasübergangstemperaturen der Poly(2-Nonyl-2-oxazolin)-co-(Aziridinium Chlorid)e und der Schmelzpunkt des Poly(2-Nonyl-2-oxazolin)s bestimmt.

Tab. IV-4: Abhängigkeit der Glasübergangstemperatur vom Hydrolysegrad.

Hydrolysegrad / %	T _g / °C
0	kein T _g , nur m _p
23,5	74,5
42,7	74,6
62,0	78,4
78,5	kein T _g

In der Tabelle IV-4 ist ein Anstieg der Glasübergangstemperaturen mit steigendem Hydrolysegrad zu erkennen, wobei der Unterschied der Glasübergangstemperaturen zwischen 24% und 43% noch sehr gering ist, und es erst bis 62% zu einem sehr steilen Anstieg kommt. Dieser Anstieg der Glasübergangstemperatur liegt darin begründet, dass weniger flexible Seitenketten vorhanden sind. Weiters fällt auf, dass der Glasübergang mit steigendem Hydrolysegrad immer weniger ausgeprägt ist, also wie beim PEtOx immer mehr verschwimmt (Abb. IV-21) was damit zusammenhängt, dass die Eigenschaften des Polyaziridins langsam überwiegen.

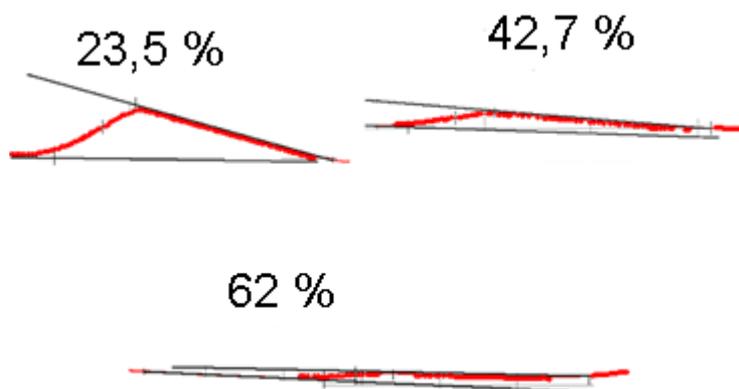


Abb. IV-21: Abhängigkeit des Glasübergang-Peaks vom Hydrolysegrad.

Ab 78,5% Hydrolyse ist kein Glasübergang mehr zu erkennen. Das reine Poly(2-Nonyl-2-oxazolin) weist keinen Glasübergang auf, dafür besitzt es

aber eine Schmelztemperatur bei 143,5 °C und eine Kristallisationstemperatur bei 78,9 °C.

3.2.3 TA-Analyse

Mit Hilfe der TA-Analyse wurde die Stabilität der Poly(2-Nonyl-2-oxazolin)-co-(Aziridin)e überprüft. Zur Probenvorbereitung wurden die Poly(2-Nonyl-2-oxazolin)-co-(Aziridinium Chlorid)e zerkleinert und 24 h in 10 M NaOH eingelegt. Zur Bestimmung der thermischen Stabilität wurde die Temperatur ermittelt, bei welcher die Probe 5% ihres Gewichts verloren hat. Die Zersetzungskurven sind in den Abbildungen IV-22 bis IV-26 zu sehen.

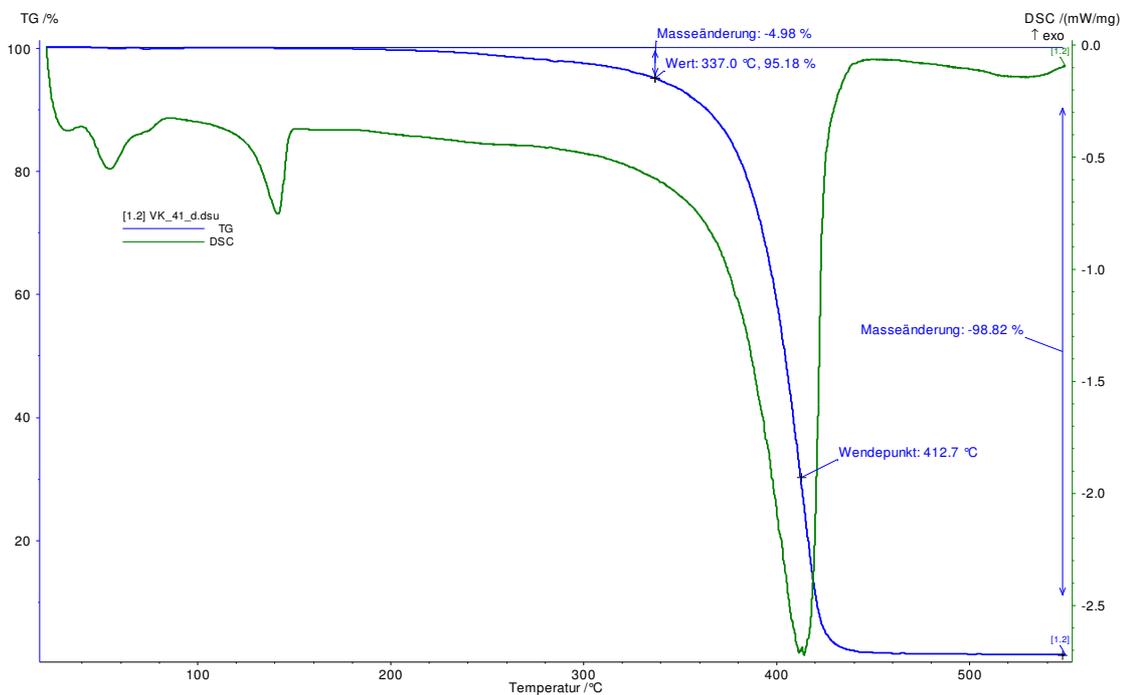


Abb. IV-22: STA-MS Kurve des Poly(2-Nonyl-2-oxazolin): Die Temperaturstabilität reicht bis ca. 250 °C. Bis zu 337 °C kommt es zu einem ca. 5%igen Massenverlust.

IV Ergebnisse und Diskussion

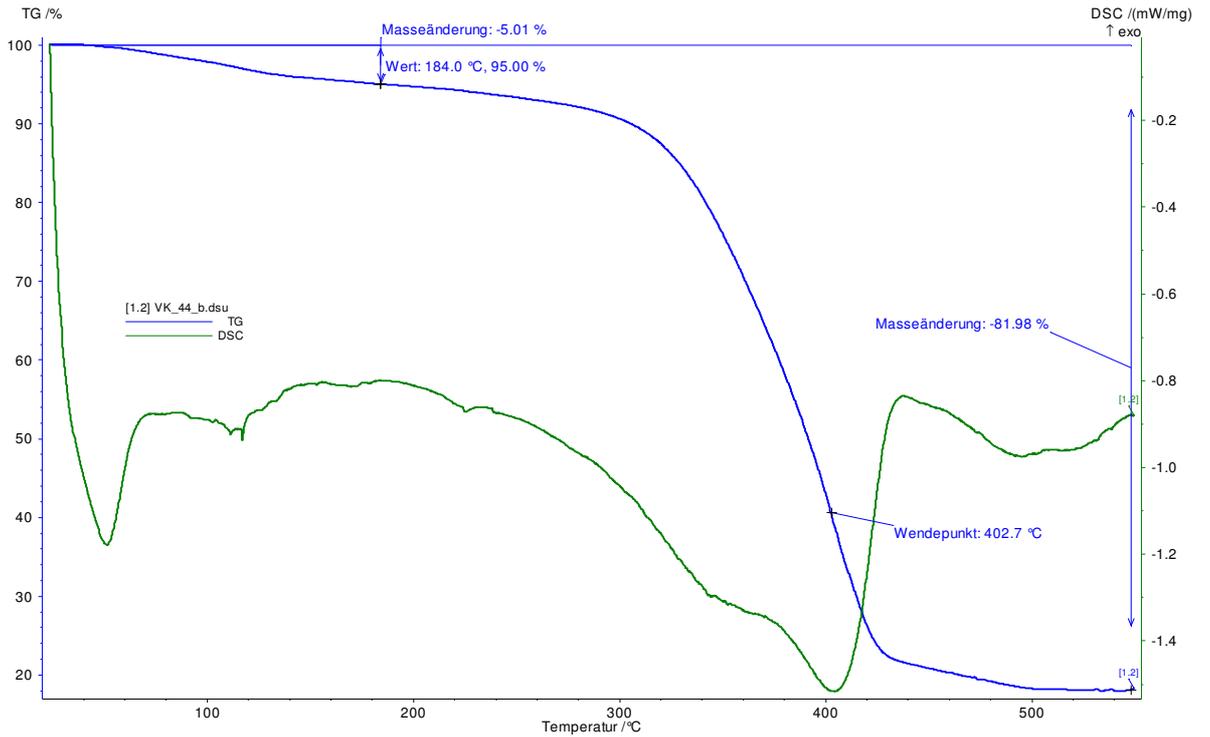


Abb. IV-23: STA-MS Kurve des zu 23,5% hydrolysierten PNonOx: Die Zersetzungskurve beginnt bei ca. 30 °C. 5% iger Massenverlust tritt bis 184 °C auf.

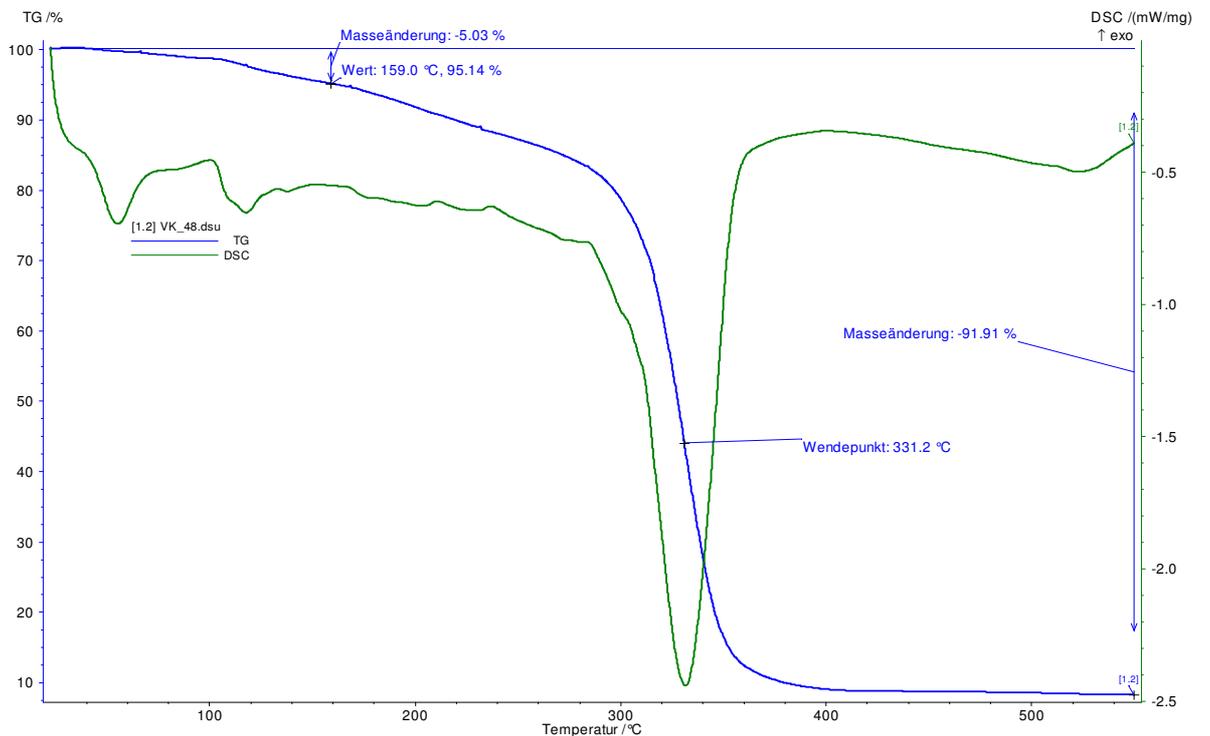


Abb. IV-24: STA-MS Kurve des zu 42,7% hydrolysierten PNonOx: Die Temperaturstabilität ist bis ca. 25 °C gegeben. Bis 159 °C weist das Polymer einen ca. 5%igen Massenverlust auf.

IV Ergebnisse und Diskussion

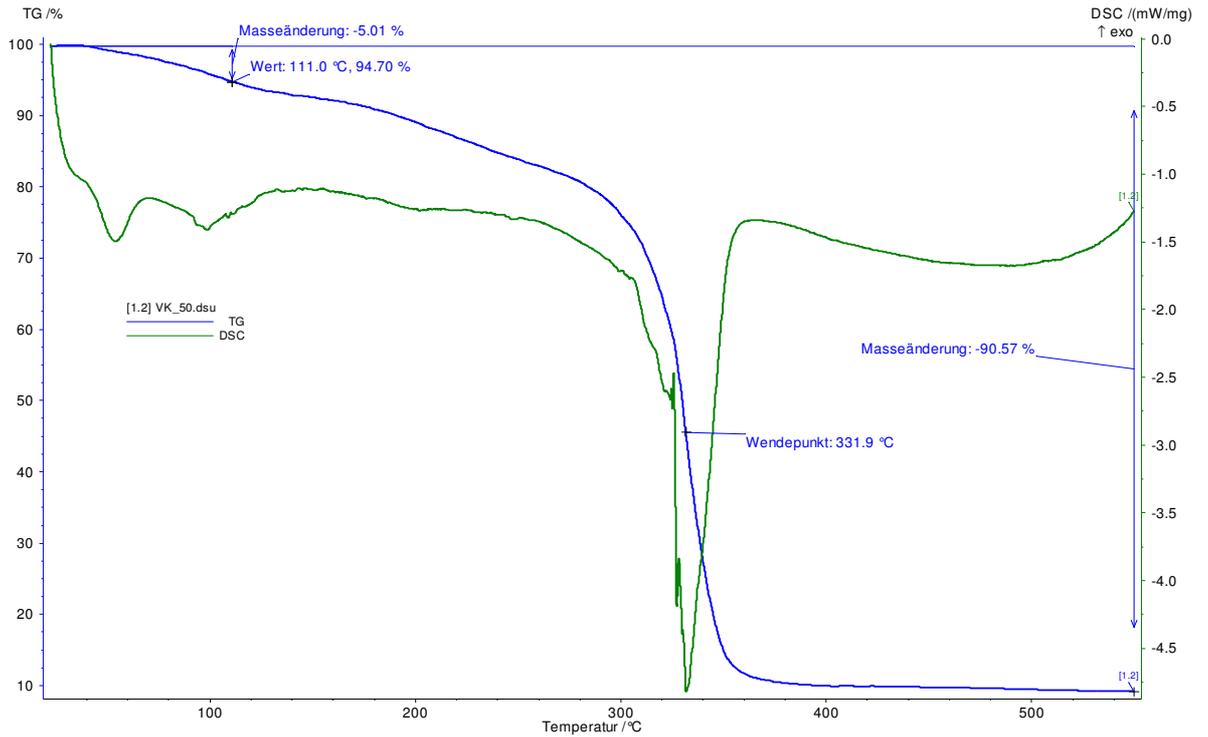


Abb. IV-25: STA-MS Kurve des zu 62% hydrolysierten PNonOx: Die Zersetzungskurve beginnt ca. bei 23 °C. Der 5%ige Massenverlust tritt schon bis zu einer Temperatur von 111 °C auf.

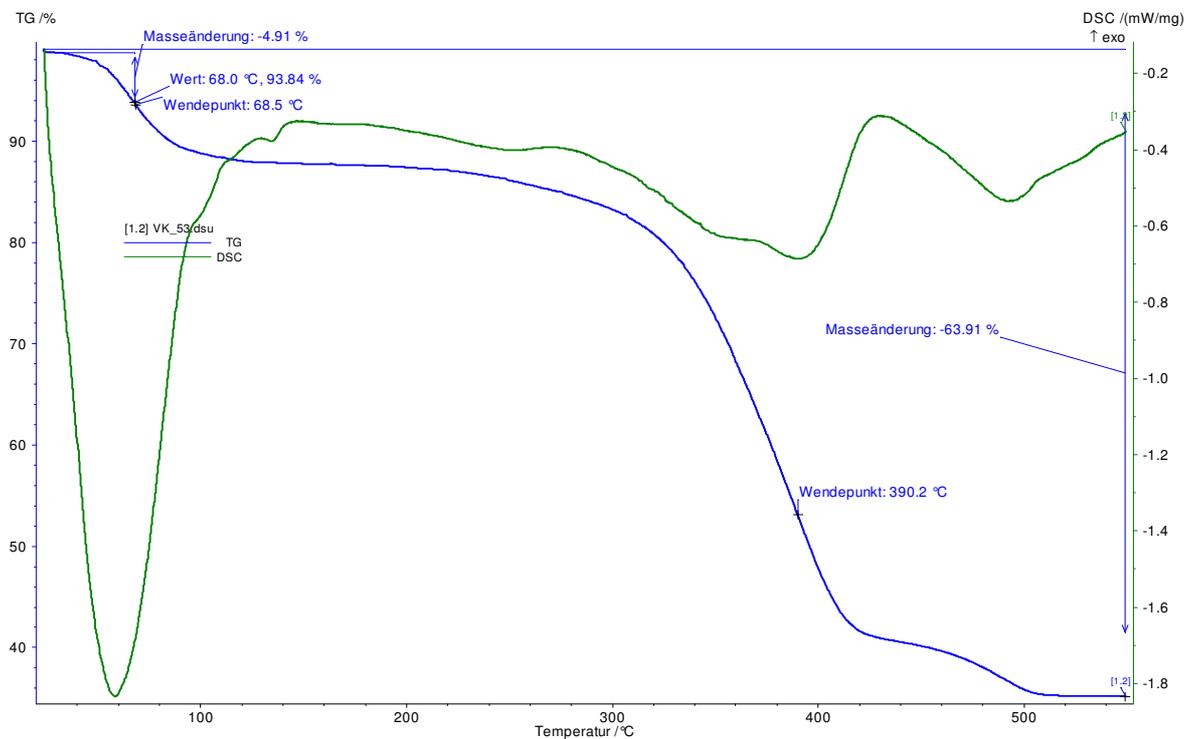


Abb. IV-26: STA-MS Kurve des zu 78,5% hydrolysierten PNonOx: Das Copolymer ist bis ca. 20 °C stabil. Bis 68 °C kommt es zu einem Massenverlust von ca. 5%.

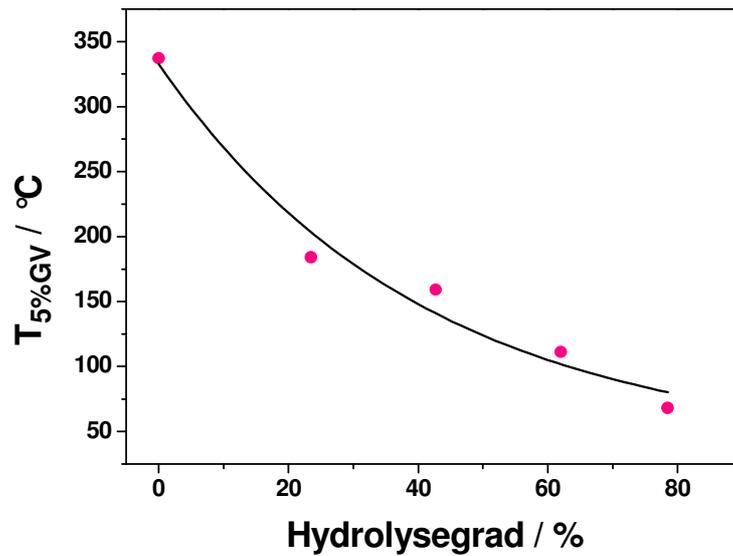


Abb. IV-27: Abhängigkeit der Temperaturstabilität vom Hydrolysegrad.

In der Abbildung IV-27 ist zu erkennen, dass das Polyamid mit steigendem Hydrolysegrad immer instabiler wird. Auch hier kommt es zu einer fast sprunghaften Abnahme der Stabilität vom Polyamid zum 20% hydrolysierten Polyamin.

4 Vergleich der Hydrolyse von PEtOx mit PNonOx sowie der korrespondierenden Copolymere

4.1 Hydrolyse

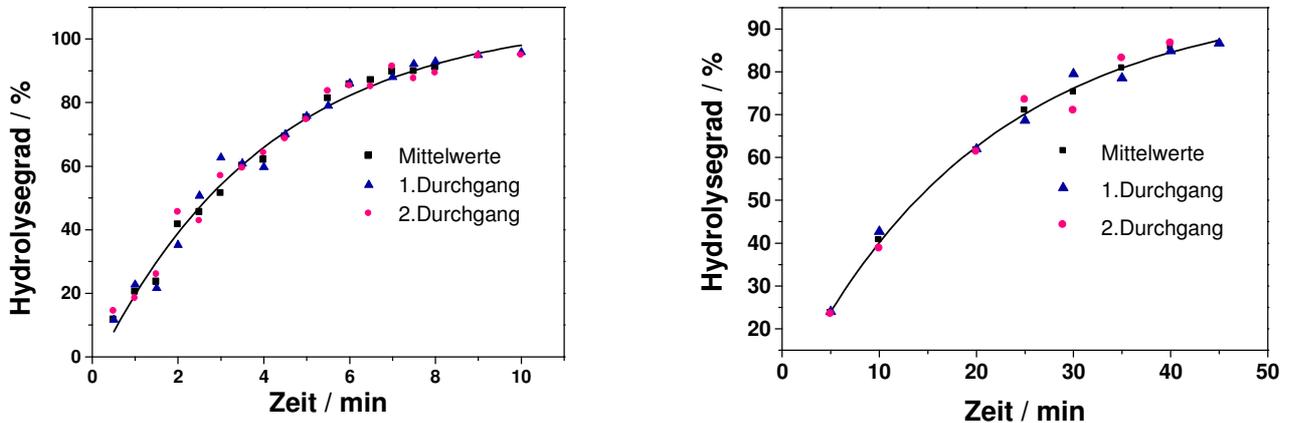


Abb. IV-28: Vergleich der partiellen Hydrolyse des PEtOx (links) mit der des PNonOx (rechts).

Um PNonOx vollständig zu hydrolysieren, braucht man unter identen Bedingungen deutlich längere Reaktionszeiten als bei PEtOx. Über diese Begebenheit wurde auch schon von Hoogenboom und Mitarbeiter⁶⁶ berichtet. Sie verglichen die Kinetik der Hydrolyse von Poly(2-Methyl-2-oxazolin) mit derjenigen von Poly(2-Ethyl-2-oxazolin) und fanden heraus, dass die Reaktion mit PMeOx aufgrund der kürzeren Alkylgruppe schneller abläuft. Weiters ist PNonOx bei Raumtemperatur nicht in Salzsäure löslich, wodurch es auch zu einer Verzögerung in der Reaktionszeit kommt.

4.2 DSC-Vergleich

Poly(2-Ethyl-2-oxazolin) weist im Gegensatz zu Poly(2-Nonyl-2-oxazolin) eine Glasübergangstemperatur auf, PNonOx besitzt einen Schmelzpunkt. Die Copolymere weisen bis zu ca. 60% Hydrolysegrad einen Glasübergang auf, wobei die Glasübergänge mit steigendem Hydrolysegrad immer stärker verschwimmen, da die Eigenschaften des Polyaziridins anfangen zu überwiegen. Der Glasübergangstemperatur nimmt bei beiden Copolymeren mit steigendem Hydrolysegrad kontinuierlich zu. Die partiell hydrolysierten PNonOx besitzen höhere Glasübergänge als PEtOx (Abb. IV-29). Dies ist

darauf zurückzuführen, dass die Seitenketten des PNonOx sich miteinander verhaken, woraus eine geringere Beweglichkeit der Polymerketten resultiert.

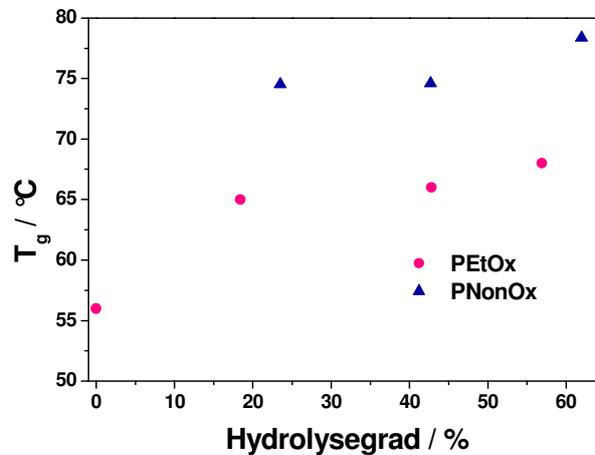


Abb. IV-29: Vergleich der Glasübergangstemperaturen von PEtOx mit PNonOx.

4.3 TA-Vergleich

Die Temperaturstabilität der zwei partiell hydrolysierten Poly(2-Oxazolin)e ist ähnlich; für das PNonOx liegt sie allerdings ein bisschen höher als für das PEtOx. Bei beiden kommt es zu einem sprunghaften Absinken der Stabilität vom unhydrolysierten Polyamid zum hydrolysierten. Bis 80% sinkt die Temperaturstabilität stark, danach kommt es zu keinen großen Änderungen mehr (Abb. IV-30). Aufgrund der Ähnlichkeit der Temperaturstabilität kann man darauf schließen, dass die Hautkette maßgeblich für diese Eigenschaft verantwortlich ist.

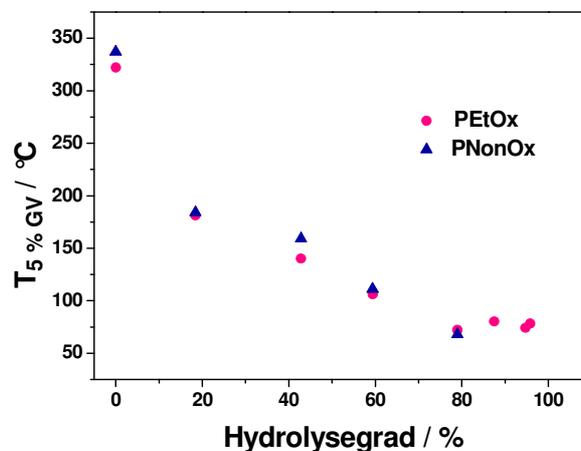


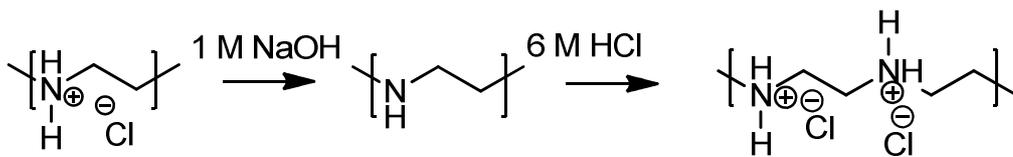
Abb. IV-30: Vergleich der Temperaturstabilität.

5 Gegenionenaustausch des protonierten Polyamin

Zur Demonstration der Zugänglichkeit weiterer Copolymere mit Gegenionen aus mehrprotonigen Säuren, wurde ein Gegenionenaustausch mit einer zweiprotonigen Säure durchgeführt. Prinzipiell wäre auch eine direkte Hydrolyse mit Schwefel- oder einer anderen mehrprotonigen Säure möglich. Die Titration wurde bis zum Aufklaren der Emulsion durchgeführt, wobei hier die Vermutung nahe lag, dass das Polyamin schon vor der 100%igen Protonierung löslich würde. Aus diesem Grund wurde ein Vorversuch mit HCl durchgeführt.

5.1 Rücktitration mit HCl

Zur Rücktitration wurde das vollständig hydrolysierte protonierte Polyamin (PA•HCl) mit der zur Deprotonierung benötigten Menge NaOH versetzt und die entstehende Emulsion mit einer 6 M HCl bis zum Aufklaren titriert.

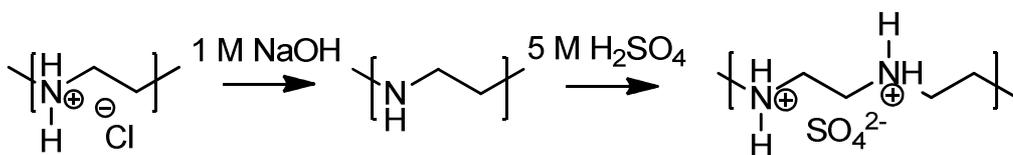


Schema IV-7: Rücktitration mit HCl.

Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt wobei durchschnittlich ein Umschlagsvolumen von 2,17 mL bestimmt wurde. Dieses Volumen entspricht 51,6% des berechneten Volumens, was bedeutet dass nur 51,6% des Polyamins protoniert sein müssen, was jeder zweiten Aminogruppe entspricht, um es zu lösen.

5.2 Gegenionenaustausch mit H₂SO₄

Zum Austausch der Cl⁻-Ionen gegen HSO₄⁻ bzw. SO₄²⁻ wurde das vollständig hydrolysierte protonierte Polyamin mit der zur Deprotonierung benötigten Menge NaOH versetzt und anschließend mit einer 5 M H₂SO₄ bis zum Aufklaren der Emulsion titriert.



Schema IV-8: Gegenionenaustausch mit H₂SO₄.

Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, wobei der Umschlag durchschnittlich bei 1,08 mL H_2SO_4 erfolgte. Dieses Volumen entspricht 21,5% des errechneten Volumens, wenn das Hydrogensulfat als Gegenion gebildet wird, und 43% der voll dissoziierten Schwefelsäure.

Folglich stabilisiert das Sulfation (SO_4^{2-}) die Ladung am protonierten Amin, da dieses Volumen näher dem errechneten liegt, und der Protonierungsgrad am Umschlagspunkt und mit dem Ergebnis der Rücktitration korreliert. Der etwas unterschiedliche Protonierungsgrad des PA der Rücktitration (51,6%) und des Gegenionenaustauschs (43%) kann auf die unterschiedliche Löslichkeit der beiden Salze zurückgeführt werden. SO_4^{2-} Ionen weisen einen größeren Radius als Cl^- Ionen auf, wodurch sie weniger dichte Packungen bilden, was wiederum die Löslichkeit begünstigt.

6 Antibakterieller Test mit Life/Dead Kit

Um die antimikrobielle Aktivität der synthetisierten Copolymere in ihrer protonierten Form zu bestimmen, wurde ein Test mit dem Life/Dead Kit der Firma Invitrogen™ durchgeführt. Dieser Test enthält einen grün fluoreszierenden Farbstoff, Syto 9, der alle Bakterien anfärbt, lebende jedoch stärker als tote, und einen rot fluoreszierenden Farbstoff, Propidium Iodid, der nur die Bakterien anfärbt, deren Membran beschädigt wurde. Aus dem Verhältnis der Emissionen von Syto 9 (grün) zu Propidium Iodid (rot) kann auf die antimikrobielle Aktivität einer Verbindung geschlossen werden, mit der die Bakterien behandelt wurden. Je höher dieses Verhältnis ist, desto mehr Bakterien sind lebendig, und die getestete potentiell antimikrobiell wirksame Verbindung ist umso weniger antimikrobielle.

Es wurden 5 Glasvials mit einer Polymerschicht versehen, von denen 3 zu weiteren antimikrobiellen Tests herangezogen wurden. Die vorbereiteten Glasvials wurden mit 2 mL einer Bakteriensuspension von *E. coli* versetzt und für 22½ Stunden bei 37 °C inkubiert und geschüttelt. Danach wurden die Proben in eine Mikrotiterplatte überführt, mit der Farbstofflösung vermischt und nach 15 min Inkubationszeit vermessen (Abb. IV-31). Als Blindprobe wurde eine 0,9%ige NaCl Lösung verwendet

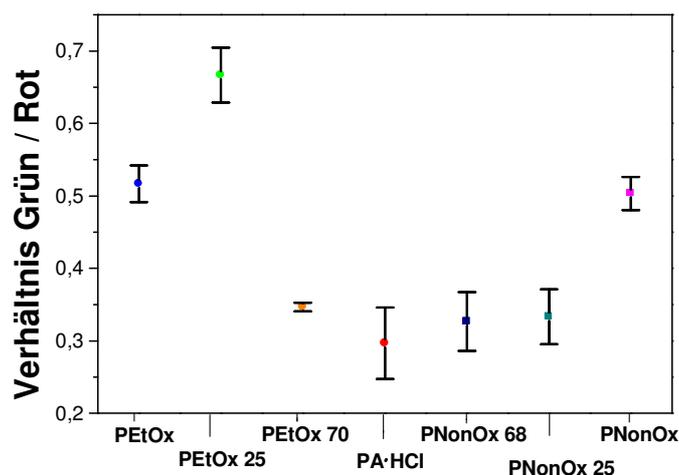


Abb. IV-31: Ergebnisse des antimikrobiellen Tests der Polyoxazoline, des vollständig hydrolisierten Poly(Aziridinium Chlorid)s und ausgewählter partiell hydrolisierter Copolymere in ihrer protonierten Form mit Life/Dead Kit gegen *E. coli*.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit der Kalibration von Molecular Probes verglichen.⁶⁷ Die protonierten Polymere können in zwei Klassen aufgeteilt werden. Die erste Gruppe beinhaltet all jene, die eine Aktivität mit einem Verhältnis von Grün/Rot größer als 0,5 aufweisen. Das bedeutet, dass nach der Inkubationszeit von den ursprünglichen Bakterien noch mindestens 20% am Leben waren. Zu dieser Gruppe gehören PEOx, PNonOx und das protonierte, zu 25% hydrolysierte PEOx. Zur zweiten Klasse gehören all jene protonierten Polymere, die eine Aktivität mit einem Verhältnis von Grün/Rot kleiner als 0,5 aufweisen. In diese Gruppe gehören das PA•HCl, das zu 70% hydrolysierte PEOx, das zu 25% hydrolysierte PNonOx und das zu 68% hydrolysierte PNonOx. In dieser Gruppe von Polymeren blieben nach der Inkubationszeit höchstens 3% der Bakterien am Leben. Die antimikrobielle Wirksamkeit nimmt mit steigendem Hydrolysegrad zu, wobei PNonOx nur zu 25% hydrolysiert werden muss, um eine ähnliche Aktivität aufzuweisen wie PA•HCl, während das zu 25% hydrolysierte PEOx eine deutlich schlechtere antimikrobielle Aktivität aufweist. Dieser deutliche Unterschied der bioziden Wirkung ist auf die unterschiedliche Länge der Seitenketten zurückzuführen, die im Fall der C₉-Kette eine zusätzliche Wechselwirkung mit der Bakterienmembran zu ermöglichen scheint.

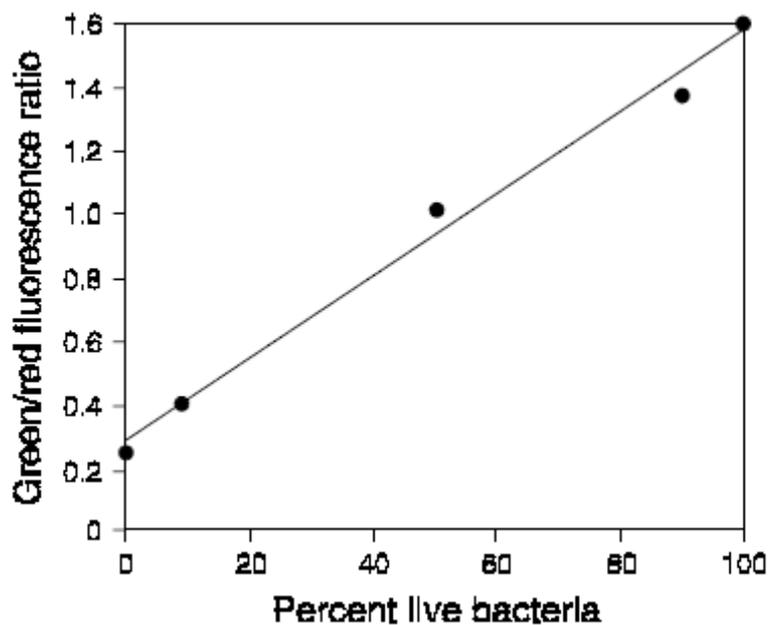


Abb. IV-32: Kalibration von Molecular Probes.⁶⁷

V Zusammenfassung

Antimikrobielle Polymere besitzen ein breites Anwendungsspektrum, von Implantaten über Hygieneartikel bis zu Wasserrohren etc. Sie haben somit ein großes Zukunftspotential. Protonierte Polyamine zeigten in vorangegangenen Untersuchungen eine gute antimikrobielle Wirksamkeit und sind sehr einfach durch vollständige saure Hydrolyse von Poly(2-Oxazolin)en zu synthetisieren. Diese Diplomarbeit beschäftigte sich mit der partiellen sauren Hydrolyse von zwei Poly(2-Oxazolin)en. In den korrespondierenden Poly(2-Oxazolin)-co-(Aziridinium Salzen) sollte einerseits die positive Ladung am Stickstoff bereitgestellt werden, die als Strukturmerkmal für biozide Wirksamkeit bekannt ist. Andererseits sollte der Einfluss der verbliebenen Seitenketten auf die antimikrobielle Wirksamkeit untersucht werden. Von den längeren Seitenketten wurde erwartet, dass sie zu einer schnelleren Lysis der Zelle führen. Weiters wurden thermoanalytische Bestimmungen der partiell hydrolysierten Polymere durchgeführt, um die Stabilität der resultierenden Copolymere zu testen. Die antimikrobielle Wirksamkeit wurde anschließend in einem Mikrotiterplattenbasierten Schnelltest validiert.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Poly(2-Ethyl-2-oxazolin) und Poly(2-Nonyl-oxazolin) unter Mikrowellenbestrahlung analog der Literaturbeschreibung synthetisiert. In weiterer Folge wurden diese Polymere im Rahmen einer Kinetikbestimmung mit 6 M HCl in der Mikrowelle bei 160 °C partiell hydrolysiert. Die Kinetikbestimmung ergab, dass es sich bei der partiellen Hydrolyse beider Polymere um eine Reaktion erster Ordnung handelt. Es wurde beobachtet, dass die Seitenkette einen Einfluss auf die Reaktionszeit hat, was unter anderem auf die unterschiedliche Löslichkeit zurückzuführen ist. PNonOx benötigt unter identen Bedingungen deutlich längere Zeiten als PEtOx zur vollständigen Hydrolyse (60 min vs. 10 min), ist aber im Gegensatz zu PEtOx nicht in der verwendeten Salzsäure löslich. Auch die Temperatur während der Mikrowellenbestrahlung hat einen großen Einfluss

auf die Reaktionsgeschwindigkeit, was durch den Vergleich mit Ergebnissen aus der Literatur bestätigt wurde.

Mit Hilfe der Differential Scanning Calorimetry DSC wurden die Glasübergangstemperaturen der Ausgangspolymere und der korrespondierenden protonierten Copolymere bestimmt. PNonOx weist im Gegensatz zu PEtOx keinen Glasübergang auf, besitzt aber einen Schmelzpunkt. Die Copolymere weisen nur bis ca. 60% Hydrolysegrad einen Glasübergang auf, wobei dieser mit steigendem Hydrolysegrad ansteigt. Die Glasübergangstemperaturen von den partiell hydrolysierten Poly(2-Nonyl-2-oxazolin)en sind höher als die der partiell hydrolysierten Poly(2-Ethyl-2-oxazolin)e, da sich die langen C₉-Seitenketten ineinander verhaken.

Die Temperaturstabilität der deprotonierten Copolymere wurde mit Hilfe der Thermoanalyse ermittelt, wobei die Temperatur bei 5% Gewichtsverlust bestimmt wurde. Hier wiesen beide Polymere sowie deren korrespondierende Copolymere eine ähnliche Stabilität auf. Aufgrund dieser Ähnlichkeit kann man darauf schließen, dass die Hauptkette für die Temperaturstabilität der Polymere verantwortlich ist.

Zum exemplarischen Nachweis der leichten Zugänglichkeit von polymerbasierten Substanzbibliotheken wurde im Poly(Aziridinium Chlorid) ein Gegenionenaustausch mit Schwefelsäure durchgeführt. Der Gegenionenaustausch konnte erfolgreich durch Neutralisations-Reprotonierungsschritte durchgeführt werden. Das protonierte Poly(Aziridinium Salz) weist je nach Gegenion eine unterschiedliche Löslichkeit auf, was auf die unterschiedliche Größe der Chlorid-/Sulfat-Ionen zurückzuführen ist: Das Sulfat-Ion ist größer als das Chlorid-Ion, weshalb es nicht so dichte Packungen bildet, sodass die Löslichkeit begünstigt wird.

Abschließend wurde ein Mikrotiterplatten-basierter Schnelltest zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität ausgewählter protonierter Copolymere durchgeführt. Dabei konnten die Polymere anhand ihrer antimikrobiellen Aktivität in zwei Gruppen unterteilt werden: Die erste Gruppe, bestehend aus PEtOx, PNonOx und dem zu 25% hydrolysierten PEtOx wies nur eine geringe antimikrobielle Wirkung auf; nach der Inkubationszeit waren bei diesen Proben mindestens 20% der Bakterien am Leben. In der zweiten Gruppe, zu der PA•HCl, das zu 70% hydrolysierte

PEtOx, das zu 25% hydrolysierte PNonOx und das zu 68% hydrolysierte PNonOx gehören, blieben höchstens 3% der Bakterien am Leben. Als allgemeiner Trend ist somit zu erkennen, dass die antimikrobielle Aktivität mit dem Hydrolysegrad steigt. Auffällig ist zudem, dass PNonOx nur zu 25% hydrolysiert werden muss, um eine ähnliche biozide Wirkung zu erhalten wie PA•HCl. Poly(2-Nonyl-2-oxazolin)-co-(Aziridinium Chlorid)e weisen aufgrund ihrer Seitenkettenlänge bei niedrigeren Hydrolysegraden eine höhere Aktivität auf als die entsprechenden Poly(2-Ethyl-2-oxazolin)-co-(Aziridinium Chlorid)e, was eine zusätzliche Wechselwirkung der C₉-Kette mit der Bakterienmembran plausibel erscheinen lässt. Der geringe Hydrolysegrad von PNonOx hat den Vorteil, dass diese Polymere temperaturstabiler sind.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass Poly(2-Oxazolin)-co-(Aziridinium Salz)e einfach zu synthetisieren sind und eine gute antimikrobielle Wirksamkeit aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass die protonierten partiell hydrolysierten PNonOx aufgrund ihrer längeren Seitenketten eine bessere antimikrobielle Aktivität als die protonierten, partiell hydrolysierten PEtOx aufwiesen; sodass eingangs formulierte Überlegungen bestätigt werden konnten. Dieses Ergebnis unterstützt insbesondere die derzeitige Diskussion über den Wirkungsmechanismus antimikrobiell wirksamer Polymere, in der die synergistische Wirksamkeit kationischer (protonierter Ammonium-)Gruppen und hydrophober (Alkyl-)Seitenketten postuliert wird.

VI Abstract

Antimicrobial polymers have a broad spectrum of applications such as implants, hygienic articles, water pipes etc. and have a great future potential. Earlier investigations have shown that protonated polyamines have good antimicrobial properties. This polyamines can be easily synthesised from the acid-mediated hydrolysis of poly(2-oxazoline)s.

This master thesis focussed on the partial hydrolysis of two poly(2-oxazoline)s to yield the corresponding poly(2-oxazoline)-co-(aziridinium salt), exhibiting positively charged ammonium ions, which are the identified structural unit providing antimicrobial activity. Furthermore, the influence of the different polymeric side-chains on the antimicrobial property was investigated, aiming at the verification of the assumption that longer side-chains contribute to a faster cell lysis. Furthermore, thermo analytic measurements were performed to quantify the stability of the corresponding copolymers. Additionally, the antimicrobial activity was validated with a microtiterplate-based quick scan.

In the first part of this master thesis, PEtOx and PNonOx were synthesised under microwave irradiation according to literature recipes. Subsequently, kinetic investigations on the hydrolysis reactions were performed. The polymers were mixed with 6 M HCl and allowed to react under microwave irradiation at a temperature of 160 °C. The hydrolysis showed first order kinetics. Additionally, the influence of the side-chains on the reaction time was investigated. The reason for the different reaction rates under otherwise identical reaction conditions is assumed to originate mainly from the different solubilities of the starting materials: PNonOx requires longer reaction times for complete hydrolysis than PEtOx (60 vs. 10 min), but, in contrast to PEtOx, PNonOx is not soluble in hydrochloric acid.

Differential scanning calorimetry (DSC) was used for the determination of the copolymers' glass transition temperatures. In contrast to PEtOx, PNonOx showed a melting point instead of a glass transition. Interestingly, only copolymers with less than 60% hydrolysis showed a glass transition. The glass transition temperature increased with increasing level of hydrolysis. The glass transition temperature is higher for the partial hydrolysed PNonOx than for PEtOx because the longer C₉-side chains interlock.

The temperature stability of the deprotonated copolymers was investigated with thermo analysis (weight loss of 5%). Both poly(2-oxazoline)s and the corresponding copolymers have similar temperature stabilities, indicating that the main chain of the polymer is mainly responsible for the temperature stability.

In order to prove the accessibility of polymer-based substance libraries, the chloride anion in poly(aziridinium chloride) was exchanged by treatment with sulphuric acid. The counter-ion was successfully exchanged by neutralisation-reprotonation steps. The protonated poly(aziridinium salt)s showed a different solubility, depending on the counter ion, as sulphate ions are bigger and thus disturb the close-packing of spheres compared to the chloride ion. This effect increases the solubility of the corresponding salt.

Additionally, a short antimicrobial test with certain copolymers showed that with increasing level of hydrolysis the antimicrobial activity also increased. The copolymers of PNonOx have shown better antimicrobial properties as the copolymers of PEtOx due to their longer alkyl side-chain.

Finally, the antimicrobial activity of the protonated copolymers was analyzed in a quick-test with microtiterplates. The results showed that the polymers could be subdivided into two groups with different antimicrobial activities. The first group consisting of PEtOx, PNonOx and the PEtOx with 25% hydrolysis showed low antimicrobial activities. After the incubation time, a minimum of 20% of the bacteria were still alive. The second group consisting of PA•HCl, PEtOx with 70% hydrolysis, and PNonOx with 25% and 68% hydrolysis, respectively, killing 97% or more of the bacteria. The antimicrobial activity increases with the degree of hydrolysis. Only 25% of PNonOx has to be hydrolyzed to realize a similar biocide activity as PA•HCl. Poly(2-nonyl-2-oxazoline)-co-(aziridinium chloride)s show a significantly better activity

compared to poly(2-ethyl-2-oxazoline)-co-(aziridinium chloride)s because of the additional interaction of the C₉ chain with the bacterial membrane. Furthermore, due to the smaller degree of hydrolysis, these polymers are more temperaturestable.

In this master thesis, it was shown, that poly(2-oxazoline)-co-(aziridinium chloride)s are easy to prepare and have good antimicrobial activities. The partially hydrolyzed PNonOx showed higher antimicrobial activities than partial hydrolyzed PEtOx due to the longer side-chains, which confirmed the thesis' initial assumptions. This observation particularly contributes to the current structure-activity discussion of the biocidal activity of polymers, in the course of which the combined activity of cationic (protonated ammonium) groups and hydrophobic (alkyl) side-chains has been postulated.

VII Experimenteller Teil

1 Geräte

1.1 *Nuclear Magnetic Resonance NMR*

Die ^1H -NMR-Spektren wurden mit Hilfe eines Bruker Avance III 300 MHz Spektrometer aufgenommen. Die Proben wurden entsprechend ihren Löslichkeiten in deuteriertem Chloroform, Deuteriumoxid oder deuteriertem Methanol gelöst. Die Referenzierung erfolgt bei Proben, die in deuteriertem Chloroform gelöst wurden mit Hilfe des Restsignals bei 7,26 ppm, bei Proben in Deuteriumoxid bei 4,79 ppm und bei Proben in deuteriertem Methanol bei 3,31 ppm. Die Messung erfolgte mit 32 Scans und 5 s delay.

1.2 *Thermoanalyse TA*

Die thermische Stabilität der Proben wurde mit einem STA-Gerät der Firma Netzsch 449C bestimmt. Als Spülgas wurde Helium verwendet. Vor dem Aufheizvorgang wurde die Temperatur für 5 min bei 20 °C konstant gehalten, danach wurde innerhalb von 15 min auf die Endtemperatur von 550 °C mit einer Heizrate von 37 °C/min aufgeheizt.

1.3 *Differential Scanning Calorimetry DSC*

Mit Hilfe der DSC lassen sich die Glasübergangstemperaturen der Polymere bestimmen. Als Gerät wurde ein Pyris Diamond der Firma Perkin Elmer verwendet. Es wurden vier Heizläufe vermessen: Der erste und letzte mit einer Heizrate von 20 °C/min, die anderen beiden mit 10 °C/min. Die Glasübergangstemperaturen wurden im zweiten Heizlauf bestimmt (Heizrate 10 °C/min), die Schmelztemperatur im ersten Heizlauf (Heizrate 20 °C/min). Die Kühlung der Proben erfolgte mit flüssigem Stickstoff.

1.4 *Antimikrobielle Bestimmungen*

Die Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität wurde mit dem Life/Dead Kit der Firma Invitrogen™ durchgeführt und dient zur Detektion von lebenden und toten Bakterienzellen. Bei diesem Verfahren kommen zwei Farbstoffe zum Einsatz, die die Bakterien unterschiedlich anfärben. Syto 9 färbt alle Bakterien an, jedoch lebende stärker als tote, indem es an die Zellwand

bindet, während Propidium Iodid nur Bakterien mit beschädigten Zellwänden anfärbt, da es mit der DNA interkaliert. Beide Farbstoffe sind bei 485 nm anregbar, die grüne Fluoreszenz erfolgt bei Syto 9 bei 520 nm, die rote Fluoreszenz von Propidium Iodid bei 612 nm. Der Zelltyp und der Gramcharakter nehmen Einfluss auf das Ausmaß der roten Fluoreszenz. Es wurden jeweils dreifach Bestimmungen durchgeführt. Zur Vermessung der Proben wurden diese in eine 96Well Mikrotiterplatte überführt.

Die Messung wurde auf dem Gerät Molecular Devices der Firma Gemini XS auf der Biochemie durchgeführt. Als Software wurde Spectra max 4.7 verwendet.

1.5 Mikrowellenreaktor

Es wurde der Mikrowellenreaktor Initiator™ (2.45 GHz) der Firma Biotage verwendet. Bei diesem Modell sind Reaktionsvolumina von 0,2-20 mL prozessierbar. Die Reaktionsgefäße sind aus Glas und werden mit Caps und Septum verschlossen. Die Reaktionen wurden bei 140 °C-160 °C durchgeführt.

2 Chemikalien/Materialien

Die benötigten Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich Chemical Co. und Fluka bezogen. 2-Nonyl-2-oxazolin wurde in Vorarbeit von der Arbeitsgruppe synthetisiert. Die verwendeten Lösungsmittel wurden nach Standardprozeduren gereinigt und absolutiert: Das absolute Dichlormethan wurde über Calciumhydrid destilliert. 2-Ethyl-2-oxazolin und Methyltosylat wurden über Na₂SO₄ destilliert und in Argon-Atmosphäre gelagert. Das Arbeiten unter Schutzgas wurde ebenfalls in Argon-Atmosphäre durchgeführt. Für die antimikrobiellen Tests wurden 96-Well Mikrotiterplatten des Models 3603 der Firma Corning Incorporated verwendet.

3 Synthese

3.1 Synthese von Poly(2-Ethyl-2-oxazolin)

Zur Synthese von Poly(2-Ethyl-2-oxazolin) wurde eine Stammlösung mit 2-Ethyl-2-oxazolin (20,4 g; 0,206 mol), Methyltosylat (0,627 g; 3,37 mmol) und 30 mL Dichlormethan abs. unter Schutzgas hergestellt. Von dieser Stammlösung wurden jeweils 15 mL in ein Mikrowellengefäß überführt, das Vial verschlossen und in der Mikrowelle bei 140 °C für 12 min polymerisiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel abgezogen und das Produkt im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 99% weißer Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ (δ , 20 °C, CDCl_3 , 300 MHz): 0,980-1,20 (m, 180 H, COCH_2CH_3), 2,13-2,46 (m; 120 H; COCH_2CH_3), 3,44 (s; 240 H; $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$).

DSC: $T_g = 56$ °C.

STA: Temperatur bei 5% Massenverlust = ca. 322 °C.

3.2 Synthese Poly(2-Ethyl-2-oxazolin)-co-(Aziridinium Chlorid)

Für die Synthese von Poly(2-Ethyl-2-oxazolin)-co-(Aziridinium Chlorid) wurde PEtOx (0,5 g; 5,04 mmol) in ein Mikrowellenvial eingewogen, in 6 M HCl (2 mL; 0,01 mol) gelöst und bei 160 °C in der Mikrowelle für unterschiedliche Zeiten hydrolysiert. Die Isolation des Produktes wird im Unterkapitel VII-3.3 näher beschrieben. Die Ausbeuten sind in der Tabelle VIII-1 angeführt.

3.3 Synthese von Poly(2-Ethyl-2-oxazolin)-co-(Aziridin)

Zur Isolation der partiell hydrolysierten PEtOx werden die Poly(2-Ethyl-2-oxazolin)-co-(Aziridinium Chlorid)e mit 10 M NaOH ausgefällt und die Produkte danach im Vakuum getrocknet (Tab. VII-1).

Tab. VII-1: Parameter der Hydrolyse von PEtOx.

Reaktionszeit / min	Hydrolysegrad / %			Einwaage / g		Ausbeute / %	
	Probe 1	Probe 2	Mittelwerte	Probe 1	Probe 2	Probe 1	Probe 2
0,5	11,6	14,4	10,3	0,5005	0,5009	87,3	99,5
1	22,7	18,4	21,4	0,5005	0,5002	88,5	60,6
1,5	21,6	25,9	22,4	0,5009	0,5002	90,4	67,8
2	35,2	45,5	39,6	0,5004	0,5007	82,3	95,9
2,5	50,7	42,8	46,8	0,5009	0,5008	99,3	99,0
3	62,7	56,9	51,4	0,5008	0,5008	93,7	98,6
3,5	60,8	59,4	60,1	0,5009	0,5000	98,6	97,5
4	59,7	64,2	61,9	0,5000	0,5003	99,8	99,1
4,5	70,0	68,6	69,3	0,5003	0,5008	99,7	98,5
5	75,7	74,6	75,1	0,5005	0,5000	99,2	97,7
5,5	79,0	83,6	81,3	0,5009	0,5003	98,3	99,8
6	86,0	85,2	85,6	0,5003	0,5009	97,9	97,7
6,5	88,9	85,0	86,9	0,5010	0,5006	98,0	95,5
7	88,0	91,3	89,6	0,5008	0,5010	85,6	99,8
7,5	92,1	87,5	89,8	0,5010	0,5004	85,0	98,9
8	92,8	89,2	91,0	0,5010	0,5009	91,2	97,4
9	94,9	94,7	94,8	0,5003	0,5006	99,2	96,0
10	95,8	94,9	95,3	0,5003	0,5009	99,5	97,3

¹H-NMR 10%-22% Hydrolyse

Beispiel 20% Hydrolyse:

¹H-NMR (δ , 20 °C, D₂O, 300 MHz): 0,857-1,03 (m; 144 H; NCOCH₂CH₃), 2,14-2,41 (m; 95 H; NCOCH₂CH₃), 2,53-2,78 (m; 49 H; NHCH₂CH₂), 3,18-3,71 (pr-d; 192 H; NCOC₂H₅CH₂CH₂).

¹H-NMR 23%-100% Hydrolyse

Beispiel 75% Hydrolyse:

¹H-NMR (δ , 20 °C, MeOD, 300 MHz): 1,00-1,18 (t; 44 H; NCOCH₂CH₃), 2,31-2,52 (m; 29 H; NCOCH₂CH₃), 2,63-2,87 (m; 181 H; NHCH₂CH₂), 3,40-3,70 (m; 59 H; NCOC₂H₅CH₂CH₂).

3.4 Synthese von Poly(2-Nonyl-2-oxazolin)

Zur Synthese von Poly(2-Nonyl-2-oxazolin) wurde eine Stammlösung mit 2-Nonyl-2-oxazolin (15,0 g; 76,1 mmol), Methyltosylat (0,236 g; 1,27 mmol) und 38 mL Acetonitril dry unter Schutzgas hergestellt. Es wurden jeweils 15 mL der Stammlösung in ein Mikrowellengefäß überführt, dieses verschlossen und bei 150 °C für 16 min polymerisiert. Anschließend wurde das Polymer abfiltriert, mit Acetonitril nachgewaschen, und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 94% weißer Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (δ , 20 °C, CDCl_3 , 300 MHz): 0,853-0,95 (t; 180 H; $\text{COC}_8\text{H}_{16}\text{CH}_3$), 1,22-1,39 (m; 720 H; $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_{12}\text{CH}_3$), 1,611 (s; 120 H; $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{R}$), 2,17-2,42 (m; 120 H; COCH_2R), 3,03-3,81 (pr-s; 240 H; $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$).

DSC: $m_p = 143,5$ °C.

STA: Temperatur bei 5% Massenverlust = ca. 337 °C.

3.5 Synthese Poly(2-Nonyl-2-oxazolin)-co-(Aziridinium Chlorid)

Für die Synthese von Poly(2-Nonyl-2-oxazolin)-co-(Aziridinium Chlorid) wurde Poly(2-Nonyl-2-oxazolin) (0,500 g; 2,53 mmol) in ein Mikrowellenvial eingewogen mit 6 M HCl (2 mL; 0,01 mol) versetzt und zu unterschiedlichen Zeiten in der Mikrowelle bei 160 °C hydrolysiert. Der entstandene hellgelbe Feststoff wurde mit 5 mL Aceton gewaschen, das Produkt abfiltriert und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: weißer Feststoff (Tab. VIII-2)

Tab. VII-2: Parameter der partiellen Hydrolyse von PNonOx.

Reaktionszeit / min	Hydrolysegrad / %			Einwaage		Ausbeute	
	Probe 1	Probe 2	Mittelwerte	Probe 1	Probe 2	Probe 1	Probe 2
5	24,0	23,5	23,7	0,5008	0,5006	95,5	96,2
10	42,7	38,8	40,7	0,5013	0,5005	87,0	92,6
20	61,9	61,4	61,7	0,5003	0,5004	96,7	98,7
25	68,6	73,5	71,0	0,5004	0,5009	84,2	99,2
30	79,5	71,0	75,3	0,5005	0,5005	81,4	99,5
35	78,5	83,2	80,8	0,5008	0,5008	81,4	99,4
40	84,9	86,7	85,8	0,5003	0,5004	81,6	85,1
45	86,6	86,6	86,6	0,5005	0,5004	87,6	83,3

$^1\text{H-NMR}$ 20%-43% Hydrolyse

Beispiel 24% Hydrolyse:

$^1\text{H-NMR}$ (δ , 20 °C, CDCl_3 , 300 MHz): 0,751-0,865 (t; 139 H; $\text{COC}_8\text{H}_{16}\text{CH}_3$), 1,12-1,33 (s; 558 H; $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_{12}\text{CH}_3$), 1,40-1,65 (s; 92 H; $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{R}$), 2,02-2,53 (m; 92 H; COCH_2R), 3,08-3,96 (m; 240 H; $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$).

¹H-NMR 60%-100% Hydrolyse

Beispiel 79% Hydrolyse:

¹H-NMR (δ , 20 °C, D₂O, 300 MHz): 0,690-0,874 (m; 36 H; COC₈H₁₆CH₃)
1,09-1,59 (m; 150 H; COCH₂CH₂C₆H₁₂CH₃), 3,13-4,03 (m; 240 H;
NCH₂CH₂N)

3.6 Gegenionenaustausch vom protonierten Polyamin

3.6.1 Rücktitration mit HCl

Zur Rücktitration des protonierten Polyamins wurde PA•HCl (2,00 g; 25,1 mmol) in einen Erlenmeyerkolben eingewogen, mit 25,15 mL 1 M NaOH (25,2 mL; 25,1 mol) versetzt, und dann mit 6 M HCl titriert. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, wobei bis zum Umschlag 2,18 mL und 2,15 mL verbraucht wurden.

3.6.2 Gegenionenaustausch mit H₂SO₄

Zum Gegenionenaustausch des protonierten Polyamins wurden 2 g PA•HCl (79,53 g/mol; 25,1 mmol) in einen Erlenmeyerkolben eingewogen, mit 25,15 mL 1 M NaOH (025,1 mmol) versetzt, und dann mit 5 M H₂SO₄ titriert. Bis zum Umschlag wurde ein Volumen von 1,1 mL bzw. 1,06 mL verbraucht.

4 Antibakterielle Tests

4.1 Probenvorbereitung

Es wurden die zwei Ausgangspolymere, vier verschiedene protonierte Copolymere, und das protonierte Polyamin zu dieser Untersuchung herangezogen. Von allen Proben werden 20 mg in 2 mL des jeweiligen Lösungsmittels gelöst und aus diesen Stammlösungen wurden in jeweils fünf Glasfläschchen 200 μ L der Stammlösung überführt (Tab. VII-5). Das Lösungsmittel wurde an der Atmosphäre verdampft. Drei der fünf Vials mit Polymerfilm wurden bei dem Antimikrobiellen Test zur Bestimmung herangezogen.

Tab. VII-3: Parameter zur Probenvorbereitung.

Probe	Einwaage / mg	LM
PEtOX	20,3	CHCl ₃
PEtOX co 25%	20,4	H ₂ O
PEtOx co 70%	20,0	H ₂ O
PNonOx	20,4	CHCl ₃
PNonOx co 23,5%	20,0	CHCl ₃
PNonOx co 68%	20,0	CHCl ₃
PA	20,4	H ₂ O

4.2 Antibakterielle Tests

Die Glasvials mit Polymerfilm werden mit 2 mL einer Bakteriensuspension (E. coli, OD: 0,06 in Medium) versetzt und für 22 ½ h geschüttelt und inkubiert. Zur Herstellung der Farblösung wurden 12 μ L von Syto 9 in DMSO und 12 μ L von Propidium Iodid in DMSO mit 4 mL destilliertem Wasser vermischt. Von dieser Lösung wurden jeweils 100 μ L in die jeweilige Position der 96-Well Mikrotiterplatte überführt. Nun wurden jeweils 100 μ L der Proben zu den Farbstofflösungen pipettiert. Als Blindwert diente 0,9% NaCl Puffer.

VIII Danksagung

Meine Diplomarbeit wurde am Institut für Chemische Technologie von Materialien unter der Betreuung von Dr. Frank Wiesbrock verfasst. Ihm möchte ich meinen Dank für die Bereitstellung des hochinteressanten Themas und die gute Betreuung dieser Arbeit aussprechen.

Weiters möchte ich Univ.-Prof. Dr. Franz Stelzer für die Aufnahme am Institut und die Ermöglichung dieser Diplomarbeit danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe, im Besonderen Elisabeth Rossegger, Bianca Wirnsberger und Stefan Kalin für die Unterstützung, die gute Laune und das freundliche Arbeitsklima sowie bei meiner Arbeitskollegen Dr. Elisabeth Kreuzwiesner für fachliche Diskussionen.

Ich danke Dr. Petra Kaschnitz für die Aufnahme der NMR-Spektren, Dr. Gregor Trimmel für Bereitstellung des DSC Geräts und die gerätebezogene Einführung, Josefine Hobisch für die TA-Messungen, Ao.Univ.-Prof. Dr. Hermetter sowie Dipl.-Ing. Ute Stemmer für die Vermessung der Proben für die antibakteriellen Tests und Dr. Koller und seinem Team für die Bereitstellung der Bakteriensuspension und die Aufnahme im Labor während der Vorbereitungen.

Mein Dank gilt auch Dr. Nadja Noormofidi und Ass.Prof. Dr. Roland Fischer für die Organisation des FFG-Projekts Erfinderin.

Bei KeKelit Kunststoffwerk GmbH möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung bedanken, die dieses Projekt ermöglicht hat. Im Besonderen bedanke ich mich bei Herrn Ing. Karl Rametsteiner und Dipl.-Ing. Elmar Ratschmann für die Koordination des Projektes.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Freund Bastian für die Unterstützung während der gesamten Studienzeit bedanken, ohne die ich nicht dort wäre wo ich heute bin.

IX Literatur

- [1] M.T. Madigan, J.M. Martinko *Brock Mikrobiologie*, Pearson Studium **2006**, 11. Auflage, 9-11.
- [2] S.L. Percival, J.T. Walker, P.R. Hunter *Biofilms and Drinking Water* CRC Press LLC **2000**, 29.
- [3] Dissertation, Elisabeth Kreuzwiesner, *Entwicklung von compoundierbaren Kontaktbioziden auf Basis aminofunktionalisierter Polymere*, TU Graz, **2010**.
- [4] S. Wijans, B.-J. de Gans, F. Wiesbrock, R. Hoogenboom, U.S. Schubert *Macromol. Rapid. Commun.* **2004**, *25*, 1958-1962.
- [5] D. Voet, J.G. Voet, *Biochemistry*, Wiley **2004**, 3rd Edition, 3-6.
- [6] M.T. Madigan, J.M. Martinko *Brock Mikrobiologie*, Pearson Studium **2006**, 11. Auflage, 65.
- [7] D. Voet, J.G. Voet *Biochemistry*, Wiley **2004**, 3rd Edition, 372-375.
- [8] M.T. Madigan, J.M. Martinko *Brock Mikrobiologie*, Pearson Studium **2006**, 11. Auflage, 81-88.
- [9] G. Seyfriedsberger, K. Rametsteiner, W. Kern, *European Polymer Journal* **2006**, *42*, 3383-3389.
- [10] N. Høiby, T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin, O. Ciofu, *Int. J. Antimic. Ag.* **2010**, *35*, 322-332.
- [11] Dissertation C.J. Waschinski *Synthese, Charakterisierung und Untersuchung der Wirksamkeitsparameter bakterizider Poly(oxazoline) und damit modifizierter Polymernetzwerke*, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, **2007**.
- [12] C.J. Waschinski, V. Herdes, F. Schueler, J.C. Tiller, *Macromol. Biosci.* **2005**, *5*, 149-156.
- [13] E.M. Hetrick, M.H. Schoenfisch, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 780-789.
- [14] C.J. Waschinski, J. Zimmermann, U. Salz, R. Hutzler, G. Sadowski, J.C. Tiller, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 104-108.
- [15] M.L. Cohen, *Nature* **2000**, *406*, 762-767.

- [16] J.C. Tiller, C.J. Liao, K. Lewis, A.M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 5981-5985.
- [17] J. Lin, J.C. Tiller, S.B. Lee, K. Lewis, A.M. Klibanov, *Biotechnol. Lett.* **2002**, *24*, 801-805.
- [18] O. Vogl, D. Tirrel, *J. Macromol. Sci. Chem.* **1979**, *A13*, 415-420.
- [19] S.P. Denyer, *Int. Biodet. Biodeg.* **1995**, *35*, 227-245.
- [20] M.T. Madigan, J.M. Martinok, J. Parker *Brock Mikrobiologie, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin*, 1. Aufl. **2001**.
- [21] A. Flemming, *Br. J. Ex. Pathol.* **1929**, *10*, 226-236.
- [22] A. Yonath *Ann. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 649-679.
- [23] R.S. Shelton, M.G.V. Campen, C.H. Tilford, H.C. Lang, L. Nisonger, F.J. Bandelin, H.L. Rubenkoenig *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, *68*, 753-5.
- [24] R.S. Shelton, M.G.V. Campen, C.H. Tilford, H.C. Lang, L. Nisonger, F.J. Bandelin, H.L. Rubenkoenig *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, *68*, 755-7.
- [25] G. McDonnell, A.D. Russell *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, *12*, 147-179.
- [26] A. Milling, K. Smalla, R. Kehr, A. Wulf *Holz als Roh- und Werkstoff* **2005**, *63*, 463-472.
- [27] K.D. Park, Y.S. Kim, D.K. Han, Y.H. Kim, E.H.B. Lee, H. Suh, K.S. Choi *Biomaterials* **1998**, *19*, 851-859.
- [28] B. Gottenbos, H.C. Van Der Mei, H.J. Busscher, D.W. Grijpma, J. Feijen *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1999**, *10*, 853-855.
- [29] E.R. Kenawy, S.D. Worley, R. Broughton, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1359- 1384.
- [30] T. Tashiro *Macromol. Mater. Eng.* **2001**, *286*, 63-87.
- [31] T. Ikeda, H. Yamaguchi, S. Tazuke *J. Bio. Comp. Polym.* **1990**, *5*, 31-41.
- [32] E.S. Park, W.S. Moon, M.J. Song, M.N. Kim, K.H. Chung, J.S. Yoon *Int. Biodet. Biodeg.* **2001**, *47*, 209-214.
- [33] N. Pasquier, H. Keul, E. Heine, M. Moeller, . Angelov, S. Linser, R. Willumeit *Macromol. Biosci.* **2008**, *8*, 903-915.
- [34] H.-G. Elias, *Makromoleküle: Industrielle Polymere und Synthese*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim **2001**, 6.Auflage, 4.Band, 92-93.
- [35] H. Witte, W. Seeliger, *Liebigs Ann. Chem.* **1974**, *6*, 996-1009.

- [36] C.O. Kangani, D.E. Kelley, B.W. Day *Tetrahedron. Lett.* **2006**, *47*, 6497-6499.
- [37] J.L. Hughey, S. Knapp, H. Schugar, *Synthesis Stuttgart* **1980**, 489-490.
- [38] A.R. Katritzky, C.M. Cai, K. Suzuki, S.K. Singh *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 811-814.
- [39] M. Ishihara, H. Togo *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1474-1480.
- [40] H. Witte, W. Seeliger *Liebigs Ann. Chem.* **1974**, 1996-1009.
- [41] K. Kempe, M. Lobert, R. Hoogenboom, U.S. Schubert *J. Comb. Chem.* **2009**, *11*, 247-280.
- [42] Patent: Henkel Kommanditgesellschaft, Nr.: **0 315 856 B1**
- [43] N. Hadjichristidis, M. Pitsikalis, S. Pispas, H. Iatrou *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3747-3792.
- [44] O.W. Webster, *Science* **1991**, *251*, 887-893.
- [45] K. Matyjaszewski, J.H. Xia, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2921-2990.
- [46] C.J. Hawker, A.W. Bosman, E. Harth *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3661-3688.
- [47] R. Hoogenboom *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7978-7994.
- [48] D.A. Tomalia, D.P. Sheetz *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **1966**, *4*, 2253-2265.
- [49] W. Seeliger, W. Their *Angew. Chem. Int. Ed.* **1966**, *5*, 612-617.
- [50] T. Kagiya, S. Narisawa, T. Maeda, K. Fukui *J. Polym. Sci. Part C: Polym. Lett.* **1966**, *4*, 441-445.
- [51] T.G. Bassiri, A. Levy, M. Litt *J. Polym. Sci. Part C: Polym. Lett.* **1967**, *5*, 871-879.
- [52] G.F. Cai, M.H. Litt *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **1989**, *27*, 3603-3618.
- [53] R. Hoogenboom, F. Wiesbrock, H.Y. Huang, M.A.M. Leenen, H.M.L. Thijs, S.F.G.M. Van Nispen, M. Van der Loop, C.A. Fustin, A.M. Jonas, J.F. Gohy, U.S. Schubert *Macromolecules* **2006**, *39*, 4719-4725.
- [54] M. Beck, P. Birnbrich, U. Eicken, H. Fischer, W. E. Fristad, B. Hase, H. J. Krause *Angew. Makromol. Chem* **1994**, *223*, 217-233.

- [55] M. Einzmann, W.H. Binder *J. Polym. Sci.:Part A: Polym. Chem* **2001**, *39*, 2821-2831.
- [56] R.H. Jin *Adv. Mater* **2002**, *14*, 889-892.
- [57] B. Gall, M. Bortenschlager, O. Nuyken, R. Weberskirch *Macromol. Chem. Phys.* **2008**, *209*, 1152-1159.
- [58] M. Miyamoto, K. Aoi, T. Saegusa *Macromolecules* **1989**, *22*, 3540-3543.
- [59] N. Adams, U. S. Schubert *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, *59*, 1504-1520.
- [60] R. Hoogenboom *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7978-7994
- [61] F. Wiesbrock, R. Hoogenboom, U.S. Schubert, *Macromol. Rapid. Commun.* **2004**, *25*, 1739-1764.
- [62] D. Bogdal, P. Penczek, J. Pielichowski, A. Prociak, *Adv. Polym. Sci.* **2003**, *163*, 193-197.
- [63] www.biotage.com/DynPage.aspx?id=37654.
- [64] <http://www.biotage.com/graphics/5735.jpg>.
- [65] J.P. Tierney, P. Lidström *Microwave Assisted Organic Synthesis*, Blackwell Publishing Ltd. **2009**, 18-21.
- [66] M.L.H. Lambermont-Thijs, F.S. v. d. Woerdt, A. Baumgaertel, L. Bonami, F.E. Du Prez, U.S. Schubert, R. Hoogenboom *Macromolecules* **2010**, *43*, 927-933.
- [67] <http://www.mobitec.de/probes/docs/media/pis/mp07007.pdf>.