

SAT-LB-P-2-CT(R)-15

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF CHITOSAN-ZEOLITE NANOCOMPOSITE FILMS FOR WOUND HEALING APPLICATION

Assos. Prof. Dilyana Zvezdova, PhD

Department of Preclinical and Clinical Subjects,
Prof. Assen Zlatarov University
Prof. Jakimov str.1, 8010 Burgas, Bulgaria
E-mail: zvezdova@abv.bg

Ass. Prof. Ivaylo Tankov, PhD

Department of Organic Chemical Technologies and Chemical Engineering,
Prof. Assen Zlatarov University
Prof. Jakimov str.1, 8010 Burgas, Bulgaria
E-mail: igtankov@yahoo.com

Ass. Prof. Valentin Vasilev

Department of Preclinical and Clinical Subjects,
Prof. Assen Zlatarov University
Prof. Jakimov str.1, 8010 Burgas, Bulgaria

Ass. Prof. Snezhina Georgieva, PhD

Department of Health and Social care,
Prof. Assen Zlatarov University
Prof. Jakimov str.1, 8010 Burgas, Bulgaria
E-mail: snezhinageorgieva@abv.bg

Anife Veli

Radoslava Nikolova

Central Research Laboratory,
Prof. Assen Zlatarov University
Prof. Jakimov str.1, 8010 Burgas, Bulgaria
E-mail: anife_veli@abv.bg, radost_vv@yahoo.com

Abstract: A series of novel chitosan-zeolite nanocomposite (CZN) films were prepared by using solvent casting method for wound healing application. The physicochemical properties namely thickness, folding endurance, water absorption capacity, and water vapour transmission rate (WVTR) of the films were studied. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was employed to ascertain the interaction between negatively charged zeolite and positively charged chitosan. The surface morphology of the prepared composite films was also studied by scanning electron microscopy (SEM). Due to strong hydrophilic nature of zeolite, it greatly enhances the water absorption capacities of the prepared nanocomposite films. In addition, the presence of zeolite in the said films also increases the mechanical strength. Moreover, the antibacterial activity of the films was investigated against gram positive and gram negative. The above analysis suggested that the CZN films could be used as potential candidates for wound healing application.

Keywords: Chitosan-zeolite nanocomposite, Fourier transform infrared spectroscopy, Water absorption capacity, Water vapour transmission rate

ВЪВЕДЕНИЕ

Патогенната бактериална инфекция е един от най-важните проблеми при лечението на рани. Инфекцията на повърхността на раната не само променя нормалната лечебна рана в рани, които не са лекувани, но и причинява сериозен проблем за общественото здраве. За да се преодолее този проблем, учените работят активно за подготовка на съвременни превръзки за рани. В днешно време естествени полимери на основата на превръзки за рани играят

решаваща роля за предотвратяване на микробната инфекция на повърхността на раната. Сред тях, хитозанът е много обещаващ кандидат за лечение на рани поради силните си антибактериални свойства срещу широк спектър от грам-отрицателни и грам-положителни бактерии. Освен това, той е биоразградим, нетоксичен, биосъвместим и ниската имуногенност, което е от съществено значение за ускоряване на процеса на заздравяване на рани (Archana D., Dutta J., Dutta P.K., 2013). Присъствието на N-ацетил глюкозаминови единици играят съществена роля не само в усилването на процеса на повторно епителизиране, но и в заздравяването на тъканите на раната [8]. Хитозанът намира широко разнообразие от приложения, вариращи от тъканно инженерство до получаването на лекарства за медицината и земеделието, за прилагане на костно заздравяване, поради лекотата му на формоване в гел, гъба, нанокompat, филми и други (Archana D., Singh B. K., Dutta J., Dutta P.K., 2015). Досега са изследвани различни смеси от хитозан с естествени полимери, синтетични полимери, наноматериали, за да се приготвят превръзки за приложения за заздравяване на рани като хитозан и колаген изкуствена кожа, вградена с нанотитанов оксид (Dutta, P., J. Dutta, V. Tripathi, 2004). Но все пак има недостатък на използването на хитозан като превръзка за рани като следствие от неговата лоша механична якост и капацитет на абсорбция на вода. Поради това в настоящото изследване използвахме зеолит като един от най-обещаващите подсилващи материали, поради нетоксичността му, високия капацитет за обмен на катиони, ниската себестойност, лесната достъпност и антимикробната активност. Освен това, той се използва за лечение на различни кожни проблеми като циреи, рани, язви и рани (Singh J., P.K. Dutta, 2010). От друга страна, поради поликатионния характер на хитозана, той може да взаимодейства с отрицателно заредения зеолит, което води до образуването на полиелектролитен комплекс. Взаимодействието между хитозан и зеолит не само подобрява механичната здравина, но и подобрява общите свойства на нанокompatните филми за заздравяване на рани (Singh D., A. Ray, 2000). Настоящото изследване има за цел да се създадат нови съединения на основата на хитозан и зеолит и да се изследват техните физични, механични свойства като повърхностна морфология, дебелина, сгъваема издръжливост, капацитет на абсорбция на вода, скорост на пропускане на водна пара, рН на превръзка, порьозност за да се получи потенциален нанокompatен филм като усъвършенстван продукт за грижи за рани.

ИЗЛОЖЕНИЕ

Хитозан (CS) с молекулно тегло 100 000 и степен на деацетилиране 79 % е получаван от черупкови обитатели на Черно море. Зеолитът (Z) е добиван като продукт и доставен от Кърджалийска област (България). Материалите са използвани директно без каквато и да е предварителна пречиствателна обработка.

Приготвяне на пробата

Обвивките на скаридите се промиват изцяло под течаща вода, след което се промиват с дестилирана вода, за да се отстранят всички незасегнати протеини, тъкани, разтворими органични вещества и неорганични и други примеси. След това черупките се събират и се сваряват във вода за 1 час, за да се отстранят прилепналите тъкани. След това обвивките се сушат в пещ при 160 ° C с горещ въздух в продължение на 2 часа, така че да станат крехки, което на свой ред помага да се разруши кристалната структура на хитин.

Деминерализация

Основното неорганично съединение на черупката включва калциев карбонат и различни други микроелементи. За да се отстрани калциевият карбонат, се използва само разрежена солна киселина за предотвратяване на хитиновата хидролиза. 7% разтвор на солна киселина се прибавя към прах от черупките и се разбърква непрекъснато при 250 rpm в продължение на 60 минути при стайна температура. След това деминерализираните черупки се филтруват и събират във филтърна хартия, промиват се до неутрално рН с дестилирана вода и се сушат в пещ при 60° C в продължение на 24 часа.

Депротенизация

Протеините се отстраняват с 40% разтвор на натриев хидроксид като се прибавя към деминерализиран прах от черупката и се разбърква непрекъснато при 250 rpm при 60° C в продължение на 1 час. Деминерализираните черупки след това се филтруват и се събират в филтърна хартия, промиват се до неутрално рН с дестилирана вода и се изсушават в пещ при температура 80° C в продължение на 24 часа, за да се получи хитиновия остатък.

Деацетилиране

1 g хитин се обработва с 50 ml 50% натриев хидроксид. Сместа се разбърква постоянно при фиксирана температура 60° C. След това хитозановия остатък се обработва с 80% разтвор на етилов алкохол с съотношение твърдо вещество към разтвор от 1/30 (тегло/обем), последвано от сушене в сушилня при 80° C в продължение на 24 часа.

Приготвяне на филм от хитозан

1% разтвор на хитозан (CS) се приготвя чрез разтваряне на 1 g хитозан в 100 ml 1% оцетна киселина при непрекъснато разбъркване. След това разтворът се оставя при стайна температура в продължение на един ден, за да се отстранят въздушните мехурчета, образувани при разбъркване, така че да се получи бистър разтвор. След това бистрият разтвор се разпределя равномерно в петриеви блюда и се оставя да се изсуши при 60° C. След изсушаване филмът от хитозан се отлепва и се съхранява в ексикатор.

Приготвяне на филм-композит от хитозан и зеолит (CZN)

Нанокompозитните филми се приготвят чрез използване на гореописания метод. 1% разтвор на хитозан и 0.5% воден разтвор на зеолит (Z) бяха приготвени отделно. След това разтвор на CS се добавя на капки в разтвор на Z в различни съотношения при непрекъснато магнитно разбъркване при 52° C, за да се получи смес (Таблица 1). Накрая сместа от разтвора се излива в петриеви блюда и се изсушава при 60° C, за да се изпари разтворителя за образуване на CZN филм.

Таблица 1. Приготвяне на хитозан-зеолит композитни филми

№ Код	Проба/ н	Хитоза (мл)	Зеолит (мл)
1	CS	25	-
2	CZN 1	10	10
3	CZN 2	20	10
4	CZN 3	30	10
5	CZN 4	40	10
6	CZN 5	50	10
7	CZN 6	60	10

FTIR Спектроскопия

Инфрачервените спектри са снети с помощта на инфрачервен спектрометър Nicolet iS 50 FTIR в диапазон от 4000-400 cm⁻¹. Приблизително 1 mg от пробата се хомогенизира добре с 300 mg KBr, след което се пулверизира фино и се поставя в таблетна матрица.

Измерване на дебелината и масата на филми от хитозан-зеолитни нанокompозити (CZN)

Дебелината на филмите на хитозан-зеолитни нанокompозити (CZN) беше измерена чрез микрометър Kinex CZ на 4 случайно избрани позиции върху всеки филм. След това се определя нейната средна стойност.

За да се установи еднородността на един филм, се режат 4 парченца с еднакви размери от различни места на този филм. Претеглят се на електронна везна, за се определи масата им. Определя се средната маса на филма.

Измерване на абсорбционния капацитет на филмите спрямо водата

За да се определи абсорбционния капацитет на филмите спрямо водата, се използват предварително претеглени филми с размер 25x25 mm. Всеки от тях се потапя в съд, съдържащ 20 ml прясно приготвен 0.9% солен разтвор при стайна температура. Напоените филми се изваждат от солената вода през предварително определени еднакви интервали от време. Излишъкът от вода се отнема внимателно с филтърна хартия и филмът се претегля на аналитична везна. После отново се потапя в солената вода и се повтаря същата процедура. Процентът на набъбване се определя по формулата:

$$\text{Набъбване (\%)} = [W_f - W_i / W_i] \times 100 \quad (1)$$

където: W_f е теглото на набъбналия филм; W_i е първоначалното тегло на сухия филм.

Определяне на скоростта на пропускане на водната пара през филмите (WVTR)

Скоростта на пропускане на водната пара се определя гравиметрично според модифицирания ASTM E96-95 стандарт. Нанокompозитен филм с подходящ размер се закрепва плътно върху кръглия отвор на чаша за измерване на пропускливостта на водна пара. Преди това в чашата се поставят 15 ml дестилирана вода. Чашата заедно с водата и филма се претегля точно на аналитична везна и се поставя в термостатичен съд при 25°C. След това чашата се тегли периодично на 24, 48 и 72 час. Построява се зависимост на скоростта на промяната в нейната маса от времето за всеки от изследваните филми.

Скоростта на пропускане на водната пара през съответния филм се изчислява по формулата:

$$\text{WVTR (gm}^{-2} \text{ day}^{-1}) = [M \times 24 / T - A] \quad (2)$$

където: M представлява промяната в масата на чашата на 24, 48 и 72 часа, g; T - времето, през което се наблюдава тази промяна, day; A - ефективната площ на филма, подложена на действието на водните пари, m².

Измерване на рН на превръзка за рани

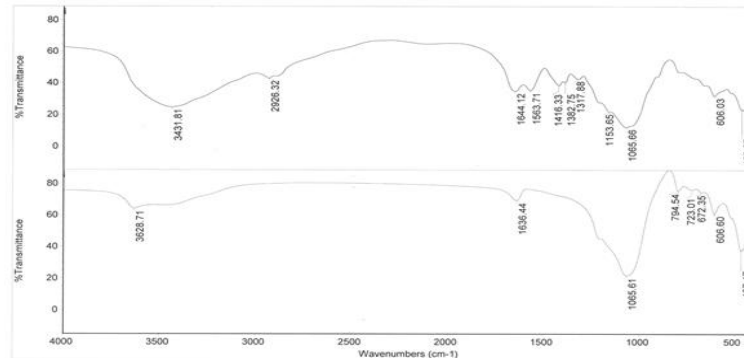
Всеки от CZN филми се тегли предварително и след това се потопява самостоятелно в нормален солен разтвор (0.9%), докато се достигне равновесие. След това филмът се изважда от разтвора и на този разтвор се определя рН на дигитален рН-метър. Това всъщност е рН на превръзката. От всеки филм се правят 3 измервания, след което се пресмята средната стойност на рН на филма предназначен за превръзка.

рН на една превръзка за рани е важен параметър, който подпомага не само контрола върху инфекцията на повърхността на раната, но и ускорява образуването на фибробласти. Превръзката за рани следва да поддържа леко кисела среда върху повърхността на раната, тъй като рН на нормалната човешка кожа се изменя от 4.0 до 6.8. При леко кисела среда се ускорява лечебният процес, в сравнение с неутралната и алкална среда. Обикновено при CZN филмите рН се изменя от 5.65 до 6.86. Тези стойности са в съответствие с рН стойностите на 13 търговски продукти за рани (wound care products), които се изменят в интервала 5.25-7.90.

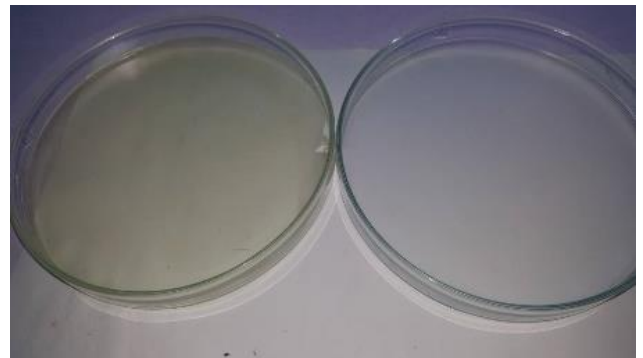
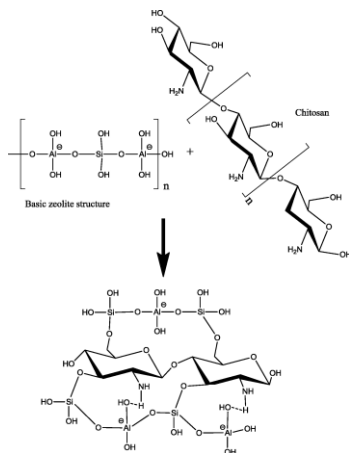
ИЗЛОЖЕНИЕ

FTIR спектрите и филми от зеолит (Z) и хитозан-зеолитов нанокompозит (CZN) са показани на фигура 1 и 2. Спектърът на CS показва широк пик при 3446,2 cm⁻¹, отразяващ вибрационни трептения характерни за NH и OH групи, при 2921 cm⁻¹ (C-H симетрично разтягане) при 1378,7 cm⁻¹ при 1654.9 cm⁻¹ (амид II и C=O групи), при 1420 cm⁻¹ (вибрации за N-H), при 1152.6 cm⁻¹ (C-O-C вибрация) и при 1081.4 cm⁻¹ (C-OH). Както може да се види

на Фигура 1 (b), FTIR спектърът на Z показва пик при 1636.4 cm^{-1} , който принадлежи към Si-O-Si свързване. В допълнение, характерните пикове на абсорбция се намират при 3628.7 cm^{-1} (Al-H и Si-OH), при 1636 cm^{-1} (H-O-H), при 794.5 cm^{-1} (честота на огъване на Al-Al-OH) и при 467 cm^{-1} (Si-O). Спектърът на CZN нанокomпозитен филм [фиг.1(a)] показва характерна ивица при 3431.8 cm^{-1} , която се дължи на образуване на водородна връзка между функционалните групи на CS (O-H и N-H групи) и Z (O-H групи). Пикът, наблюдаван в CS спектъра при 1654.9 cm^{-1} се измества до 1644.1 cm^{-1} в спектъра CZN [фиг.1(a)], което съответства на деформационната вибрация на amino групи на хитозана.



Фиг. 1. FTIR спектър на хитозан-зеолитен нанокomпозит (1a) и зеолит (1b).



Фиг. 2. Схема на синтезиран нанокomпозит от зеолит и хитозан.

Измерване на дебелината и масата на филми от хитозан-зеолитни нанокomпозити (CZN)

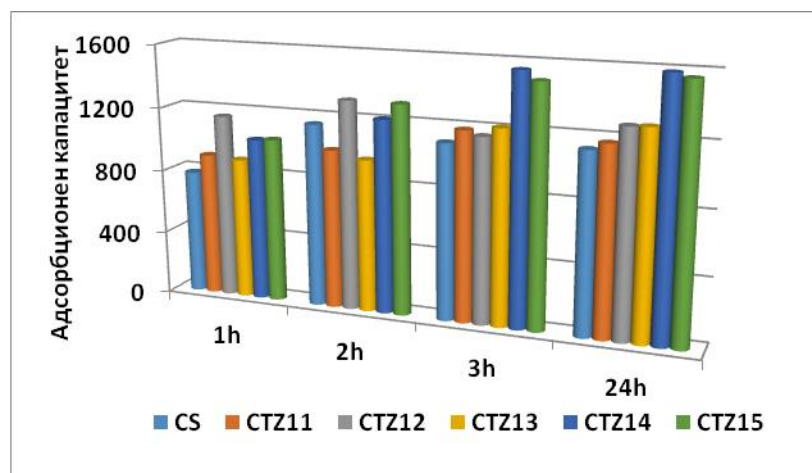
Анализът на дебелината на чистите хитозанови и CBN филми с различни съотношения на CS и Z. За да се получи уеднаквиена дебелина в нанокomпозитните филми, със същите диаметри и равни обеми от всички приготвени разтвори. Дебелината на всички CZN филми е в диапазона между 21.5 ± 10 и $38 \pm 10\ \mu\text{m}$. Установено е, че дебелината на нанокomпозитните филми се увеличава, като се увеличава съдържанието на хитозан в разтвор, образуващ филм, което може да се дължи на повишен вискозитет на CS.

Сгъваема издръжливост

Всеки един от CZN филмите беше индивидуално сгънат многократно на едно и също място, за да открие тяхната якост на сгъване. Таблицата показва, че якостта на сгъване на филмите CZN се увеличава, като се намалява съдържанието на зеолит от 50% до 20% по отношение на хитозана в споменатите филми. По-нататъшното редуциране на съдържанието на зеолит може да намали якостта на сгъване на нанокomпозитните филми. Нанокomпозитният слой CZN 4 показва най-голяма якост на сгъване. Следователно, може да се каже, че наличието на зеолит в правилното съотношение в разтворената смес значително увеличава механичната якост на споменатите нанокomпозитни филми.

Измерване на абсорбционния капацитет на филмите спрямо водата

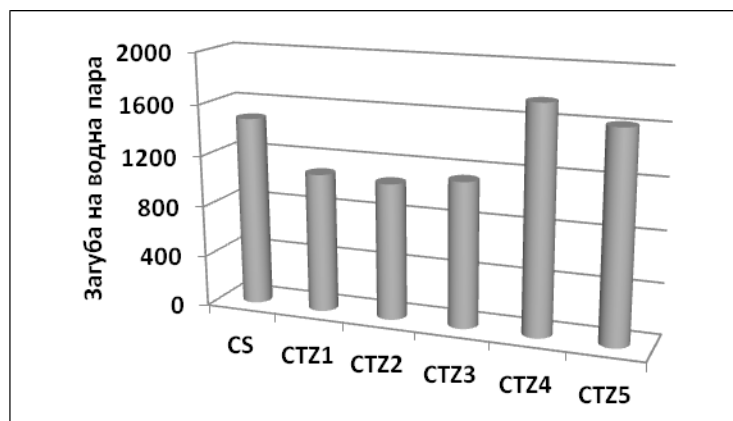
В идеалния случай обвиващият материал за рани трябва да абсорбира течността на раната, докато се прилага върху леглото на раната и по този начин поддържа леко навлажнена среда в раната на леглото. Капацитетът на абсорбция на водата е важен фактор за всякакви материали за превръзка на рани, които предотвратяват дехидратацията на тъканите, инхибират растежа на микроорганизмите. Както е показано на фигура 3, беше установено, че способността за абсорбиране на водата на всички CZN филми се увеличава за определен период от време. Освен това, той също така показва, че CZN 12 има най-висок капацитет за водопоглъщане от всички приготвени CZN филми. Очаква се, че благодарение на хидрофилната природа и водния капацитет на зеолита, той увеличава капацитета на абсорбция на водата на нанокomпозитното фолио. Освен това, резултатите също така показват, че капацитетът на водопоглъщане на приготвените CZN филми се увеличава с увеличаване съдържанието на CS в композитите, дължащо се на наличието на хидрофобни ацетилови групи в хитозана.



Фиг. 3. Измерване на адсорбционния капацитет на хитозан-зеолит нанокomпозитни филми.

Определяне на скоростта на пропускане на водната пара през филмите

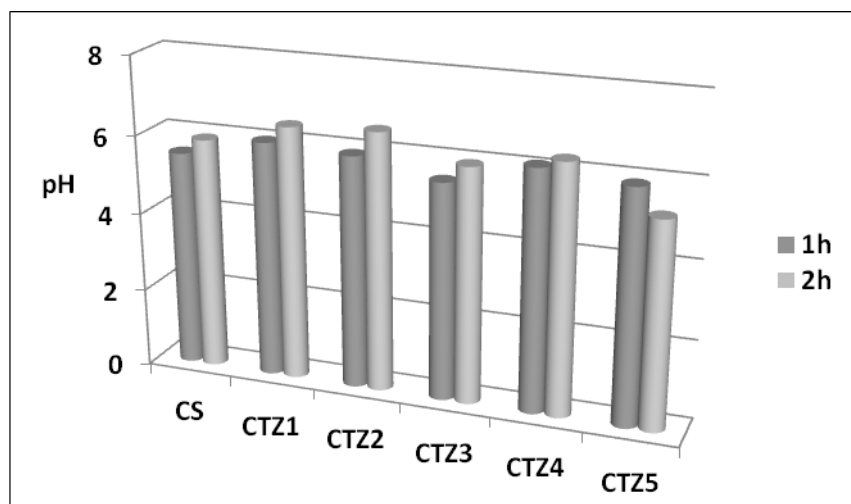
Превръзката, използвана за лечение на рани, трябва да поддържа загуба на вода от повърхността на раната при оптимална скорост. Високата стойност на загубата на водна пара може да доведе до дехидратация на раната и прилепването на превръзката към повърхността на раната, докато ниската стойност на загубата на водна пара може да доведе до натрупване на екsudати на рани, което може да ускори риска от бактериален растеж и също да забави процеса на заздравяване на раната. Загубата на водна пара от нормална кожа е $204 \pm 12 \text{ gm}^{-2} \text{ ден}^{-1}$, от изгарянето на първата степен е $279 \pm 26 \text{ gm}^{-2} \text{ ден}^{-1}$, а от гранулираната рана е $5138 \pm 202 \text{ gm}^{-2} \text{ ден}^{-1}$ и препоръчителната скорост за осигуряване на подходящо ниво на влага върху повърхността на раната за ефективно заздравяване на рани е $2000\text{-}2500 \text{ gm}^{-2} \text{ ден}^{-1}$. Стойностите на пропускане на водна пара за CS и CZN филми са показани на фигура 4. Чистото CS показва сравнително добро WVTR, което допълнително се увеличава чрез добавянето на Z. WVTR стойността на CZN 4 нанокomпозита ($1754 \pm 21 \text{ gm}^{-2} \text{ ден}^{-1}$) е близо до горепосочения препоръчителен диапазон на идеална превръзка за рани.



Фиг.4. Измерване на скорстта на пропускане на водна пара от хитозан-зеолит нанокomпозитни филми.

Измерване на рН на превръзка за рани

Стойността на рН е важен параметър за обвиването на рани, което улеснява не само контролирането на инфекцията на повърхността на раната, но и ускоряването на образуването на пролиферация на фибробластите. В идеалния случай обвивката на раната трябва да поддържа леко кисела среда на повърхността на раната (защото рН на нормалната човешка кожа варира между 4.0 и 6.8) и по този начин би ускорило процеса на зарастване на раната в сравнение с неутралната и алкалната среда. Филмите CZN показват рН на превръзката в диапазона между 5.5 и 6.5, който е представен на фигура 5. Тези стойности са в съответствие с стойностите на рН на превръзката (5.50-7.80). От този резултат може да се заключи, че CZN нанокomпозитният филм има способността да осигури киселинна среда към повърхността на раната, която може да подобри нормалната клетъчната пролиферация и образуването на фибробласти.



Фиг. 5. Измерване на рН на хитозан-зеолит нанокomпозитни филми.

ИЗВОДИ

Серия от нови хитозано-зеолитни нанокomпозитни филми се приготвят чрез използване на метод за леене с разтворител под форма на нанокomпозитни биофилми за приложение при заздравяване на рани. FTIR спектрите потвърдиха взаимодействия Н-свързване между хидроксилните групи на зеолита с хидроксилните и аминокиселинните групи на хитозана. Съдържанието както на хитозана, така и на хитозан-зеолит нанокomпозит е оптимизирано въз основа на сгъваемата издръжливост на приготвените нанокomпозитни филми, следвани от изучаване на способностите за абсорбция на вода, пропускливост на

водна пара, измервания на порьозността, рН и др. Включването на подходящо количество зеолит в разтворената смес по отношение на хитозана, за да се изработят нанокomпозитните филми, драстично подобрява почти всички свойства, които са необходими за идеалния облицовъчен материал за рани като регенерация за заздравяване на рани, подобряване на доставянето на кислород. Установено е, че проба от CZN 4 е най-подходящото съотношение за изготвяне на превързочни материали.

REFERENCES

Archana D., Dutta J., Dutta P.K. (2013). Synthesis of ethylenediamine modified chitosan and evaluation for removal of divalent metal ions, *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 Biological Macromolecules*, 73, 49-57.

Dutta, P., J. Dutta, V. Tripathi, (2004). Chitin, and chitosan chemistry, properties and application. *Journal Scientific Industrial Research*, 63, 20-30.

Singh J., P.K. Dutta, (2010). Preparation, Antibacterial and Physicochemical Behavior of Chitosan/Ofloxacin Complexes, *International Journal Polymer Materials and Polimeric Biomaterials*, 59, 793-807.

Singh D., A. Ray, (2000). Biomedical Applications of Chitin, Chitosan, and Their Derivatives, *Journal Macromolecular, Science Polymer Reviewers Part C*, 40, 69-83.