

SAT-CR-P-2-CT(R)-16

STRUCTURE PROPERTIES INVESTIGATION OF CHITOSAN NANOCOMPOSITE BIOFILMS

Assoc. Prof. Dilyana Zvezdova, PhD

Department of Preclinical and Clinical Subjects,

Prof. Assen Zlatarov University

E-mail: zvezdova@abv.bg

Abstract: This work is intended to shed more light on the options for a creation of nanocomposite chitosan biofilms suitable as a drug loaded and delivery substance. It possesses a specific adapted stimulation matrix that delivers a drug into the patients body over a prolonged period of time. Pure chitosan and nanocomposite chitosan/zeolite biofilms are created. It is established that the chitosan nanocomposites with zeolite nanoparticles have better solubility compared to pure chitosan biofilms. Scanning electron microphotographs (SEM) are meant to evaluate a morphology and physical film structure. X-ray microanalytical analyses are carried out on the film surface and Al, Si, Fe content distribution is established. The chitosan/zeolite nanocomposite biofilm possesses a thru physical porosity, resp. a larger specific surface area and diffusion properties are more suitable for a medical bandage, tissue engineering attributes, biosensitive devices etc.

Keywords: Chitosan, Chitosan/zeolite, Nanocomposite, Biofilms, Zeolite, Mechanophysical structure.

ВЪВЕДЕНИЕ

Органично - неорганичните хибридни нанокомпозиции на базата хитозан се обособяват като нови и твърде интересни фармацевтични средства за приложение в медицината. Тези хибридни материали проявяват изключително подобрени свойства, в сравнение с тези на самостоятелните компоненти от които са произлезли. Информацията от последните години показва, че самостоятелни или нанокомпозиционни природни биополимерни, както и други видове хибридни материали са използвани в медицината, фармацията, и др. приложни аспекти поради тяхната химична и механо-физична (порьозна) структура (Duta, P. K., et al, 2004; Paul, W., C. P. Sharma, 2004; Archana, D., et al, 2013; Wang, J. J., et al, 2011). Това е така поради обстоятелството, че в основната част от приложните аспекти на тези материали, голямо значение има дифузията на компоненти участващи в съответен процес до функционалните им центрове, както следва:

- при функцията им като носител, дифузия на съответния медикамент или растежен стимулатор (за агрофармацията);
- при функцията им като сорбент, дифузия на сорбируемото вещество до сорбционните центрове;
- при функцията им за йонен обмен, дифузия на обменящите се йони до йонообменните групи (центрове);
- при функцията им като биофилми, дифузия през биофилма;
- при получаването и ползваемостта на биополимерите като изпледени влакна порьозността има значение за тяхната здравина, устойчивост, функционалност и дифузия през тях;
- при функцията им като имплантен материал в остеопластиката, порьозността има значение за здравината на възстановяваната част от костта. и др. (Kinney, R. C. et al, 2010; Wlodarski, K. H. et al, 2011; Ozdemir, T. et al, 2013; Muzzarelli, R., et al, 1993, Hirano, S., 1997).

Във връзка с това към тях се предявяват все по - високи и специфични изисквания: подобряване на кинетичните им свойства; селективност спрямо някои йонно разтворени,

молекулно, нано, или колоидно размерни компоненти, с които те се комбинират при съответна специфична цел; механична устойчивост спрямо абразивни въздействия, инхибируемост спрямо патогенни бактерии и др.

Актуалността на техните структурни характеристики и изискването да се познават и подобряват свойствата, респективно приложното поведение на природните биополимери или нанокompозити, изявяващи се при тяхната функционалност, дефинира научно-изследователски търсения за усъвършенстване представите относно тяхната химична (Angelova, N., et al, 1995), физикохимична и механо-физична структура, както и изучаване на методите за нейното изследване и терминологична идентификация. Физическата структура (наличността или отсъствието на т.н. истинска порьозност) и каква е нейната характеристика (Dobrevski, I., Zvezdov, A., 1982) в голяма част от случаите на приложност на тези материали имат съществено значение за техните свойства и отнасяния, респ. за функционалното им поведение (Hirano, S., et al, 2001). Така например, некомпетентният избор относно структурно-порьозните параметри на природния биополимер носител на медикаменти с оглед последствената му лечебно-целева емисия в лекувания организъм, може да доведе до лоша функционалност и компроментиране на същностната му целева приложност, инхибиране на патогенни бактерии и др. (Vishu Kumar, A. B., et al, 2004; Stoilova O. et al, 2001; Manolova N. et al, 2004). Обратно, компетентно подбраният подходящ за конкретната цел структурно-порьозен тип природен биополимерен или нанокompозитен биофилм обуславя качествено целево функциониране, респективно функционален живот (Ferreira, C.O., et al, 2009). Поради бактерицидните свойства на хитозана е установено и доказано, че лечебните отнасяния на бинтови превръзки, в които той е включен като компонент имат по-добри унищожавачи патогенните бактерии показатели. Освен това те притежават хемостатично влияние, т.е. подтиска се кръвотечението от раната превръщайки кръвния поток в гел, ускорявайки нейното затваряне (Noel S.P. et al, 2008). Поради това хитозанови или нанокompозитни биофилмови слоеве се предвиждат при избиране и създаване технологиите за производство на бинтове, именно чрез тяхното нанасяне. Изследователите в това научно направление съобщават два основни различни подхода и хитозанови материали успешно ползваеми за тази цел в зависимост от различната целева приложност, а именно: слой от обикновен неомрежен хитозан и слой от омрежен такъв. Установено е, че омрежването в структурата на хитозана подобрява както физическите така и механичните негови свойства: устойчивост на приложено напрежение; термична стабилност; водоустойчивост; подобрен капацитет за цветово и влагозадържане и др. (Kavianinia I., et al, 2015).

Твърде често изборът на целево подходящ биополимерен или нанокompозитен материал се компроментира поради недостатъчна информация относно спецификата на механо-физичната им (порьозна) структура, която следва да се съобразява компетентно с качествата за конкретната приложност и нейното влияние върху неговото функционално поведение.

Целта на настоящата разработка е:

- да се изяснят методологичните аспекти при изследването морфологията и оценката на механо - физичната структура на природни биополимерни и хитозан/зеолит нанокompозитни филмови материали, специфичните особености и промените в нея под влияние на външните въздействия;
- да се установи значението на типа и спецификата на механо-физичната структура на тези материали върху някои свойства и отнасяния при тяхната функционалност като носители на медикаменти.

ИЗЛОЖЕНИЕ

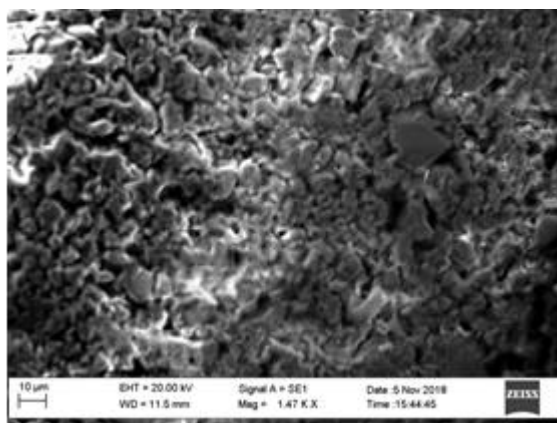
Материали и методики

За провеждане на синтезите са използвани следните материали: хитозан (CS) със степен на деацетилиране 83%, получен чрез последователни процеси на деминерализация, депотеинизация и деацетилиране на хитин от скариди от Черно море (Zvezdova D., 2010); зеолит (Z) доставен от Бели пласт Кърджалийска област (България); оцетна киселина (Sigma-Aldrich). Материалите са използвани директно без каквато и да е предварителна пречиствателна обработка.

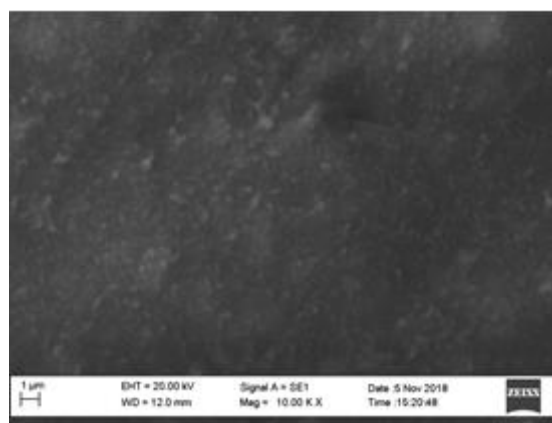
Получаването на филм от хитозан (CS) е осъществено чрез разтваряне на 1 g хитозан в 100 мл 1 % оцетна киселина при 52° C и непрекъснато разбъркване. За образуване на CS филм бистрият разтвор се разпределя равномерно в петриеви блюда и се оставя да се изсуши при 60°C. Приготвянето на хитозан - зеолит нанокмполитен филм (CZN) е проведено като към 0.5% дисперсен воден разтвор на зеолит (Z) се прибавя 1% разтвор на CS при 52°C и непрекъснато разбъркване. CZN филм се разпределя равномерно в петриеви блюда и се оставя да се изсуши при 60°C. Химичната структурата на получените съединения е потвърдена с помощта на инфрачервена спектроскопия, използвайки апарат Nicolet iS 50 в диапазон от 4000-400 cm^{-1} (Zvezdova D., et al, 2018).

Природният продукт зеолит е с микропорьозна/мезопорьозна физическа структура съгл. класификацията на (Dubinin, M. M.,1966). Мезопорьозните материали, поради своята механофизична структура със силно развита специфична повърхност и относително голям размер на порите са подходящи както за въвеждане, така и в последствие за отделяне на различни биоактивни молекули.

Проведени са сканиращо - електронномикроскопски изследвания (SEM) върху повърхностите на хитозан (CS) и хитозан/зеолит нанокмполитни филми (CZN). При изпълнението на SEM анализи за осигуряване на проводимост на образците, те са метализирани със злато по стандартна технология. Повърхностната морфология на CZN филмите, респ. механофизичната структура на изследваните обекти е показана на Фиг. 1,2.



Фиг.1. Повърхност на нанокмполитен биофилм от хитозан/зеолит (x1470)

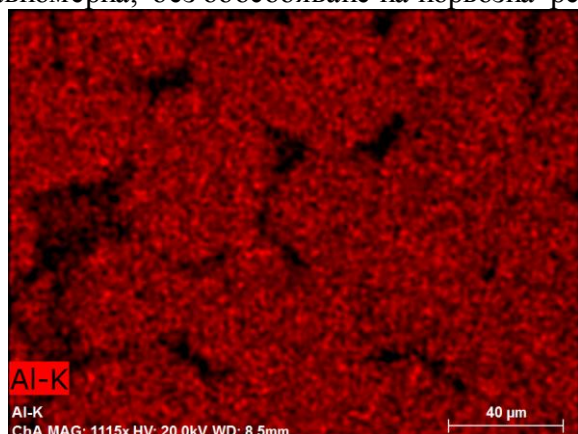


Фиг.2. Повърхност на биофилм от чист хитозан (x10000)

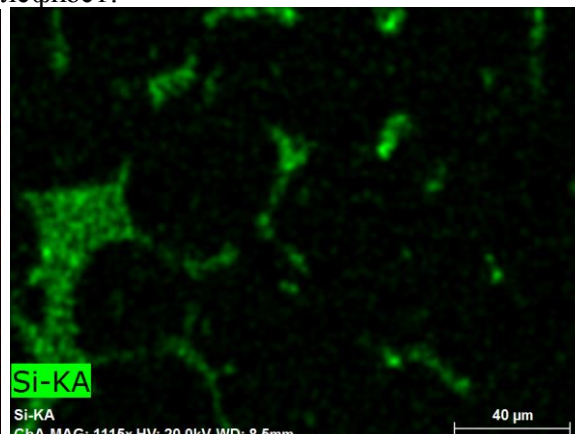
Грапавата, неравномерна повърхност на CZN филма може да се дължи на слабо свързаните зеолитови частици, които не са били напълно добре диспергирани в образуванния нанокмполитен филм, поради тяхната слаба разтворимост във вода. Върху образците са извършени наблюдения със сканиращ електронен микроскоп (SEM) оборудван с рентгенов микронализатор (РМА). При тях са направени цифрови микрофотографии в режим на вторични електрони. Резултатите от наблюденията на повърхностите са представени на Фиг. 1-5.

При пробите от нанокмполитен биофилм за хитозан/зеолит и от чист хитозан се наблюдават два различни типа повърхностни структури (съгл. класификацията Dobrevski, I., Zvezdov, A.,1982). Терминологично по тази класификация са дефинирани два основни

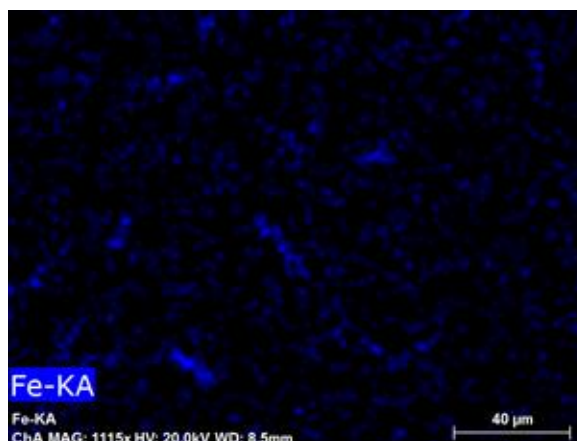
типа механофизични структури: с обособена механофизична порьозност (полиретикуларен негелен порьозен тип - Фиг. 1.) и без обособена механофизична порьозност (гелен тип - Фиг. 2). От фигурите се вижда, че още при степен на увеличение 1470 пъти наноконпозитният биофилм от хитозан/зеолит показва наличието на механофизична порьозна структура (фиг. 1), докато вторият тип, дори при увеличение 10000 пъти показва равномерна гладка непорьозна структура от гелен тип (Фиг. 2). От фиг.1 се установява промяна в размера на елементите изграждащи отделни участъци от структурата наноконпозитният биофилм от хитозан/зеолит. На фиг. 3 е показана зона намираща се между двата типа повърхности. Морфологията на повърхността при гелния образец Фиг.2, съвпада с втория тип структура от образец (гелен). Структурата е по - равномерна, без обособяване на порьозна релефност.



Фиг.3. Разпределение на алуминий по площ, РМА, характеристично рентгеново лъчение - Al K α



Фиг.4. Разпределение на силиций по площ, РМА, характеристично рентгеново лъчение - Si K α



Фиг.5. Разпределение на желязо по площ, РМА, характеристично рентгеново лъчение - Fe K α

За пробата от наноконпозитният биофилм хитозан/зеолит са направени изследвания за химически състав чрез рентгенов микроанализатор (РМА), които са проведени върху напречен разрез на пробата. Резултатите относно разпределението на елементите: Al, Si и Fe са представени в таблица 1 и на фигури. 3 - 5.

Таблица 1. Химичен състав на Al, Si, Fe в хитозан/зеолит наноконпозитен биофилм

Елемент	Среден състав, %	Зона 1, %	Зона 2, %
Al	97.19	75.02	83.59
Si	2.60	21.82	16.41
Fe	0.14	3.16	-

Извършени са анализи чрез сканиране по площ, от които е получен средния състав на пробата, както и анализи в точка за няколко зони, като резултатите с относително добро приближение съвпадат с представеното разпределение по площ.

ИЗВОДИ

Убеждението ни е, че изясняването спецификата в механо - физичната структура на целево използваемите биополимерни или бионанокompatитни филми като носители на медикаменти ще има своя принос при създаването на правилни и/или нови тяхни приложни решения. Това е причина в настояща разработка да бъдат отразени изследователски търсения за правилния методологичен подход при изучаване на тяхната механо-физичната структура.

Проведените експерименти изясняват същността и видовете механофизични структури, при създаването на чисто хитозанови и хитозанови/зеолитни композитни биофилми с целево подходяща структура за въвеждане (импрегниране) на антибиотици върху тяхната повърхност. Установено е, че чисто хитозановите биофилми не притежават истинска физическа порьозност и са от т.н. гелен структурен тип, докато нанокompatитните хитозан/зеолит биофилми имат релефна морфология с развита физическа порьозност, респ. специфична повърхност, върху която е предполагаемо възможно имплантиране на относително по-голямо количество лекарства. Проведени са изследвания за химичния състав чрез рентгенов микроанализатор (РМА). Те отразяват наличието на Al, Si и Fe в структурата на наокompatитните хитозан/зеолит биофилми. Това доказва успешното вграждане на зеолитни частици в нанокompatитната структура, тъй като именно зеолита е алумосиликатен минерал. Това обстоятелство обуславя създаването на структура с истинска механофизична порьозност и добре развита специфична повърхност, което определено е позитивен елемент при имплантирането на антибиотик върху вътрешната повърхност на този тип медикаментен носител. Това от своя страна вероятно обуславя по-добрата инхибираща способност спрямо патогенната бактериална флора, дължащо се на по-голямото количество на антибиотик имплантиран върху силно развитата специфична повърхност на нанокompatита от хитозан/зеолит биофилм.

REFERENCES

- Angelova, N., Manolova, N., & Rashkov I. (1995). Preparation and properties of modified chitosan films. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 10, 285-298.
- Archana, D., Brijesh, K. S., Dutta, J., & Dutta, P. K. (2013). Invivoevaluation of chitosan - PVP - titanium dioxide nanocomposite as wound dressing material. *Carbohydrate Polymers*, 95, 530-539.
- Archana, D., Singh, B. K., Dutta, J., & Dutta, P. K. (2015). Chitosan - PVP - nano silver oxide wound dressing: in vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 73, 49-57.
- Dubinin, M. M. (1966). *Quart. Rev. Chem. Soc.*, v.9, 101-109, v.60, 235-239.
- Dutta, P. K., Dutta, J. D., & Tripathi, V.S. (2004) Chitin and Chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 63 (1), 20-31.
- Dobrevski, Iv., & Zvezdov, A. (1982). Terminology and Classification of ion - exchange resins and polymeric sorbents. *Proced. of 23th Int. Microsymp. "Selective Polymeric Sorbents*, Prague, M 18-1÷ M 18-5.
- Ferreira, C.O., Nunes, C. A., Delgadillo, I., & Lopes-da-Silva, J. A. (2009). Characterization of Chitosan-whey protein films at acid pH, *Food Research International*, 42(7), 807-813.
- Hirano, S. (1997). Application of Chitin and Chitosan. M. F. A. Goosen, ed., Lancaster, PA: Technomic, Publishing Co., Inc., 31-42.

Hirano, S., Zhang, M., & Nakagawa, M. (2001). Release of glycosaminoglycans in physiological saline and water by wet-spun chitin-acid glycosaminoglycan, *Journal Biomedical Material Research*, 56, 556-561.

Kavianinia, I., Plieger P. G., Kandile, N. G. & Harding D. R. (2015). Preparation and characterization of chitosan films, crosslinked with symmetrical aromatic dianhydrides to achieve enhanced thermal properties. *Polymer International*, 64, 556-562.

Kinney, R. C., Ziran, B. H., Hirshorn, K., Schlatterer, D. & Ganey T. (2010). Demineralized bone matrix for fracture healing: fact or fiction. *J Orthop Trauma*, 24, 52-55.

Manolova N., Stoilova, O., Paneva, D., & Rashkov, I. (2004). Novel materials and systems based on synthetic and natural polymers targeted for use in the biomedical field, NATO Science Series II: Mathematics, Physics and Chemistry, *Advanced Biomaterials for Medical Applications*, Thomas D. W. (Ed.), Kluwer Academic Publishers, vol. 180, 127-142.

Muzzarelli, R., Zucchini, C., Ilari, P., Pugnali, A., Belmonte, M. M., Biagini, G., & Castaldi, C. (1993). Osteoconductive properties of methylpyrrolidinone chitosan in an animal model, *Biomaterials*, 14, 925-929.

Noel, S. P., Courtney, H., Bumgardner, J. & Haggard, W. (2008). Chitosan Films: A Potential Local Drug Delivery System for Antibiotics. *Clinical Orthopaedics Related Research*, 466(6), 1377-1382.

Ozdemir, T., Higgins, A., & Brown, M. (2013). Osteoinductive biomaterial geometries for bone regenerative engineering. *Current Pharmaceutical Design*, 19, 3446-3455.

Paul, W., & Sharma, C. P. (2004). Chitosan and Alginate Wound Dressings: A Short Review. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 18(1), 18-23.

Stoilova, O., Koseva, N., Manolova, N., & Rashkov, I. (2001). Template polymerisation of 2-acryloylamido-2-methylpropanesulfonic acid onto Chitosan, *Bulgarian Chemical Communications*, 33 (2), 197-205.

Vishu Kumar, A. B., Varadaraj, M. C., Lalitha, R. G., & Tharanathan, R. N. (2004). Low molecular weight Chitosans: preparation with the aid of papain and characterization. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1670, 137-146.

Wang, J. J., Zeng, Z. W., Xiao, R. Z., Xie T., Zhou, G. L., Zhan, X. R., & Wang, S. L. (2011). Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers, *International Journal of Nanomedicine*, 6, 765-774.

Włodarski, K. H. (2011). Haematopoietic and osteogenic bone marrow stem cells. *Journal of Orthopaedics, Trauma and Rehabilitation*, 13 (5), 439-47.

Zvezdova, D., (2010). "Synthesis and characterization of chitosan from marine sources in Black sea," *Proceedings of University of Ruse - 2010*, 49, book 9.1, 65-69.

Zvezdova, D., Tankov I., Vasilev, V., Georgieva, S., Veli, A., & Nikolova, R. (2018). Preparation and characterization of chitosan-zeolite nanocomposite films for wound healing application. *Proceedings of University of Ruse - 2018*, 57, book 10.1., 68-75.