

PŘÍPRAVA POLYSACHARIDOVÝCH FILMŮ NA BÁZI CHITOSANU A CELULOSY

MARKÉTA PIŠLOVÁ, KATEŘINA KOLÁŘOVÁ,
VLADIMÍRA VOSMANSKÁ, ONDŘEJ KVÍTEK
a VÁCLAV ŠVORČÍK

*Ústav inženýrství pevných látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha
kolarova@vscht.cz*

Došlo 19.5.15, přijato 19.8.15.

Klíčová slova: chitosan, mikrokrytalická celulóza, stříbro, příprava a charakterizace filmů

Úvod

Polymerní materiály bývají často používány k biomedicínským účelům. Mezi jejich hlavní výhody patří cenová dostupnost, snadná příprava a také dobré mechanické vlastnosti. Biologické vlastnosti lze zlepšit fyzikální nebo chemickou modifikací jejich povrchu. Pro tkáňové inženýrství je u polymerů nezbytné zejména zvýšit adhezi, růst a homogenitu pokryvu buněk na povrchu polymeru¹.

Používání přírodních polymerů jako biomateriálů je známo už tisíce let. Přírodní polymery vznikají v rostlinných i v živočišných organismech složitými biochemickými procesy. Výhodou přírodních polymerů je jejich složení, které je velmi podobné a v některých případech se může dokonce i shodovat s tkáněmi lidského organismu. Právě proto je organismus připraven je rozpoznat a metabolicky zpracovat. Problémy s toxicitou a zánětlivými reakcemi bývají u těchto materiálů minimalizovány, anebo úplně potlačeny².

Mezi přírodní polysacharidy patří chitosan, který se získává alkalickou deacetylací chitinu³. Chitosan je druhým nejrozšířenějším polysacharidem na Zemi hned po celulóze⁴. Chitosan má vynikající biologické vlastnosti, je netoxický, biokompatibilní a biodegradabilní. Své uplatnění našel v různých oborech. Používá se v medicíně, kosmetice, agrochemii, při čištění vody a impregnaci látek. Ve farmacii jej lze použít jako systém pro řízené uvolňování léčiva^{3,5}. Dále je oblíben také pro své antibakteriální účinky vůči mnoha kmenům gram pozitivních i gram negativních bakterií⁶. Antibakteriální účinky chitosanu lze významně zvýšit přidáním stříbrných iontů. Právě chitosanem stabilizované stříbrné nanočástice vykazují velmi slibné antibakteriální vlastnosti^{7,8}. Je známo, že chitosan je špatně rozpustný ve vodě a v „běžných“ organických rozpouštědlech⁹. V kyselém prostředí dochází k protonaci aminoskupin a chitosan se stává rozpustným. Mezi nejčastěji používané roztoky, ve kterých se chitosan rozpouští,

patří např. vodné roztoky kyseliny octové, citronové, mravenčí, glutamové či chlorovodíkové¹⁰.

Celulóza patří mezi nejrozšířenější polysacharidy na Zemi. Díky hojnému výskytu představuje celulóza snadno dostupný přírodní polymer. Jedná se dokonce o nejrozšířenější organickou sloučeninu na Zemi. Ročně jí biosyntézou vzniká asi 10^{11} tun (cit.⁶). Je proto logické, že výzkumu struktury, výroby, vlastností i použití celulósy bylo a je věnováno mnoho rozsáhlých prací¹¹. Uplatnění celulósy nacházíme např. v zemědělství, potravinářském, textilním a také v papírenském průmyslu. Své využití našla celulóza rovněž při čištění vody. Polymery na bázi celulósy se často aplikují i ve tkáňovém inženýrství a ve farmacii, kde se používají jako nosič pro kontrolovaný transport léčiv v těle. V medicíně se uplatňují např. jako čističe krve, obvazové materiály a také při ztrátách kožního krytu (např. popáleniny), kdy se využívá toho, že se v přítomnosti derivátů celulósy nevytváří izolovaná vrstva a kůže se rychleji uzdravuje¹².

Tato práce se věnuje metodice přípravy kompozitních filmů na bázi chitosan/celulóza. Dále tyto chitosan/celulósové filmy byly dotovány dusičnanem stříbrným. Byl studován vliv přídavku polyethylenglykolu (o různých relativních molekulových hmotnostech) na změnu materiálových vlastností chitosanu a tvorbu stříbrných nanočástic. Byla studována absorpce vody (gravimetricky) a povrchová smáčivost připravených filmů a hodnoty jejich kontaktních úhlů (goniometricky), jejich povrchová morfologie (konfokální mikroskopie) a množství Ag nanočástic (UV-Vis spektroskopie).

Experimentální část

Používané materiály

V práci byly použity následující chemikálie: chitosan ve formě prášku (Sigma-Aldrich, Německo), mikrokrytalická celulóza (Modernist Pantry, USA), polyethylenglykol (PEG) o molární hmotnosti 400 (Sigma-Aldrich, Švýcarsko) a 20 000 (Merck, Německo) g mol^{-1} , dusičnan stříbrný (Lachema, Česká republika), kyselina octová (Lach-Ner, Česká republika) a destilovaná voda.

Příprava dotovaných filmů chitosanu

Pro přípravu filmů byl připraven 0,5% roztok chitosanu. Chitosanový prášek byl dispergován v destilované vodě s přídavkem kyseliny octové (do finální koncentrace 0,2 hm.%). Míchání bylo prováděno při teplotě 60 °C do úplného rozpuštění chitosanu. Při přípravě dotovaných filmů byl v dalším kroku do roztoku chitosanu přidán AgNO_3 do finální koncentrace 0,01 mol l^{-1} . Tento roztok byl míchán při teplotě 95 °C do změny barvy. Barva roztoku se mění za zvýšené teploty z bezbarvého na žlutý až okrový, což názorně indikuje redukci stříbrných iontů na nanočástice stříbra¹³. Do roztoku byla přisypána mikrokrytalická celulóza tak, aby výsledný hmotnostní poměr chitosan/celulóza byl 1:1. Roztok se míchal při stejných

podmínkách po dobu 1 hodiny. Takto připravený roztok se dávkoval do silikonových forem o průměru 5 cm (10 ml na jednu jamku). Vzorky byly sušeny při teplotě 60 °C po dobu 16 hodin. Dále byl při přípravě měkčených filmů použit polyethylenglykol (PEG, molární hmotnost 400 a 20 000 g mol⁻¹, PEG 400 a PEG 20 000) v hmot. poměru 1:2 (PEG/chitosan). PEG 400 popř. 20 000 byl přidán do roztoku chitosanu před začátkem míchání.

Analýza vzorků

Kontaktní úhel na povrchu připravených chitosanových filmů byl sledován na přístroji See System (Surface Energy Evaluation System, Advex Instruments, Brno). Testovací kapalinou byla voda při laboratorní teplotě a objemu kapky 8 µl. Kontaktní úhel byl sledován a vyhodnocen do ca 5 s po nanesení vody na povrch¹⁴. Kvůli statistice měření bylo sledováno 10 vzorků.

Absorpce vody chitosanovými filmy byla sledována „standardním“ postupem¹⁵, a vypočítána jako rozdíl hmotností nasáklého a suchého vzorku vztažený na hmotnost suchého vzorku. Vzorek byl po zvážení ponořen na 1 min do kádinky s vodou. Poté byl vzorek vyjmut a ponechán po dobu 1 min ve svislé poloze okapat a poté opět zvážen. Kvůli statistice měření bylo váženo 10 vzorků.

Na konfokálním mikroskopu Lext OLS3100 (Olympus, Německo) byly získány 3D snímky povrchu jednotlivých náhodně vybraných filmů v konfokálním intenzitním módu. Jako zdroj záření byla využita polovodičová laserová dioda s vlnovou délkou 408 nm. Celkové zvětšení optické soustavy v této konfiguraci dosahovalo hodnoty 1200.

UV-Vis spektra byla sledována na spektrometru LAMBDA 25 (PerkinElmer, USA). Spektra byla měřena v roztoku chitosanových filmů v acetátovém pufru (pH 4,65, Fluka, Švýcarsko) ve vlnovém rozsahu 300–700 nm při rychlosti 240 nm min⁻¹ s krokem 1 nm.

Výsledky a diskuse

Mezi důležité vlastnosti filmů určených ke kontaktu s živou tkání patří absorpce exudátu. V současné době se využívají na hojení ran prostředky, které dokážou upravovat a udržovat vlhkost v prostředí rány a zároveň absorbo-

vat sekret z ran¹⁶. Hodnoty kontaktního úhlu určují smáčivost povrchu a tím i schopnost materiálu velmi dobře přilnout k ráně.

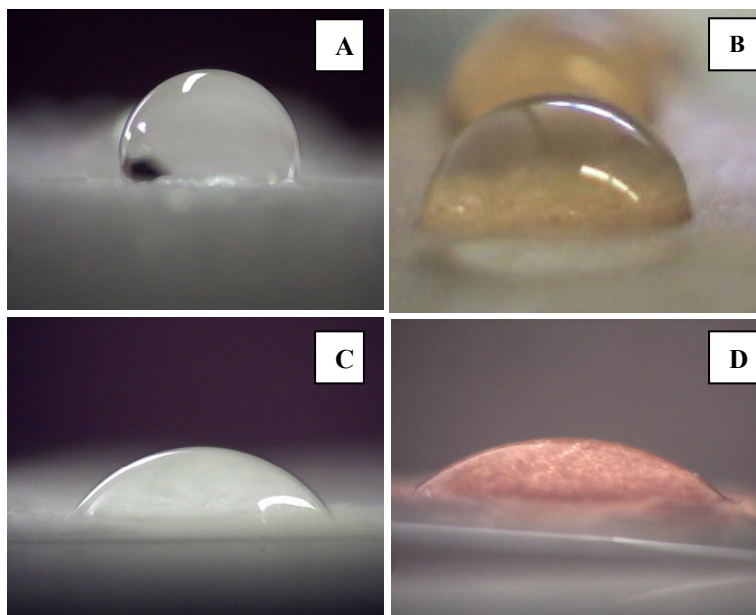
Výsledky měření absorpce vody a kontaktního úhlu jsou uvedeny v tab. I. Je zřejmé, že polyethylenglykol významně mění materiálové vlastnosti připravených filmů. Vzorky s přísadkou PEG 400 i PEG 20 000 vykazují nižší absorpci i nižší hodnoty kontaktního úhlu. To znamená, že po přidání PEG dochází ke snížení absorpce a zároveň ke zvýšení smáčivosti povrchu. Vliv na hodnoty absorpce vody i kontaktního úhlu má také složení studovaných filmů. Vzorky připravené na bázi chitosan/celulosa mají vyšší hodnoty absorpce vody i kontaktního úhlu ve srovnání se vzorky, které jsou navíc dotované stříbrem. Obr. 1 názorně dokumentuje tvar kapky na povrchu vybraných filmů zachycený kamerou při měření kontaktního úhlu a tím doplňuje výsledky uvedené v tab. I.

Povrchová morfologie byla studována konfokálním laserovým rastrovacím mikroskopem. Snímky jsou uvedeny na obr. 2. Relativně vysoká drsnost povrchu vzorku chitosan/celulosa významně klesá po přísadce PEG i stříbrných nanočástic. Přídavné látky tak zřejmě způsobují změnu viskozity a tokových vlastností roztoku chitosanu před jeho vysoušením a při něm. V případě vzorků se stříbrnými nanočásticemi jsou na povrchu patrné „roztroušené“ drobné nerovnosti, pravděpodobně způsobené shluky Ag nanočástic. Zejména u snímku vzorku chitosan/celulosa/PEG20 000 vystupují z povrchu sférické útvary, které lze přisoudit krystalitům PEG.

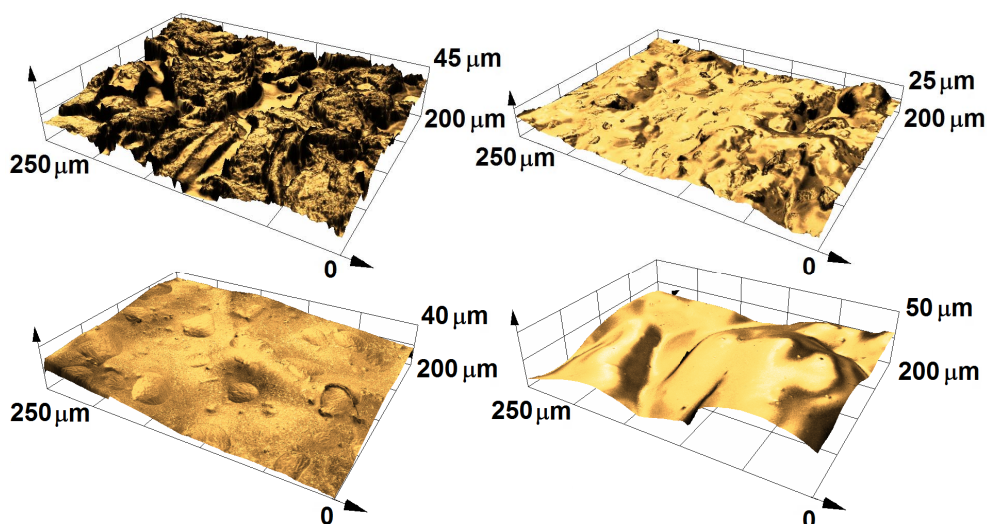
Metodou UV-Vis spektroskopie byla studována přítomnost stříbrných nanočástic v roztocích acetátového pufru, ve kterém byly rozpuštěny jednotlivé typy dotovaných filmů. Po rozpuštění měly roztoky světle žluté až oranžové zbarvení, což souvisí s koncentrací stříbrných nanočástic v roztoku. Právě toto zbarvení způsobené absorpcí při vlnové délce cca 400 nm je charakteristické pro přítomnost stříbrných nanočástic¹⁷. Stabilitu roztoků obsahujících nanočástice může ovlivnit řada vlivů, např. působení světla, stálost pH, teplota. Nejsilnější absorpci vykazuje při vlnové délce cca 400 nm vzorek chitosan/celulosa/PEG20 000/Ag, který současně obsahuje nejvíce stříbrných nanočástic. Je známo, že vlnová délka maxima absorpce u kovy dotovaných filmů závisí také na jejich velikosti, tvaru a aglomeraci nanočástic¹⁷. Maximum ab-

Tabulka I
Absorpce vody a hodnoty kontaktního úhlu studovaných filmů

Vzorek	Absorpce vody [bezrozm. veličina]	Kontaktní úhel [°]
Chitosan-celulosa	9,2 ± 1,8	94 ± 5
Chitosan-celulosa-PEG 400	7,3 ± 1,7	64 ± 6
Chitosan-celulosa-PEG 20 000	6,5 ± 1,1	60 ± 7
Chitosan-celulosa-Ag	8,6 ± 0,9	82 ± 2
Chitosan-celulosa-PEG 400-Ag	5,1 ± 1,5	48 ± 9
Chitosan-celulosa-PEG 20 000-Ag	4,7 ± 1,4	35 ± 8



Obr. 1. Goniometrická měření kontaktního úhlu na povrchu studovaných filmů: (A) chitosan/celulosa, (B) chitosan/celulosa/Ag, (C) chitosan/celulosa/PEG a (D) chitosan/celulosa/PEG/Ag

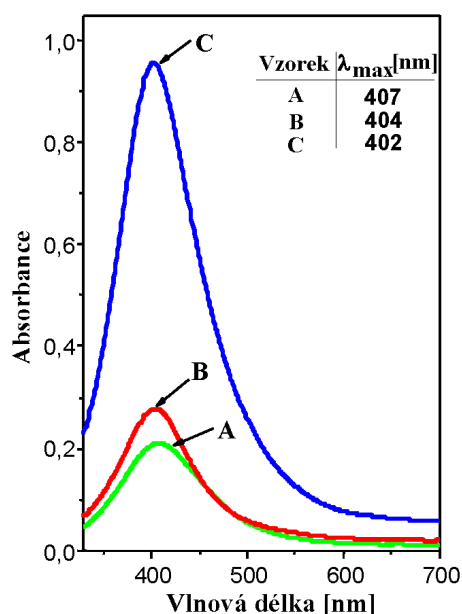


Obr. 2. 3D snímky povrchu filmů získané pomocí konfokálního mikroskopu: (A) chitosan/celulosa, (B) chitosan/celulosa/Ag, (C) chitosan/celulosa/PEG a (D) chitosan/celulosa/PEG/Ag

sorpce na nižší vlnové délce naznačuje, že v roztoku se nacházejí menší nanostruktury. Šířka pásu absorpčního maxima souvisí s distribucí velikosti kovových nanočástic. Pro absorpční pás při vlnové délce 405 nm udávají Huang a spol.¹⁸ velikost nanočástic pod 70 nm. Na základě výsledků uvedených na obr. 3 lze předpokládat, že připravené roztoky obsahovaly stříbrné nanočástice o velikosti v řádu desítek nanometrů. Dále je patrné, že nejmenší částice byly detegovány u vzorku chitosan/celulosa/PEG20 000/Ag.

Závěr

Bylo připraveno 6 typů kompozitních filmů na bázi chitosan/celulosa. Porovnáním materiálových vlastností bylo zjištěno, že přidavkem polyethylenglykolu se mění absorpce vody i smáčivost připravených filmů. Filmy, které obsahovaly PEG, vykazovaly lepší smáčivost povrchu a nižší absorpci vody. Přídavek PEG také změnil povrchovou morfologii připravených vzorků, kdy dochází ke snížení povrchové drsnosti. Nižší absorpci vody a lepší



Obr. 3. UV-Vis spektra chitosanových filmů rozpuštěných v acetátovém pufru: (A) chitosan/celulosa/Ag, (B) chitosan/celulosa/PEG400/Ag a (C) chitosan/celulosa/PEG20 000/Ag. Tabulka vložená do obr. 3 udává vlnovou délku, při které byla stanovena maximální absorbance vzorků A-C

smáčivost vykazovaly i vzorky s přidavkem AgNO_3 . Přídavek PEG a jeho molekulová hmotnost ovlivňuje i velikost a koncentraci stříbrných nanočástic v roztoku po rozpuštění dotovaných filmů. Vzorky s PEG obsahovaly vyšší koncentraci a menší nanočástice stříbra. Tyto výsledky naznačují, že u tohoto typu filmů by bylo vhodné následně studovat jejich antibakteriální vlastnosti s cílem přípravy nového typu materiálu pro krytí poškozeného kožního krytu.

Autoři děkují za finanční podporu Grantové agentury ČR v projektu P108/12/G108.

LITERATURA

1. Slepíčka P., Siegel J., Lyutakov O., Švorčík V.: *Chem. Listy* 106, 875 (2012).
2. Vavříková E., Vinšová J.: *Chem. Listy* 103, 56 (2009).
3. Rinaudo M.: *Prog. Polym. Sci.* 31, 603 (2006).
4. Zhao H., Xu J., Lan W., Wang T., Luo G.: *Chem. Eng. J.* 229, 1358 (2013).
5. Saini R. K., Srivastava A. K., Gupta P. K., Das K.: *Chem. Phys. Lett.* 511, 326 (2011).
6. Kодиček M.: *Biochemické pojmy - výkladový slovník*.

VŠCHT Praha, Praha 2004.

7. Kolářová K., Vosmanská V., Rimpelová S., Ulbrich P., Švorčík V.: *J. Nanosci. Nanotechnol.*, v tisku.
8. Vosmanská V., Kolářová K., Rimpelová S., Kolská Z., Švorčík V.: *RSC Adv.* 5, 17690 (2015).
9. Kim K. M., Son J., Kim S. K., Weller C. L., Hanna M. A.: *J. Food Sci.* 71, E119 (2006).
10. Agnihotri S. A., Mallikarjuna N. N., Aminabhavi T. M.: *J. Controlled Release* 100, 5 (2004).
11. Novotná K., Havelka P., Sopuch T., Kolářová K., Vosmanská V., Lisá V., Švorčík V., Bačáková L.: *Cellulose* 20, 2263 (2013).
12. Fu L., Zhang J., Yang G.: *Carbohydr. Polym.* 92, 1432 (2013).
13. Regiel A., Irusta S., Kyzioł A., Arruebo M., Santamaria J.: *Nanotechnol.* 24, 15101 (2013).
14. Švorčík V., Hubáček T., Slepíčka P., Siegel J., Kolská Z., Bláhová O., Macková A., Hnatowicz V.: *Carbon* 47, 1770 (2009).
15. Vosmanská V., Kolářová K., Rimpelová S., Švorčík V.: *Cellulose* 21, 2445 (2014).
16. Sopuch T., Drahovzalová V., Rýdl J., Bureš I., Miličchovský M., Vytřasová J., Mořková P., Švorčík V., Podlaha J., Horáková M., Masteiková R., Vinklárková L., Suchý P.: *Hojení ran* 2, 14 (2013).
17. Siegel J., Kolářová K., Vosmanská V., Rimpelová S., Leitner J., Švorčík V.: *Mater. Lett.* 113, 59 (2013).
18. Huang T., Xu X.-H. N.: *J. Mater. Chem.* 20, 9867 (2010).

M. Pišlová, K. Kolářová, V. Vosmanská, O. Kvítek, and V. Švorčík (*Department of Solid State Engineering, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Preparation of Polysaccharide Films Based on Chitosan and Cellulose**

Preparation of composite films based on chitosan – cellulose mixtures, with or without added AgNO_3 , was studied. The influence of addition of poly(ethylene glycol) (PEG) on the material properties and formation of Ag nanoparticles also investigated. Wettability, water absorption and surface morphology of the films were evaluated. UV-Vis absorption spectra were measured for AgNO_3 -containing composites after dissolution in acetate buffer. Absorbance maxima at 400 nm confirmed the presence of Ag nanoparticles. Addition of PEG to the polymer mixtures decreased water absorption, increased wettability and considerably changed the surface morphology of the films. PEG addition also leads to increased concentrations of Ag nanoparticles in the polymers after their dissolution. The nanoparticle size is influenced as well. It is apparent that PEG can noticeably alter material properties of chitosan – cellulose composites.