

POLITECHNIKA ŁÓDZKA

WYDZIAŁ TECHNOLOGII MATERIAŁOWYCH I WZORNICTWA TEKSTYLIÓW



ROZPRAWA DOKTORSKA

Chemiczna modyfikacja chitozanu

mgr inż. Dominik Sikorski

Dyscyplina Inżynieria Materiałowa

Promotor

dr hab. inż. Zbigniew Draczyński, prof. PŁ

Łódź 2023

Promotorowi niniejszej pracy

Panu dr hab. inż. Zbigniewowi Draczyńskiemu, prof. PŁ

Składam serdeczne podziękowania za wszechstronną
pomoc, poświęcony czas
oraz cenne wskazówki merytoryczne.

Wszystkim Pracownikom

Institutu

Materiałoznawstwa Tekstyliów

i Kompozytów Polimerowych

serdecznie dziękuję za życzliwość i przyjazną
atmosferę, której dane mi było doświadczyć w trakcie
realizacji badań na potrzeby niniejszej pracy.

Abstract

Biopolymers and in particular polysaccharides, of which chitosan is one, are of increasing interest to researchers. Biopolymer materials are used as biomaterials in medical applications and in the wider chemical industry. They are characterised by their high biocompatibility, lack of toxicity and biodegradability.

Doctoral thesis presents a comparative study of chitosan degradation in organic acid solutions. The aim of the study was to determine the dependence of chitosan degradation kinetics on acid strength and to determine selected physicochemical and biological properties of chitosan-acid systems.

Researchers working on chitosan have to date mainly focused on its solutions in acetic acid. In the present study, the possibility of using other organic acids such as lactic acid, acetic acid, malic acid and formic acid to prepare chitosan solutions was investigated.

The results of these studies can be considered very important in terms of further utilitarian applications of these solutions. An important issue was to verify their stability over time, which is important in terms of their further processing. The selection of a suitable chitosan dissolution medium is influenced by the value of the acid dissociation constant, which affects their degradation kinetics.

The emphasis is on antimicrobial properties with an emphasis on bacteriostaticity. Chitosan achieves its bacteriostatic properties by protonating the amino groups. In the literature, it is assumed that chitosan alone inhibits bacterial growth. A comparative study of chitosan nonwovens modified with different acids, including acetic acid, propionic acid, butyric acid, valerian acid and hydrochloric acid, is presented. The aim of the study was to determine which acid salts affect the antibacterial and additionally antifungal activity of chitosan-based materials. For the modification (formation of ammonium salts) of chitosan nonwovens, treatment in a saturated vapour environment over an acid solution and modification in a solution of the corresponding acid, ethanol, were used. Acetic acid and

hydrochloric acid proved to be the most effective modifiers of the surface layers of chitosan forms.

The effects of the concentration of the acid solution in ethanol, the treatment time of the chitosan materials with solutions of the respective acids and the effect of the final rinsing process of the modified nonwovens on the antimicrobial activity were investigated.

The results of a study on the preparation of a chitosan film as a model structure containing ciprofloxacin on its surface for use as a model drug are presented. A unique ciprofloxacin structure was obtained, which not only imparts new biocidal properties to chitosan films, but also changes their surface structure.

The form in which the drug binds to the surface of the chitin film was confirmed. Spectroscopic studies showed that in the process of applying ciprofloxacin to the surface of the chitosan film, ciprofloxacin was transformed from a crystalline to an amorphous form, thus improving its bioavailability and range of microbial activity.

Streszczenie

Biopolimery, a w szczególności polisacharydy, do których należy chitozan są przedmiotem wzrastającego zainteresowania naukowców. Materiały biopolimerowe są wykorzystywane jako biomateriały w zastosowaniach medycznych oraz w szeroko pojętym przemyśle chemicznym. Charakteryzują się wysoką biogodnością, brakiem toksyczności oraz biodegradowalnością.

W pracy przedstawiono badania porównawcze degradacji chitozanu w roztworach kwasów organicznych. Celem badań było określenie zależności kinetyki procesu degradacji chitozanu od mocy kwasu oraz określenie wybranych cech fizykochemicznych i biologicznych układów chitozan - kwas.

Naukowcy zajmujący się chitozaniem do chwili obecnej skupiali się w głównej mierze na jego roztworach w kwasie octowym. W niniejszej pracy badano możliwość wykorzystania innych kwasów organicznych, takich jak kwas mlekowy, octowy, jabłkowy i mrówkowy do sporządzania roztworów chitozanu.

Wyniki tych badań można uznać za bardzo ważne w aspekcie dalszych użytkowych zastosowań tych roztworów. Istotnym zagadnieniem było zweryfikowanie ich stabilności w czasie co jest istotne w punktu widzenia ich dalszego przetwórstwa. Na dobór odpowiedniego medium rozpuszczającego chitozan ma wartość stałej dysocjacji kwasów, która wpływa na ich kinetykę degradacji.

Skupiono się na właściwościach przeciw drobnoustrojowym z naciskiem na bakteriostatyczność. Chitozan uzyskuje właściwości bakteriostatyczne poprzez protonowanie swoich grup aminowych. W literaturze przyjmuje się, że sam chitozan hamuje wzrost bakterii. Przedstawiono badania porównawcze włókien chitozanowych modyfikowanych różnymi kwasami, w tym kwasem octowym, propionowym, masłowym, walerianowym jak i kwasem solnym. Celem pracy było określenie, które sole kwasów wpływają na aktywność przeciwbakteryjną i dodatkowo przeciwgrzybiczą materiałów na bazie chitozanu. Do modyfikacji (tworzenia soli amonowych) włókien chitozanowych

zastosowano obróbkę w środowisku gazowym nasyconej pary nad roztworem kwasu i modyfikacje w roztworze odpowiedni kwas - etanol. Najskuteczniejszymi modyfikatorami warstw powierzchniowych form chitozanu okazały się kwas octowy i kwas chlorowodorowy.

Zbadano wpływ stężenia roztworu kwasu w etanolu, czasu obróbki materiałów chitozanowych roztworami poszczególnych kwasów oraz wpływ procesu końcowego płukania modyfikowanych włókien na aktywność przeciwdrobnoustrojową.

Przedstawiono wyniki badań nad otrzymywaniem folii chitozanowej jako struktury wzorcowej zawierającej na swojej powierzchni cyprofloksacynę do zastosowania jako lek modelowy. Uzyskano unikalną strukturę cyprofloksacyny, która nie tylko nadaje nowe właściwości biobójcze filmom chitozanu, ale również zmienia ich strukturę powierzchni.

Potwierdzono, w jakiej formie lek łączy się z powierzchnią folii chitynowej. Badania spektroskopowe wykazały, że w procesie nanoszenia cyprofloksacyny na powierzchnię folii chitozanowej, cyprofloksacyna została przekształcona z formy krystalicznej w amorficzną, poprawiając tym samym jej biodostępności i zakres działania mikrobiologicznego.

Spis treści

I. WPROWADZENIE	11
II. CZĘŚĆ LITERATUROWA.....	12
1. POLIMERY.....	12
2. POLISACHARYDY	12
3. BIOPOLIMERY	14
4. CHITYNA	15
4.1. Chityna - źródła pozyskania.....	16
4.2. Budowa chemiczna chityny	19
4.3. Ekstrakcja chityny.....	21
4.3.1. Demineralizacja	22
4.3.2. Odbiałczanie	22
4.3.3. Deacetylacja chityny (synteza chitozanu).....	24
4.4. Wpływ stopnia deacetylacji chitozanu i masy molowej na jego właściwości.....	25
5. PRZECIWDROBNOUSTROJOWE DZIAŁANIE CHITOZANU I CHITYNY	26
5.1. Działanie biobójcze chitozanu względem bakterii poprzez zakłócenie funkcjonowania błony oraz ściany komórkowej.....	27
5.2. Wpływ stopnia deacetylacji na działanie biobójcze względem bakterii.....	28
5.3. Wpływ parametrów pKa i pH kwasu użytego do rozpuszczenia chitozanu na jego działanie przeciw bakteryjne.....	28
5.4. Chelatowanie metali przez struktury chitozanowe	29
5.5. Wpływ masy cząsteczkowej chitozanu na właściwości biobójcze.....	30
6. CIPROFLOXACYNA JAKO SUBSTANCJA WSPOMAGAJĄCA DZIAŁANIE PRZECIWBAKTERYJNE CHITOZANU	31
7. ZASTOSOWANIE CHITYNY I CHITOZANU.....	32
8. CHITOZAN I CHITYNA JAKO PREKURSORY HEMOSTAZY I GOJENIA SIĘ RAN	33
III. CEL I ZAKRES PRACY	34
IV. CZĘŚĆ EKSPERYMETALNA.....	37
4. MATERIAŁY I METODY BADAWCZE.....	37
4.1. MATERIAŁY	37
4.2. APARATURA	39
4.3. WYTWARZANIE MATERIAŁÓW CHITOZANOWYCH	40
4.3.1. Badania degradacji chitozanu w wodnych roztworach kwasów.....	40
4.3.2. Wytwarzanie włóknin chitozanowych metodą zgrzeblenia	40
4.3.3. Wytwarzanie folii chitozanowych.....	41
4.4. MODYFIKACJE WYTWORZONYCH MATERIAŁÓW CHITOZANOWYCH	42
4.4.1. Modyfikacja włóknin chitozanowych.....	42
4.4.2. Modyfikacja folii chitozanowych.....	44
4.5. CZĘŚĆ ANALITYCZNA	45
4.5.1. Oznaczanie ilości grup amoniowych.....	45
4.5.2. Analiza FTIR kwasowej formy soli chitozanu	47
4.5.3. Pomiary lepkości roztworów chitozanowych.....	48
4.5.4. Analiza chromatografii żelowej GPC/SEC próbek chitozanu po procesie degradacji.....	49
4.5.5. Analiza spektroskopii 1-H NMR próbek chitozanu	49
4.5.6. Analiza spektroskopii 1H - NMR soli kwasów chitozanu.....	50
4.5.8. Podatność na kolonizację mikrobiologiczną próbek włókniny chitozanu.....	51

4.5.9. Aktywność bakteriobójczą włóknin chitozanowych	52
4.5.10. Aktywność hemolityczna próbek chitozanu	52
4.5.11. Wyznaczanie kinetyki degradacji chitozanu	53
4.5.12. Analiza GPC/SEC - określenie masy cząsteczkowej chitozanu	53
4.5.13. Ilościowa ocena zawartości ciprofloksacyny w fizycznym addukcie chitozan - ciprofloksacyna metodą RP-HPLC	54
4.5.14. Analiza powierzchni adduktu ciprofloksacyny do chitozanu metodą AFM.....	54
4.5.15. Analiza powierzchni adduktu ciprofloksacyny do chitozan - metodą SEM.....	54
4.5.16. Analiza fizycznych adduktów folii chitozan i chitozan - ciprofloksacyna poddanych działaniu oparów kwasu octowego metodą FTIR.....	55
4.5.17. Analiza fizycznego adduktu chitozan – ciprofloksacyna metodą NMR	55
4.5.18. Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej fizycznego adduktu folii chitozan - ciprofloksacyna i chitozan - ciprofloksacyna poddanych działaniu oparów kwasu octowego	56
V. ZESTAWIENIE I OMÓWIENIE WYNIKÓW.....	59
5.1. WYNIKI POMIARÓW DEGRADACJI CHITOZANU W RÓŻNYCH KWASACH	59
5.1.1. Wyniki pomiarów lepkości istotnej soli chitozanu poddanej procesowi degradacji.....	59
5.1.2. Analiza wyników GPC/SEC.....	61
5.1.3. Kinetyka degradacji chitozanu	67
5.1.4. Analiza ¹ H NMR	71
5.2. WYNIKI POMIARÓW PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH WŁÓKNIN CHITOZANOWYCH W RÓŻNYCH KWASACH.....	73
5.2.1. Objętość retencji kwasu dla próbek włóknin chitozanu.....	73
5.2.2. Badania mikrobiologiczne i wpływ modyfikowanych materiałów chitozanowych na proces hemolizy i toksyczność dla ludzkich krwinek czerwonych	76
5.2.3. Analiza struktury chemicznej otrzymanych soli chitozanu w oparciu o FTIR ATR	83
5.2.4. Analiza ¹ H-NMR soli chitozanu i kwasu chlorowodorowego i octowego	87
5.3. WYNIKI POMIARÓW PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH FOLII CHITOZANU Z ADDUKTEM CIPROFLOKSACYNY	90
5.3.1. Analiza otrzymanych folii soli chitozanu w oparciu o widma FTIR ATR	90
5.3.2. Badania NMR ciała stałego adduktu ciprofloksacyny do chitozanu	94
5.3.3. Analiza AFM adduktu ciprofloksacyny do chitozanu w postaci folii.....	99
5.3.4. Analiza obrazów SEM folii chitozanowych z adduktem ciprofloksacyny	101
5.3.5. Analiza adhezji ciprofloksacyny na powierzchni krążków chitozanowych	103
5.3.6. Analiza aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej adduktu CIP-chitozan w postaci filmu	104
V. WNIOSKI	108
SPIS TABEL.....	111
SPIS RYSUNKÓW.....	113
LITERATURA:.....	116

I. WPROWADZENIE

Biomateriały są wykorzystywane w wielu ważnych dziedzinach nauki takich jak medycyna (inżynieria tkankowa, medycyna regeneracyjna) oraz nanotechnologia. Wykorzystuje się je jako opatrunki, części implantów, czy nośniki leków. Zważywszy na duże zainteresowanie świata nauki oraz rosnące zapotrzebowanie przemysłowe, badacze koncentrują swoją uwagę na opracowaniu nowatorskich, tanich i szybkich technologii wytwarzania biomateriałów.

Inżynieria biomateriałowa to jedna z najszybciej rozwijających się gałęzi inżynierii materiałowej. W jej kręgu zainteresowania znajdują się metale, ceramika, szkło oraz polimery, zarówno sztuczne jak również naturalne. Wśród tych ostatnich największe zainteresowania wzbudza chitozan. Chitozan to polimer otrzymywany z chityny, która stanowi budulec pancerzy skorupiaków, owadów, mięczaków jak i tkanek grzybów. Wyróżnikiem tego polimeru jest bardzo dobra biogodność oraz bakteriobójczość a także niski koszt wytwarzania. Ważną zaletą jest również łatwa dostępność i rozpowszechnienie w przyrodzie. Pozwala to na pozyskanie cennego materiału bez nadmiernej eksploatacji ekosystemów i obciążania środowiska naturalnego, ponieważ znaczne ilości biopolimeru są pozyskiwane z odpadów poprodukcyjnych z przetwórstwa owoców morza.

Mając na uwadze wykorzystanie chitozanu w medycynie, stomatologii i farmacji konieczna jest dobra znajomość zależności jego struktury i właściwości fizycznych od sposobu pozyskiwania omawianego biopolimeru. Pochodzenie surowca oraz sposób przetwarzania chitozanu wpływają bowiem na jego charakterystykę, w tym na stopień deacetylacji. Stopień deacetylacji decyduje o rozpuszczalności chitozanu w kwasach oraz zdolności do tworzenia folii i włókien. Zdolność do tworzenia folii i włókien jest ważnym parametrem, jeżeli materiał jest rozpatrywany jako surowiec do wytwarzania antibakteryjnych materiałów opatrunkowych. Wprowadzenie do matrycy jak i zmiana struktury powierzchni materiału wykonanego z chitozanu, wzmacnia jego bakteriostatyczność

oraz bakteriobójczość. Modyfikowane struktury chitozanowe mogą więc przyspieszać procesy naprawcze i gojenie ran.

II. CZĘŚĆ LITERATUROWA

1. Polimery

Nazwa polimer, wywodzi się z języka greckiego, składa się z dwóch wyrazów „poly” wyraża "wiele" a „meres” oznacza "części". Synonimem wyrażenia polimer jest makrocząsteczka. Inaczej mówiąc, polimery, zbudowane są z powtarzających się wielokrotnie segmentów o identycznej budowie chemicznej nazywanych merami. Polimery powstają w wyniku reakcji chemicznej cząsteczek zwanych monomerami, które łącząc się ze sobą tworzą długie łańcuchy. Taka molekula charakteryzuje się dużą masą cząsteczkową w przedziale (od 10000 g/mol do kilku kilkudziesięciu milionów g/mol) i składa się z powtarzających się jednostek strukturalnych połączonych każdorazowo wiązaniami kowalencyjnymi*(1).

2. Polisacharydy

Polisacharydy to polimery naturalne, szeroko rozpowszechnione w środowisku przyrodniczym. Do najpopularniejszych polisacharydów należą między innymi: celuloza, hemiceluloza, skrobia, chityna oraz alginiany. W zależności od źródła pozyskania, polisacharydy różnią się między sobą budową chemiczną elementarnej jednostki monosacharydowej, połączonej za pomocą wiązań glikozydowych. Utworzone w tak różnorodny sposób cząsteczki nadają im unikalne właściwości fizykochemiczne oraz aktywność biologiczną. Każdy polisacharyd cechuje się odmiennymi cechami ze względu na budowę chemiczną cząsteczki jak i właściwości wynikające z funkcji pełnionej w świecie przyrody. Przykładowo, grupy aminowe chitozanu są odpowiedzialne za jego właściwości antybakteryjne (2). Polisacharydy pełnią również inne funkcje, są między innymi materiałem budulcowym komórek oraz służą jako magazyn energii (3).

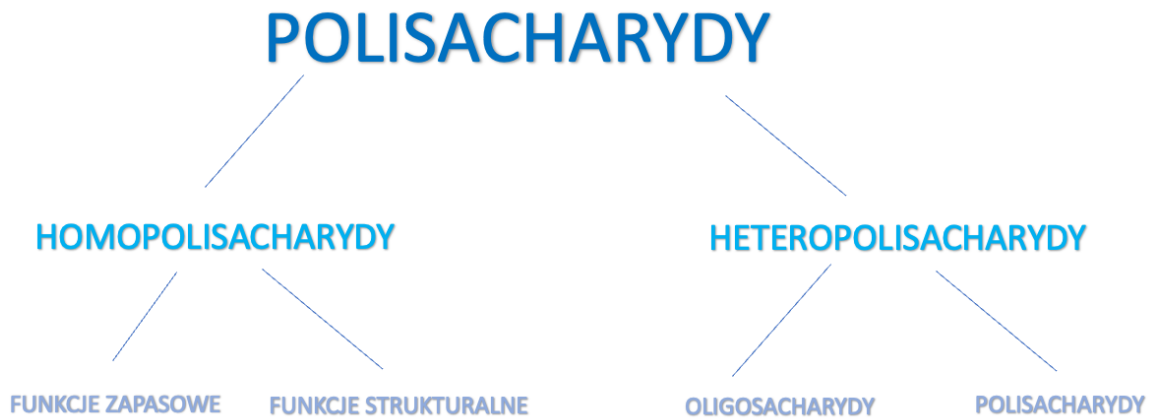
Nadrzędną grupą dla polisacharydów są węglowodany. Węglowodany z uwagi na skład cząsteczek dzielimy na monosacharydy (cukry proste) i polisacharydy (cukry złożone) co pokazuje rysunek 1.

Ze względu na budowę, cukry złożone podzielone są na oligosacharydy (od dwóch do dziesięciu cząsteczek monosacharydów) i polisacharydy (gdzie liczba monosacharydów przekracza dziesięć i może wynosić nawet wiele tysięcy) (4,5).



Rysunek 1. Podział węglowodanów (4,5)

Schemat podziału polisacharydów ze względu na budowę chemiczną jednostek strukturalnych łańcucha polimerowego oraz funkcji, które pełnią w organizmach przedstawia rysunek 2. Homopolisacharydy (np. celuloza, chityna) zbudowane są z jednego rodzaju menoz pełniących funkcje merów (6–8). Heteropolisacharydy (np. siarczan chondroityny) składają się z kilku różnych rodzajów menoz, które pełnią rolę merów w łańcuchu polimerowym (9,10).

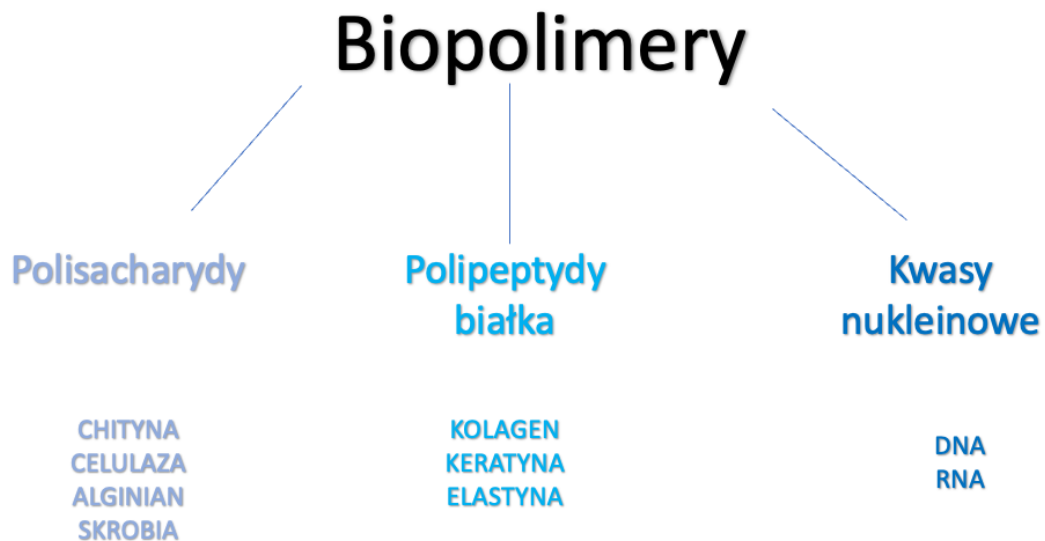


Rysunek 2. Podział polisacharydów ze względu na budowę i funkcje pełnione w organizmach (11)

3. Biopolimery

Termin biopolimer nawiązuje do dwóch greckich słów bio i polimer, odnoszących się do natury i żywych organizmów. Biopolimery, są to substancje organiczne, produkowane przez organizmy żywe (12,13). Z definicji: „Biopolimery to cząsteczki organiczne, które składają się z powtarzających się merów (cukrów) i są wytwarzane przez organizmy żywe. Homopolimery to takie cząsteczki, które składają się z jednego rodzaju meru, podczas gdy heteropolimery składają się z więcej niż jednego rodzaju meru” (14).

Biopolimery charakteryzują się biokompatybilnością oraz biodegradowalnością. Właściwości te umożliwiają wykorzystanie polimerów w różnych obszarach życia codziennego, począwszy od ochrony roślin do tak skomplikowanych dziedzin jak biosensory oraz szeroko pojęte aplikacje medyczne czy farmaceutyczne. Mogą być stosowane jako folie, emulsje, materiały do opakowań w przemyśle spożywczym, implanty medyczne (rusztowania tkankowe, organy medyczne), materiały opatrunkowe przyspieszające gojenie ran, jak również w przemyśle farmaceutycznym, gdzie wykorzystywane są do wytwarzania nowych materiałów przy kapsułkowaniu leków jako nośniki do transportu leków (15). Do najważniejszych grup biopolimerów zaliczamy: polinukleotydy, polipeptydy (białka złożone z peptydów) i polisacharydy (rysunek 3). Rozpowszechnionymi najbardziej makrocząsteczkami jednak są kwasy nukleinowe, białka, węglowodany oraz lipidy (16).



Rysunek 3. Podział biopolimerów na podstawie podjednostek meru (16).

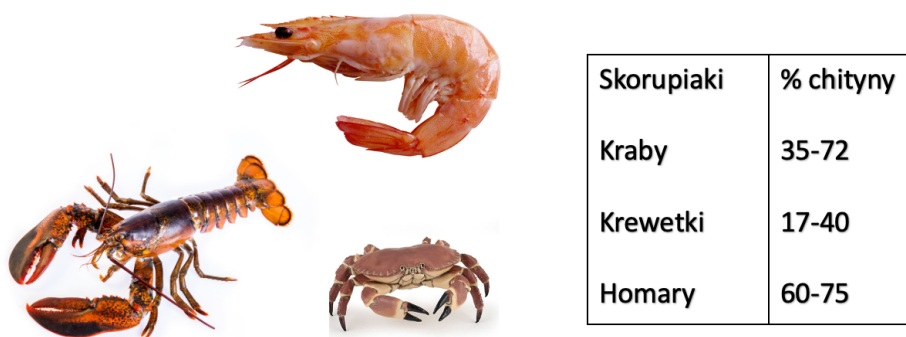
4. Chityna

Jednym z globalnie występujących polisacharydów w środowisku jest chityna. Jest to drugi po celulozie polimer należący do polisacharydów, który występuje licznie w środowisku naturalnym (17). Roczna szacunkowa produkcja chityny wynosi około 1000 miliardów kg (10^{11}).

Jako pierwszy badania nad tym polimerem rozpoczął francuski chemik Henri Braconnot w 1811 r. Współczesną nazwę tego polimeru zawdzięczamy Antoine Odier, który w 1823 r. odkrył ten sam związek chemiczny u owadów (18). Jego budowę chemiczną na podstawie przeprowadzonych badań opisał Albert Hofmann (19).

4.1. Chityna - źródła pozyskania

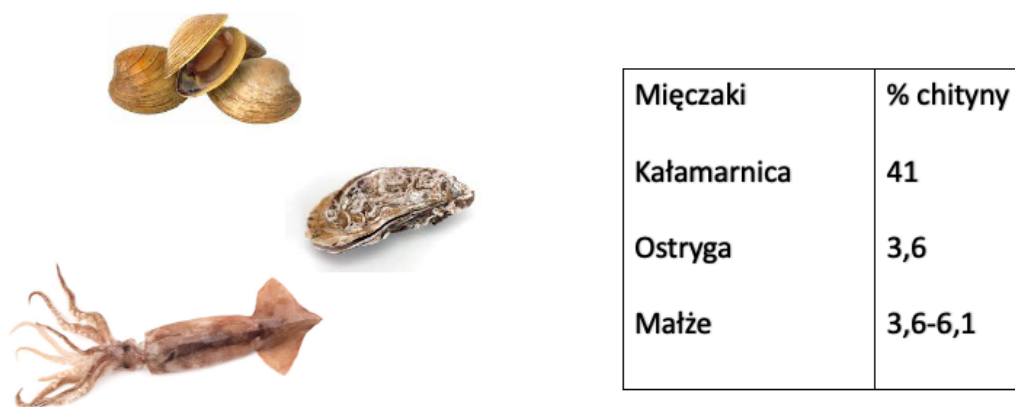
Chityna jest biopolimerem pozyskiwanym z wielu organizmów. Występuje egzoszkieletach skorupiaków (homarów, krewetek, kryla, pąkli, raków), mięczaków (ośmiornice, małży, małże, ostrygi, kalmary, ślimaki), glonów (okrzemki, brunatnice, zielenice), owadów (muchy domowe, jedwabniki, mrówki, karaluchy, pająki, chrząszcze, skorpiony, pszczoły miodne) oraz w ścianach komórkowych grzybów (*Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Phycomycetes* - *Aspergillus niger*, *Mucor rouxii*, *Penicillium notatum*, *Trichoderma reesi* (20–26). Procentową zawartość chityny u poszczególnych skorupiaków przedstawiono na rysunku 4.



Rysunek 4. Zawartości procentowa chityny u skorupiaków (27)

Obecnie głównym komercyjnym źródłem chityny są odpady z morskiego przemysłu spożywczego (27). W 2016 roku roczna światowa produkcja chityny z organizmów morskich przeznaczonych do spożycia wynosiła około 8 milionów ton (28). Pozyskano z nich 40% odpadów zawierających chitynę (29). Średnia zawartość chityny w odpadach przemysłu spożywczego z produkcji owoców morza wynosi od 20% do 30%. Niektóre gatunki skorupiaków mogą zawierać znacznie więcej chityny, jak na przykład skorupy homarów z gatunku *Nephro* i *Homarus* zawierają 60-75% chityny, a krabów *Cancer* i *Carcinus* od 72% do 64% (30). Nie wszystkie jednak skorupiaki posiadają duże zawartości chityny, niektóre skorupiaki w całkowitej masie ciała zawierają jedynie od 2 do 12% (31). Kryl występujący w wodach Antarktydy posiada od 34 do 49% chityny (32). Kałamarnice w swojej budowie

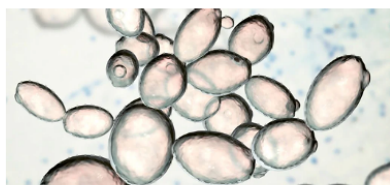
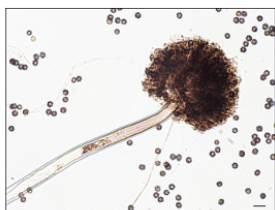
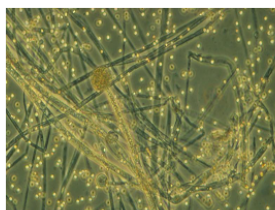
zawierają wagowo około 25-49% chityny (33,34). Procentową zawartość chityny u poszczególnych mięczaków przedstawiono na rysunku 5.



Rysunek 5. Zawartości procentowa chityny u mięczaków (27)

W roku 2021 oczekiwano, że globalny rynek chityny i chitozanu może osiągnąć wartość dochodzącą do 4,2 mld USD (35). Zwiększenie nacisku na poszukiwanie innych źródeł chityny, w celu zaspokojenia ogromnego zapotrzebowania rynku, wynika z ograniczenia dostępności do odpadów pochodzących z morza. Komercyjne połowy skorupiaków są sezonowe, rozpoczynają się wiosną, tuż po okresie godowym i są ograniczone normami połowowymi ustanawianych w danych regionach świata (36).

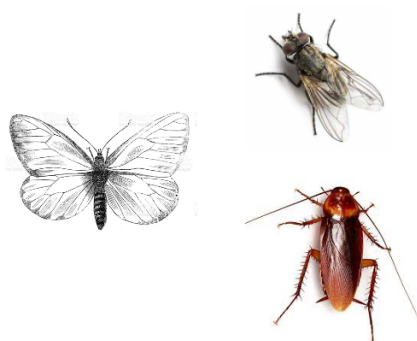
Kolejnym źródłem pozyskiwana chityny są grzyby. Stanowią one, według (Abdel i inni 2017) alternatywne źródło chityny i chitozanu (37). W strukturze ściany komórkowej grzybów, chityna stanowi od 1% do 15% masy całego grzyba (38). Jednak, nie wszystkie gatunki grzybów zawierają ten polimer w swojej strukturze. Największą ilość chityny w swojej budowie posiadają również grzyby: Basidiomycota, Ascomycota, i Zygomycota (39–41). Procentową zawartość chityny u poszczególnych gatunków grzybów przedstawiono na rysunku 6.



Grzyby	% chityny
Aspergillus Niger	42
<u>Mucor Rouxii</u>	44,5
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	2.9

Rysunek 6. Zawartości procentowa chityny w grzybach(27)

Następnym obiecującym i jednocześnie zrównoważonym źródłem pozyskania chityny są owady (42). Owady mogą być wykorzystywane dla większej równowagi ekologicznej i ekonomicznej jako ważna alternatywa dla skorupiaków. W przeciwieństwie do skorupiaków są łatwiej dostępne, nie podlegają sezonowemu odławianiu i można je w prosty sposób hodować. Szczególnie w krajach bez dostępu do morza oraz niskim spożyciu owoców morza uruchamiane są ośrodki hodowli owadów. Wykorzystuje się je również do produkcji pasz (białko) i utylizacji odpadów (plastik) (43–45). Procentową zawartość chityny u owadów przedstawiono na rysunku 7.

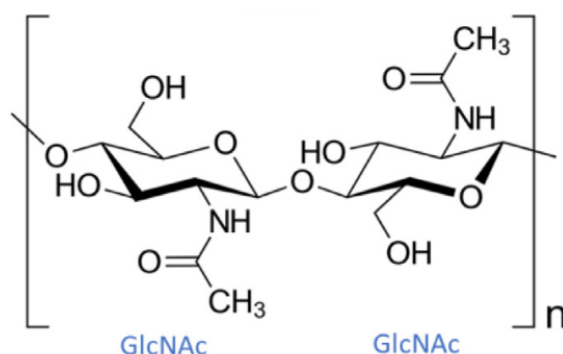


Owady	% chityny
Motyl (<u>Pieris</u>)	64
Muchówki	54,8
Karaczany	2 -18,4

Rysunek 7. Zawartości procentowa chityny u owadów(27)

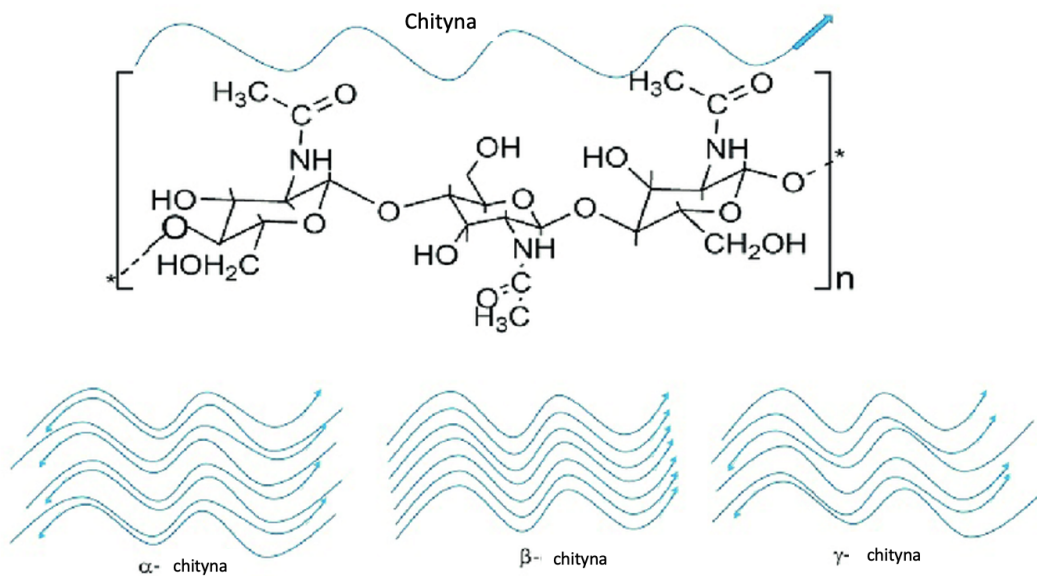
4.2. Budowa chemiczna chityny

Chityna ma postać liniowego polisacharydu składającego się głównie z reszt 2-acetamido-2-deoksy- β -D-glukopiranozy (GlcNAc) i częściowo z reszt 2-amino-2-deoksy- β -D-glukopiranozy (GlcN), połączonego wiązaniem β - (1 \rightarrow 4) glikozydowym (rysunek 8). Jednostki cukrowe w jej strukturze są obrócone względem siebie o 180°, a każda para tworzy disacharyd N,N'-diacetylochitobiozę. Zawiera helisy w łańcuchu polimerowym, gdzie poszczególne jednostki cukrowe jest odwrócona w stosunku do swoich sąsiadów. Powstała tak struktura, z uwagi na występujące w niej liczne wiązania wodorowe 03-H \rightarrow 05 i 06- H \rightarrow 07 ma wysoką stabilność chemiczną oraz termiczną (46–48).



Rysunek 8. Schemat łańcucha chityny (49)

Chityna w naturze występuje w elementach strukturalnych egzoszkieletów jako uporządkowana struktura mikrofibryli. W zależności od ułożenia łańcucha bocznego szkieletu przyjmuje jedną z trzech możliwych form krystalicznych, allomorficzne formy: α , β , γ (50,51). co przedstawiono na rysunku 9. Odmiany te, różnią się sposobem ułożenia łańcuchów w przestrzeniach krystalicznych. Wpływa to na stopień uwodnienia chityny (pęcznienie), wielkość komórek elementarnych tworzących sieci krystaliczne, ilość łańcuchów polimerowych zaangażowanych w tworzenie elementarnej komórki (52).



Rysunek 9. Formy alfa, beta i gama chityny (53)

W α -chitynie grupy boczne ułożone są w strukturze równoległe i silnie przylegają poprzez oddziaływania wiązań wodorowych. Struktura β -chityny jest antyrównoległa z mniejszą ilością wiązań wodorowych. Ułożenie γ -chityny jest natomiast mieszaniną formy α - i β -chityny (54–56). Chityna typu α posiada niską hydrofilowość co wiąże się z małą dostępnością do niej cząsteczek wody. Chityna typu β ze względu na rozluźnioną strukturę w porównaniu do struktury typu α , łatwiej pęcznieje w środowisku wodnym (57). β -chitynę można w prosty sposób przekształcić w α -chitynę poprzez obróbkę alkaliczną, a następnie wielokrotne płukanie w wodzie (58). Natomiast α -chityna odpowiada za sztywność polimeru w szkielecie, jest najbardziej stabilną i rozpowszechnioną formą w przyrodzie. Struktura α -chityny występuje w szkieletach owadów i grzybów(59,60). Największe jej pokłady występują w egzoszkielecie stawonogów, takich jak homary, kraby i krewetki, a także w ścianach komórkowych grzybów (61,62). β -chitynę pozyskuje się głównie z okrzemek morskich, kałamarnic (63–65). Z kolei γ -chityna pozyskiwana jest z włókien kokonu ćmy *Orgyia Dubia*, chrząszcza *Ptinus* i żołądków kałamarnic *Loligo*(66,67).

4.3. Ekstrakcja chityny

Chityna ze względu na jej wysoce wydłużoną półkrystaliczną strukturę z występującymi licznymi wiązaniami wodorowymi jest słabo rozpuszczalna w podstawowych rozpuszczalnikach organicznych. Stanowi to przeszkodę w jej przetwórstwie w formy użytkowe (68–70). Ekstrakcja chityny obejmuje następujące etapy: demineralizację (rozpuszczenie soli nieorganicznych), usunięcie białek (deproteinizacja) oraz usunięcie pigmentów. Procesy te, mają za zadanie głównie eliminację węglanu wapnia, białek i pigmentów zawartych w matrycy. Ekstrakcja chityny wymaga usunięcia dwóch podstawowych składników muszli - nieorganicznego węglanu wapnia (CaCO_3) i białek.

Procesy oczyszczania chityny można podzielić na: fizyczne, biotechnologiczne, chemiczne oraz łączone. Metody fizyczne to kruszenie i wprowadzanie równoległe katalizatorów reakcji deacetylacji jak i innych odczynników chemicznych np. denaturyzacji białek. Z uwagi na ochronę środowiska biotechnologiczna ekstrakcja i deacetylacja chityny zyskuje coraz większą popularność w stosunku do procesów z użyciem odczynników chemicznych. Wadą metod biotechnologicznych jednak jest niższa wydajność, większy nakład czasu i niska czystość produktu. Metody biotechnologiczne wykorzystują enzymy takie jak proteazy mikrobiologiczne, czy też całe mikroorganizmy do usunięcia białek. Natomiast równoległe zastosowanie deacetylazy w środowisku reakcji, w celu przeprowadzenia procesu deacetylacji chityny, wykazały brak możliwości bezpośredniego wytworzenia tą procedurą chitozanu (71–77).

Metoda z zastosowaniem odczynników chemicznych jest najbardziej powszechna w przemyśle przetwarzającym chitynę. Wadą tej metody jest kwestia uszkodzenia białka zawartego w muszlach i skorupach organizmów morskich. Tak pozyskany materiał białkowy nie może, być już wykorzystany jako dodatek do paszy dla zwierząt. Powstające przy procesie produkcyjnym ścieki wymagają dodatkowo poddania ich procesowi neutralizacji i oczyszczania (78–80). W ostatnich latach dopracowano i usprawniono chemicznie procesy technologiczne tak, że udaje się wytworzyć na skalę komercyjną produkt końcowy w postaci ultra czystej chityny, przeznaczonej dla przemysłu farmaceutycznego i medycznego (81).

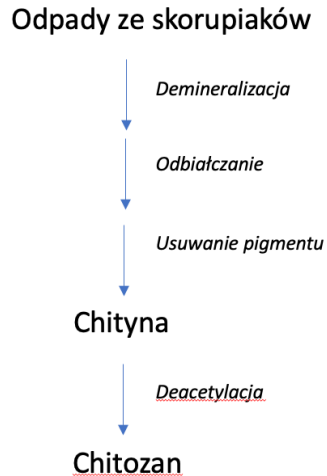
4.3.1. Demineralizacja

Demineralizacja najpopularniejszego źródła chityny - odpadów muszli skorupiaków na drodze chemicznej wykorzystuje kwasy organiczne i nieorganiczne w celu usunięcia składników mineralnych przede wszystkim węglanu wapnia i fosforanu wapnia. Preferowanymi odczynnikami do usuwania wyżej wymienionych składników mineralnych są HCl, HNO₃, H₂SO₄, CH₃COOH i HCOOH (82,83). Po procesie demineralizacji materiał poddany jest filtracji, neutralizowany wodą destylowaną a następnie suszony.

4.3.2. Odbiałczanie

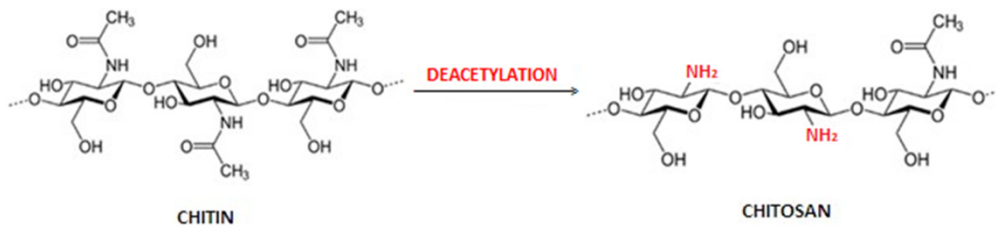
W procesach odbiałczania (deproteinizacji) stosuje się najczęściej rozcieńczony roztwór wodorotlenku sodu NaOH (1mol/dm³) w celu denaturyzacji białek. Tak otrzymaną mieszaninę, dwukrotnie przesącza się, przemywa wodą dejonizowaną w celu usunięcia nadmiaru NaOH, po czym poddaje się ją procesowi suszenia w suszarce. Produktem otrzymanym w tak przeprowadzonym procesie jest oczyszczona od minerałów i białek chityna zawierająca pigmenty (84).

Podczas procesu demineralizacji oraz deproteinizacji usuwana jest niewielka ilość pigmentu i lipidów, dlatego też najczęściej chityna zachowuje kolor w odcieniu brązowym. Do celów komercyjnych przyjęto, że kolor chityny i chitozanu powinien być w kolorze białym. W celu usunięcia pozostałości pigmentów i poprawy koloru chityny i chitozanu stosuje się dodatkowy etap bielenia. Do usunięcia pigmentu najczęściej wykorzystywane są utleniacze, do których należy między innymi nadmanganian potasu (KMnO₄), nadtlenek wodoru (H₂O₂), podchloryn sodu (NaClO), pięciotlenek fosforu (P₂O₅), dwutlenek siarki (IV) (SO₂) i węglan sodu (Na₂CO₃). Często stosowane są również rozpuszczalniki takie jak aceton, chloroform, octan etylu i etanol (85,86). Na rysunku 10 przedstawiono metodę oczyszczania chityny.



Rysunek 10. Proces przetwarzania chityny (86)

Ostatnim procesem przetwarzania chityny prowadzącej do konwersji w chitozan jest alkaliczna hydroliza (deacetylacja).



Rysunek 11. Schemat konwersji chityny do chitozanu (87)

Chitozan należy do grupy polisacharydów i jest szczególnym biopolimerem ze względu na jego zdolność do tworzenia różnorodnych struktur morfologicznych, takich jak błony, włókna, hydrożele, membrany, nanocząstki i mikrosfery.

4.3.3. Deacetylacja chityny (synteza chitozanu)

Chitozan otrzymuje się na drodze reakcji deacetylacji (DDA) chityny. Chityna może być przekształcana w chitozan w procesach chemicznych, biologicznych lub enzymatycznych(72,88). Procesy te prowadzą do hydrolizy grup acetylamidowych $\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3$ z wytworzeniem funkcyjnych grup aminowych $-\text{NH}_2$. Z chemicznego punktu widzenia, chitozan można zdefiniować jako deacetylowaną chitynę, a proces deacetylacji chityny polega na alkalicznej hydrolizie grup amidowych w łańcuchu poli[-(1,4)-2-acetamido-2-deoksy-D-glukopiranozy] i usunięciu grup acetylowych z grup acetyloaminowych w łańcuchu chityny, które są przekształcane w grupy aminowe. W wyniku procesu deacetylacji końcowy polimer zawiera dwie reszty: N-acetylo-glukozaminy oraz glukozaminy. Wartość stopnia acetylacji (DA) chityny determinuje czy otrzymany polimer można określić chitozanem czy chityną. W literaturze przyjęto, że jeżeli w wyniku deacetylacji polimer zawiera więcej niż 50% reszt N-acetylo-glukozaminy, jest on w dalszym ciągu chityną, natomiast jeśli jest niższy niż 50%, to jest określany jako chitozan (88). Otrzymany chitozan ma wysoki stopień wolnych grup aminowych (NH_2), które zapewniają centrum funkcyjne zdolne do dalszych reakcji chemicznych. Autorzy (Rehman i inni) opisują możliwość wykorzystania reaktywnych grup aminowych chitozanu do przeprowadzenia modyfikacji chemicznych prowadzących do uzyskania nowych pochodnych o szerokim spektrum zastosowania (89). W literaturze naukowej wskazane jest, że stopień deacetylacji chityny jest powiązany z jej właściwościami biologicznymi, fizykochemicznymi oraz mechanicznymi. Deacetylacja wpływa na charakter kwasowo-zasadowy, właściwości elektrostatyczne, biodegradowalność, zdolność do agregacji, rozpuszczalność, właściwości sorpcyjne, zdolność do chelatowania jonów metali (90). Następczy proces deacetylacji pozwala pozyskać chitozan o wyższym stopniu deacetylacji. W procesach pozyskiwania chitozanu z chityny najczęściej stosowana jest alkaliczna hydroliza z zastosowaniem wysoko stężonych roztworów NaOH lub KOH (40-50%) oraz wysokiej temperatury (100-140 °C) (91–94).

4.4. Wpływ stopnia deacetylacji chitozanu i masy molowej na jego właściwości

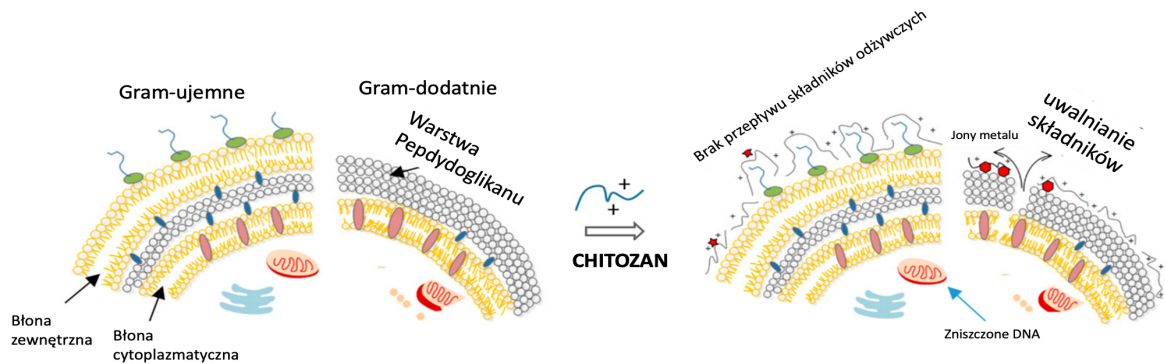
Właściwości chitozanu zależne są zarówno od stopnia rozkładu mas molowych to jest od stosunku średnio wagowej masy molowej (M_w) i średnio liczbowej masy molowej (M_n) chitozanu (polidispersyjność) jak i również jego stopnia deacetylacji (DDA). Są to najważniejsze parametry wpływające na właściwości biologiczne, fizykochemiczne i mechaniczne form chitozanu, co ma wpływ i przekłada się na jego bezpośrednie zastosowanie. DDA wpływa na rozpuszczalność, reaktywność, właściwości kwasowo-zasadowe, elektrostatyczne, elastyczność, konformację polimeru, lepkość, krystaliczność, porowatość, wytrzymałość na rozciąganie, zdolność do chelatowania metali i fotoluminescencję. Właściwości te zależne są również od wyznaczonej średnio wagowej masy molowej (M_w) polimeru. Wymienione parametry wpływają, też na właściwości biologiczne, takie jak: resorbowalność, biokompatybilność, mukoadhezję, hemostatyczność, adsorpcję, właściwości przeciwdrobnoustrojowe, przeciwutleniające i wiele innych (95).

Masa molowa chitozanu ze względu na występowanie w cząsteczce grup aminowych ma również wpływ na jego rozpuszczalność. Chitozan o masie poniżej 30 kDa jest łatwo rozpuszczalny w wodzie bez dodatku kwasu. Natomiast hydroliza kwasowa prowadzi do zmniejszenia średniej masy molowej chitozanu, jednocześnie zwiększając jego rozpuszczalność. Protonowanie grup aminowych jest warunkiem wstępnym do rozpuszczenia chitozanu w wodzie. Im wyższa masa molowa, tym polimer ten ma tendencję do zwiększania udziału międzycząsteczkowych i wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych pomiędzy łańcuchami cukrowymi co prowadzi to do zmniejszenia jego rozpuszczalności w roztworach wodnych. Dlatego chitozan o udziale masy molowej niższej niż 2×10^3 kDa znajduje zastosowanie do produkcji materiałów tekstylnych, medycznych oraz spożywczych (96–100).

5. Przeciwdrobnoustrojowe działanie chitozanu i chityny

W literaturze naukowej przedstawione są informacje, że chitozan charakteryzuje się aktywnością przeciwdrobnoustrojową wobec szerokiego zakresu mikroorganizmów: bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, grzybów i drożdży (101,102).

Właściwości przeciwdrobnoustrojowe chitozanu można zmienić poprzez chemiczną modyfikację jego struktury. Dwie reaktywne grupy występujące w cząsteczce chitozanu - NH_2 i -OH oferują szerokie możliwości modyfikacji chemicznej. Grupy te umożliwiają tworzenie kilku funkcjonalnych pochodnych np. przez reakcje takie jak sulfonowanie, aminowanie i karboksymetylowanie (103–105). Hydrofilowe, dodatnio naładowane grupy (NH_3^+) uzyskane za pomocą oddziaływania z cząsteczkami kwasu, wywołują śmierć komórek bakteryjnych poprzez interakcję i penetrację grup amoniowych przez błonę cytoplazmatyczną bakterii (106). Czwartorzędowanie poprawia gęstość ładunku dodatniego chitozanu, a także wpływa na jego skuteczność przeciwdrobnoustrojową w wyniku wzmocnienia jego polikationowego charakteru (107). Stopień N-acetylacji chityny i chitozanu jest ważnym parametrem określającym ich właściwości fizykochemiczne. Modyfikacja chitozanu jest związana ze stopniem acetylacji, który z kolei jest związany z liczbą grup N-acetyloaminowych w cząsteczkach (108). Dodatkowym czynnikiem może być też metoda pozyskania chitozanu, gdzie w zależności od zastosowania określonej metody: enzymatycznej lub chemicznej, ma ona wpływ na jego charakter związany z bakteriobójczością (109).



Rysunek 12. Schemt mechanizmu działania chitozanu na bakterie Gram-dodatnie oraz Gram-ujemnie (110)

5.1. Działanie biobójcze chitozanu względem bakterii poprzez zakłócenie funkcjonowania błony oraz ściany komórkowej

Bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne mają ściany o zróżnicowanej strukturze. Ściana komórkowa bakterii Gram-dodatnich składa się głównie z grubej warstwy peptydoglikanu zawierającej kwasy teichojowe, które nadają ujemny ładunek powierzchni bakterii, podczas gdy ściana komórkowa bakterii Gram-ujemnych jest silnie naładowana ujemnie z powodu lipopolisacharydów zawartych w zewnętrznej warstwie błony. Bakterie Gram-dodatnie mają więcej peptydoglikanów, podczas gdy bakterie Gram-ujemne są bogatsze w lipopolisacharydy. Różnice w budowie ścian komórkowych bakterii mogą wpływać dodatkowo na ich przyleganie do powierzchni materiałów o właściwościach biobójczych (111,112).

Przeciwdrobnoustrojowe działanie chitozanu polega głównie na oddziaływaniach elektrostatycznych między grupami kationowymi chitozanu, a ujemnie naładowanymi ścianami komórkowymi bakterii. Obecność dodatnio naładowanej grupy amoniowej, która oddziałuje z ujemnie naładowaną błoną bakterii, zależy od stężenia wolnych grup reaktywnych znajdujących się na chitozanie $-NH_3^+$. Grupy $-NH_3^+$ zmieniają morfologię powierzchni bakterii, co skutkuje zwiększoną przepuszczalnością błony i utratą substancji wewnątrzkomórkowych (113–115).

5.2. Wpływ stopnia deacetylacji na działanie biobójcze względem bakterii

W zależności od źródła pochodzenia jak i stopnia acetylacji, chitozan w różny sposób oddziałuje na mikroorganizmy (116,117). Chitozan jest polisacharydem złożonym z jednostek glukozaminy i acetyloglukozaminy, które nadają mu unikalne właściwości fizykochemiczne. Ilość reszt glukozaminowych w chitozanie jest zależna od stopnia deacetylacji chityny, co przekłada się na wyższą gęstość ładunku dodatniego prowadząc do silnych oddziaływań elektrostatycznych między bakterią a polimerem. Chitozan może występować w postaci różnych soli amoniowych, które wpływają na gęstość ładunku dodatniego występującego w molekuale. Literatura potwierdza istotne znaczenie struktury polikationowej w aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Chitozan o wysokim stopniu deacetylowania dochodzącym do 97,5% posiada dużo większą gęstość ładunku dodatniego, co nadaje mu silniejsze działanie przeciwbakteryjne niż chitozan o stopniu deacetylowania wynoszącym 83,7%, zawierający mniej podstawionych grup funkcyjnych (118). Badania wykazały, że wyższy stopień deacetylowania z większym ładunkiem dodatnim był skuteczniejszy w hamowaniu wzrostu bakterii *S. aureus*. Wyniki zaprezentowane przez inne zespoły badawcze także prowadzą do wniosku, że aktywność przeciwbakteryjna chitozanu wobec bakterii *S. aureus* zwiększała się wraz ze wzrostem stopnia deacetylacji chitozanu (119).

5.3. Wpływ parametrów pKa i pH kwasu użytego do rozpuszczenia chitozanu na jego działanie przeciw bakteryjne

Chitozan w środowisku kwasowym posiada zdolność do uzyskania dużej liczby wolnych grup jonowych NH_3^+ , co ma wpływ na jego aktywność przeciwdrobnoustrojową. Chitozan jest rozpuszczalny w środowisku wodnym o odczynie kwaśnym a na jego właściwości wpływa rodzaj kwasu (pKa, pH) użytego do sporządzenia roztworu.

Cząsteczka chitozanu staje się polikationowa w środowisku o pH 6-6,5 która jest niższa niż pKa polimeru (115). Chitozan wykazuje silniejsze hamujące działanie na wzrost bakterii w mediach o niższych pH a aktywność hamująca słabnie wraz ze wzrostem pH roztworu. Brak utrzymania działania bakteriobójczego form chitozanu uzyskanych

z roztworów o pH 7 jest prawdopodobnie spowodowany jest obecnością większej ilości niejonizowanych grup aminowych oraz słabą rozpuszczalnością chitozanu (120).

W badaniach Takahashiego (119) wykazano, że bakteriobójcze działanie chitozanu przeciwko bakteriom Gram-dodatnim i Gram-ujemnym wzrosło przy zastosowaniu rozpuszczalników o niskim pH (121), jednocześnie aktywność przeciwbakteryjna chitozanu przeciwko patogenom *S. aureus*, *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, była wyższa przy zastosowaniu rozpuszczalnika o pH 5,5 w porównaniu z roztworem o pH 6,5 (122).

5.4. Chelatowanie metali przez struktury chitozanowe

Chitozan posiada wysoką zdolność chelatowania różnych jonów metali (w tym Ni²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺ i Cu²⁺) (123). Cząsteczki chitozanu w otoczeniu bakterii mogą kompleksować metale poprzez chelatowanie i blokować przepływ niektórych niezbędnych składników odżywczych, powodując obumieranie komórki. Szybkość kompleksowania jonów metali zależy od ich stężenia w środowisku (124). Budowa chemiczna chitozanu daje możliwości nie tylko do chelatowania, ale również do immobilizacji enzymów (125). Proces ten zachodzi najszybciej przy wysokim pH środowiska, w którym jony dodatnie metalu oddziałują z wolną parą elektronów na atomie azotu grupy -NH₂ -

W układzie chitozan-metal, widać zależność ilości dostępnych miejsc oddziaływania grupy NH₂ z jonem metalu od pH środowiska. Dla pH < 6 kompleksowaniu ulega tylko jedna grupa -NH₂ i trzy hydroksylowe, przy pH w zakresie 6-7 w tworzeniu kompleksów biorą udział tylko dwie grupy -NH₂. Dla wyższych wartości pH, takich jak 7-9, następuje deprotonacja grup hydroksylowych w wyniku czego w kompleksowaniu jonu metalu biorą udział dwie grupy -NH₂ i dwie zdysocjowane grupy hydroksylowe. Metal pełni funkcję akceptora elektronów połączony z jednym lub kilkoma łańcuchami chitozanu poprzez grupy -NH₂ tworząc mostki wodorowe dla grup hydroksylowych (126,127).

5.5. Wpływ masy cząsteczkowej chitozanu na właściwości biobójcze

W literaturze naukowej podawane są informacje o aktywności bakteriobójczej chitozanu zależnej od wielkości jego makrocząsteczki. Potencjalne działanie przeciwdrobnoustrojowe chitozanu wynika z jego właściwości blokowania wchłaniania składników odżywczych przez komórkę bakterii poprzez zmianę przepuszczalności błony komórkowej (128). Chitozan o wysokiej masie cząsteczkowej nie ma możliwości przeniknąć przez ścianę i błonę komórkową bakterii. Osadza się na powierzchni bakterii i tworzy nieprzepuszczalną warstwę. Komórki, poddane działaniu chitozanu o wysokiej masie cząsteczkowej wykazywały zmiany struktury zewnętrznej. Powierzchnia tych komórek pokryła się licznymi strukturami pęcherzykowatymi oraz dodatkową warstwą polimeru. Nastąpiło widoczne zwiększenie grubości warstwy zewnętrznej komórki poprzez zaadsorbowany polimer (129). Pogrubiona otoczka komórkowa blokuje transport składników odżywczych do wnętrza komórki, a także uniemożliwia wydalanie metabolitów przez komórki. Natomiast oligomery chitozanu spełniają ważną rolę w blokowaniu transportu składników odżywczych do wnętrza komórki, powodując lizę komórek i hamowanie jej wzrostu (130). Chitozan o niskiej masie cząsteczkowej wykazuje zarówno zewnątrzkomórkową, jak i wewnątrzkomórkową aktywność przeciwdrobnoustrojową (120,131–134). Masa cząsteczkowa chitozanu wpływa na jego zdolność do rozpuszczania w wodzie i roztworach kwasów. Wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej chitozanu maleje jego zdolność do rozpuszczania w wodzie przy zachowaniu rozpuszczalności w wodnych roztworach kwasów (135).

Podsumowując działanie przeciwdrobnoustrojowe chitozanu związane jest z występowaniem pewnych cech fizykochemicznych. Makrocząsteczki chitozanu muszą mieć wysoki potencjał ładunku jonowego, aby przenikać przez błonę komórkową. Ma to związek z ich stopniem deacetylacji, masą molową oraz środowiskiem wodnym w jakim znajduje się chitozan (pH). Ważnym czynnikiem jest również, pochodzenie chitozanu jak i rodzaj obróbki, której został poddany podczas procesu deacetylacji. Protonowanie grup aminowych w chitozanie ma istotny wpływ na możliwość uzyskania lipofilowo-hydrofilowych właściwości chitozanu (część polarna składa się z grup $-NH_3^+$ i OH^- , a także hydrofilowej części głównego łańcucha biopolimeru). Niska gęstość ładunku przy

neutralnym i zasadowym pH prowadzi do niskiej rozpuszczalności, agregacji i niskiej stabilności chitozanu (136–146).

6. Ciprofloksacyna jako substancja wspomagająca działanie przeciwbakteryjne chitozanu

Ciprofloksacyna jest antybiotykiem fluorochinolonowym, który działa w szerokim spektrum bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Hamuje aktywność gyrazy DNA i topoizomerazy IV, co skutkuje degradacją chromosomalnego DNA i zmniejszeniem ekspresji genów(147). Może być stosowana jako dodatek do materiałów opatrunkowych otrzymywanych metodą elektroprzędzenia (148).

Aktywność przeciwdrobnoustrojową chitozanu, jak również jego pochodnych, może być zwiększana poprzez addycję innych związków, w tym aktywnych substancji farmaceutycznych. Jednym z takich związków jest ciprofloksacyna, która dzięki grupie karboksylowej zawartej w jej strukturze, może być sprzężana z pierwszorzędową grupą aminową chitozanu $-NH_2$. Konwencjonalna metoda addycji ciprofloksacyny do chitozanu poprzez proces karbodiimidowania jest stosowana do tworzenia wiązań amidowych poprzez koniugację grupy karboksylowej ciprofloksacyny i pierwszorzędowej grupy aminowej chitozanu (149).

Arauzo wraz z zespołem, uzyskał w badaniach nanowłókna chitozanu zawierające ciprofloksacynę, które zostały wytworzone metodą elektroprzędzenia. Cui i inni przedstawił nanowłókniste membrany otoczone ciprofloksacyną wytworzone metodą elektrorozpylania z wykorzystaniem włókien o strukturze rdzeń-powłoka (150,151). Kolejny badacz, Pignatello, opracował metodę wytwarzania mikrocząstek z wykorzystaniem metody iniekcji strzykawką z roztworu chitozanu do układu koagulacyjnego złożonego z fazy wodnej, składającej się z wody i Tween 80 oraz oddzielnej fazy organicznej, składającej się z Softisan S100, trimetyloaminy, bromku didecyldimetyloamoniowego i chlorowodoru ciprofloksacyny w acetonie (147). Znane są również prace których autorzy wykorzystywali hydrożele do wydzielania ciprofloksacyny a także polimerowe układy kompozytowe (152–156).

7. Zastosowanie chityny i chitozanu

Właściwości chityny i chitozanu takie jak wysoka biokompatybilność, biodegradowalność, działanie przeciwbakteryjne i przeciwnowotworowe umożliwiają zastosowanie ich jako naturalne polimery funkcjonalne (157–161). Atrybutem tych polimerów jest możliwość przekształcania ich we włókna (162,163), błony (164–166), hydrożele (167–169) jak i mikrokapsuły (170–172). Dzięki takim możliwościom formownia oraz sposobom ich licznej modyfikacji znajdują one zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym i medycynie (173–175). W przypadku zastosowania ich jako nośniki leków istotne jest dość szybkie zdeintegrowanie ich tuż po dostarczeniu do organizmu. Nie może on być cytotoksyczny oraz kumulować się w organizmie. Wykazano, że pochodne chityny, takie jak N-sukcynylo-chitozan, karboksymetylochityna, hydrożel chitozanowy i hydroksyetylochityna wykazują takie właściwości (176–179).

Chitozan zwiększa efekt w procesie epitelizacji ran (180–182), sprzyja odbudowie tkanek kostnych (183–186) i jest również wykorzystywany w inżynierii tkankowej (187–189). Dodatek nanorurek węglowych do rusztowania wykonanego z chitozanu wykazał poprawę przepływu sygnału między synapsami. Tak wykonane rusztowania mogą być wykorzystane jako narzędzie do stymulacji i naprawy neuronów (190). Jako materiał wzmacniający rusztowania w inżynierii tkankowej, stosuje się nanofibryle chitazanowe (191,192).

Bioaktywne materiały opatrunkowe oparte na osnowie chitoznowej przeznaczone są do gojenia ran i oparzeń (192). Wykorzystywane są również jako pestycydy w uprawach do ochrony roślin (193,194) oraz substancje konserwujące żywność (195,196). Znajdują zastosowanie jako przeciwutleniacze w szeroko pojętym przyśle spożywczym jak i kosmetycznym (197–199). Produkowane są z nich zarówno opakowania dla wyborów medycznych jak i żywności (200–202). Chityna i chitozan używane są w adsorpcji metali ciężkich w oczyszczalniach ścieków (203,204).

8. Chitozan i chityna jako prekursorzy hemostazy i gojenia się ran

Hemostaza jest ogółem mechanizmów, które przeciwdziałają wypływowi krwi z naczyń i jest ważnym etapem gojenia ran. Podstawowym elementem w procesie krzepnięcia są płytki krwi. Chityna i chitozan z uwagi na zawarte w nich grupy aminowe mogą służyć do utrzymania hemostazy poprzez wzmocnienie efektu agregacji płytek krwi (205)–(206). Skuteczność chityny i chitozanu wynika również z ich właściwości oddziaływania na płytki krwi poprzez uwalnianie ich płytkowego czynnika wzrostu-AB (PDGF-AB) i transformującego czynnika wzrostu-b1 (TGF-b1) (207).

Wpływ na właściwości hemostatyczne chitozanu ma również jego masa cząsteczkowa i stopień deacetylacji. Wyższy poziom deacetylacji cząsteczek chitozanu poprawia agregację erytrocytów i płytek krwi, co stanowi istotę w inicjowaniu hemostazy (208). Z uwagi na występowanie fosfatydylocholiny, fosfatydyloetanolaminy i grup kwasu sialowego, erytrocyty oraz płytki krwi zawierają na powierzchni ujemny ładunek. Utrudnia to proces ich agregacji poprzez odpychanie elektrostatyczne. Zastosowanie chitozanu pozwala na agregację erytrocytów poprzez ich oddziaływanie na powierzchnię krwinek czerwonych (209).

Jednym z rozwiązań wykorzystywanym jako środek ułatwiający gojenie ran, jest folia kompozytowa zawierająca nanowłókna z chitozanu i chityny o zwiększonej wytrzymałości na rozciąganie i dobrej elastyczności (210). Zaprojektowano również asymetryczną membranę chitozanową łączącą możliwość ochrony skóry wraz z aktywnością przeciw osadzeniu się na niej bakterii. Zapobiega ona również nadmiernemu parowaniu wody ze skóry (211,212). Wykazano, że opatrunek tekstylny zastosowany na poparzonej skórze w postaci soli octanu chitozanu ma wysoką aktywność przeciwbakteryjną dla *Pseudomonasa aeruginosa* (213). Ze względu na biokompatybilność, czas degradacji oraz działanie antibakteryjne, opatrunki na bazie chitozanu są stosowane w leczeniu trudno gojących się ran (214).

III. CEL I ZAKRES PRACY

Chitozan jest drugim naturalnym polimerem występującym w środowisku naturalnym po celulozie. Dzięki swoim właściwościom fizykochemicznym i aktywności biologicznej cieszy się dużym zainteresowaniem wśród badaczy. Jest polimerem biodegradowalnym, bioaktywnym, nietoksycznym, bakteriostatycznym, biozgodnym. Dysponuje zdolnościami włóknotwórczymi i tworzenia membran. Znajduje szerokie zastosowanie w medycynie, przemyśle farmaceutycznym, kosmetologii, rolnictwie, weterynarii jak i również szeroko pojętej ochronie środowiska.

W związku z analizowanymi doniesieniami literaturowymi postawiono następującą hipotezę badawczą.

Zakłada się, iż istnieje możliwość modyfikacji powierzchni różnych form chitozanu, za pomocą wytypowanych kwasów przy zachowaniu niezmienionej struktury fizycznej ukierunkowanej na zwiększenie właściwości bakteriostatycznych.

W celu potwierdzenia założonej hipotezy badawczej zaplanowano i przeprowadzono szereg eksperymentów. Z tak przedstawioną hipotezą badawczą sprecyzowano cel rozprawy naukowej, którym jest wykazanie skuteczności metod modyfikacji chemicznych włókien oraz folii chitozanowych jak i określenie wpływu wytypowanych modyfikacji na działanie przeciwdrobnoustrojowe opracowanych materiałów.

Dodatkowo w niniejszej pracy podjęto próbę analizy sposobu i formy przyłączenia ciprofloksacyny do powierzchni folii wykonanej z chitozanu.

Cele szczegółowe badań:

- Wytworzenie form strukturalnych chitozanu (włóknina, folia jako układ modelowy do badań zmian powierzchni).
- Modyfikacje form chitozanu poprzez osadzanie par kwasów na włókninie w celu nadania im właściwości przeciwbakteryjnym i dodatkowo przeciwgrzybiczym.
- Modyfikacje warstw powierzchniowych folii chitozanowej poprzez przyłączenie adduktu ciprofloksacyny jako czynnika o działaniu przeciwdrobnoustrojowym.
- Potwierdzenie struktury i sposobu przyłączenia się ciprofloksacyny do powierzchni materiału chitozanowego.

W pierwszym etapie pracy wytworzono włókniyny oraz folie chitozanowe. Włókniyny otrzymano techniką zgrzeblarkową. Folię wykonano metodą odlewania z roztworu. Określono, który z użytych roztworów kwasów jest najdogodniejszym rozpuszczalnikiem do formowania folii chitozanowej.

W drugim etapie zmodyfikowano włókninę chitozanową poprzez chemiczny proces kondycjonowania układu w oparach różnych kwasów organicznych i nieorganicznych.

W kolejnym etapie pracy poddano modyfikacji modelowy układ powierzchni w postaci folii chitozanu przy - ciprofloksacyny.

Następnie zastosowano dodatkowy proces, kondycjonowania uzyskanych układów w nasyconych parach kwasu organicznego celem zwiększenia efektu bakteriostatycznego i zwiększenia efektu antybakteryjności w procesie przekształcenia wolnych grup aminowych do grup amoniowych soli chitozanu.

Dodatkowo określono metodą ^{19}F MAS NMR w jakiej postaci krystalicznej na powierzchni chitozanu przyłącza się lek ciprofloksacyna.

Metody wytwarzania materiałów chitoznowych oraz metody badawcze zastosowane w pracy:

- Metoda zgrzeblenia do wytworzenia struktury włóknistej przy pomocy maszyny włókienniczej BEFAMA.
- Metoda odlewania z roztworu polimeru w celu otrzymania folii chitozanowej.
- Dokonano charakterystyki powierzchni przy pomocy: skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM), mikroskopii sił atomowych (AFM).
- Dokonano potwierdzenia modyfikacji chemicznej chitozanu za pomocą: spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C CP/MAS}$, $^{19}\text{F MAS NMR}$), spektroskopii fourierowskiej w podczerwieni z całkowitym odbiciem promieniowania podczerwonego (FTIR ATR).
- Dokonano sprawdzenia sorpcji ciprofloksacyny na powierzchni form chitozanu za pomocą chromatografii cieczowej (RP-HPLC).
- Dokonano Pomiaru degradacji roztworów chitozanu przy użyciu wiskozymetru Ubbelohdea oraz chromatografii żelowej (GPC/SEC).
- Dokonano oznaczenia działania przeciwdrobnoustrojowego wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych metodami mikrobiologicznymi.
- Przeprowadzono ocenę aktywności cytotoksycznej materiału badawczego za pomocą testu na % hemolizy przy użyciu ludzkich czerwonych krwinek.

IV. CZĘŚĆ EKSPERYMETALNA

4. Materiały i metody badawcze

4.1. Materiały

Do badań kinetyki degradacji chitozanu wykorzystano:

- chitozan produkt handlowy Primex-ChitoClear HGQ 110 Iceland o stopniu deacetylacji 95% (dane producenta) i masie molowej 200 kDa.

Wykorzystano kwasy organiczne:

- kwas octowy ($pK_a = 4,76$), kwas jabłkowy ($pK_a = 3,51; 5,03$), kwas mrówkowy ($pK_a = 3,75$), które były produktem handlowym POCH Gliwice, Polska,
- kwas mlekowy 80% ($pK_a = 3,86$) był produktem handlowym CHEMPUR, Polska.

Wszystkie kwasy były odczynnikami czystymi do analizy i posiadały 99,9–99,99% substancji w swoim składzie.

Do przygotowania rozcieńczonych roztworów kwasów organicznych użyto wody destylowanej.

Materiał użyty do wytworzenia włókniny chitozanowej:

- włókna chitozanowe klasy medycznej, produkt handlowym firmy Hismer Biotechnology Co. Ltd, Chiny. Stopień deacetylacji użytego polimeru wynosił 91,8. Zastosowano włókna 2,02 dtex x 30 mm o wytrzymałości 12cN/tex i wydłużeniu względnym 1,5%.

Materiały wykorzystane do otrzymania filmów chitozanowych:

- Chitozan (CS1), który był produktem handlowym Pol-Aura, Polska, masa cząsteczkowa 890 kDa;
- Chitozan (CS2), który był produktem handlowym Pol-Aura, Polska, masa cząsteczkowa 30 kDa;
- Chitozan (CS3), który był produktem handlowym Qingdao Chibo Biotech, Chiny, masa cząsteczkowa 150 kDa;
- Chitozan (CS4), który był produktem handlowym Qingdao Chibo Biotech, Chiny, masa cząsteczkowa 325 kDa,
- Chitozan (CS5), który był produktem handlowym Qingdao Chibo Biotech, Chiny, masa cząsteczkowa 84 kDa;
- Chitozan (CS6), który był produktem handlowym Qingdao Chibo Biotech, Chiny, masa cząsteczkowa 60 kDa.
- Wodorotlenek sodu (granulki), PURE P.A., który był produktem handlowym POOCH Polskie Odczynniki Chemiczne, Gliwice, Polska
- kwas octowy ($pK_a = 4,76$), PURE P.A., który był produktem POCH Polskie Odczynniki Chemiczne, Gliwice, Polska,

Modyfikacji włókien chitozanowych dokonano za pomocą kwasów organicznych i kwasu solnego:

- kwas octowy (99,5%-99,9% PURE P.A.),
- kwas mrówkowy (98-100% PURE P.A.),
- kwas propionowy (99,5% PURE P.A.),
- kwas masłowy (99% Thermo Scientific)
- kwas walerianowy (99%, Thermo Scientific)
- kwas solny (35-38% PURE P.A.),
- alkohol etylowy (99,8% CZDA)

Podstawowymi materiałami w modyfikacji folii chitozanowej były:

- ciprofloksacyna (CIP) o numerze AC58172, produkt handlowy firmy Biosynth Ltd, Wielka Brytania
- wodorotlenek sodu, PURE P.A., produkt handlowy firmy POCH Polskie Odczynniki Chemiczne, Polska
- kwas octowy (pKa = 4,76), PURE P.A., produkt handlowy firmy POCH Polskie Odczynniki Chemiczne, Gliwice, Polska,

4.2. Aparatura

W badaniach doświadczeniach wykorzystano następujący sprzęt:

- Spektrometr FTIR, Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA)
- Spektrometr Bruker AM 400 (Bruker, Germany)
- Spektrometr Bruker Avance III 400 MHz (Bruker, Germany)
- Spektrometr Bruker Avance III 600 MHz, (Bruker, Germany)
- Mikroskop AFM Multimode 8 firmy Bruker (Bruker Nano Surfaces Division, USA)
- Wiskozymetr SI Analytics GmbH, nr kapilary 532.11/1a (Mainz, Germany)
- Chromatograf żelowy system Agilent Technologies GPC / SEC z pompą 1260 ISO i autosamplerem 1260 ALS wyposażony w detektor refraktometryczny Optilab T-rEX (Wyatt Technology, USA)
- Chromatograf cieczowy RP-HPLC, Waters e2695 Separations Module, detektor Waters 2998 PDA
- Skaningowy mikroskop elektronowy Nova NanoSem 200 (FEI, Eindhoven, Holandia) wyposażonego w spektrometr dyspersji energii EDS (EDAX, Tilburg, Holandia) z detektorem LVD wraz układem napyłania Leica EM ACE 600
- Zestaw włókninowy wyposażony w zgrzeblarkę wałkową BEFAMA, laboratoryjną, z obiciem elastycznym wyposażoną w układacz poziomy ASSELIN do formowania włóknin o poprzecznym ułożeniu włókien; igłowarka BEFAMA, jednopłytkowa, z górną płytą igłującą

4.3. Wytwarzanie materiałów chitozanowych

4.3.1. Badania degradacji chitozanu w wodnych roztworach kwasów

Procedura przygotowania roztworów chitozanu do kinetyki degradacji w roztworach kwasów organicznych była następująca: 194g wody destylowanej, 6g danego kwasu organicznego i 10g chitozanu umieszczono w kolbie stożkowej. Przygotowane roztwory mieszano przez 24 godziny za pomocą mieszadła magnetycznego w temperaturze pokojowej, a następnie próbki przechowywano w komorze o kontrolowanej temperaturze równej 20°C.

Po upływie założonego w eksperymencie czasu degradacji, z próbki poddanej degradacji pobrano część roztworu i umieszczono w temperaturze - 18 °C w celu zatrzymania dalszego procesu degradacji. Następnie próbki poddano procesowi liofilizacji w celu usunięcia rozpuszczalnika. Otrzymane porowate struktury soli chitozanu i określonego kwasu rozpuszczono w wodzie. Tak przygotowane roztwory stanowiły próbki do dalszych badań.

4.3.2. Wytwarzanie włókien chitozanowych metodą zgrzeblenia

Proces wytworzenia włókien chitozanowych przeprowadzono wykorzystując zespół zgrzeblarek wałkowych. Za pomocą metody zgrzeblenia. Podstawową czynnością było utworzenie włóknistego runa w postaci zagęszczonego układu włókien. Zasadniczy proces tworzenia składał się ze zgrzeblenia włókien i formowania.

Następnie wytworzoną strukturę włókniny z biodegradowalnych włókien chitozanowych igłowano. Produkt końcowy uzyskany z włókien elementarnych miał masę powierzchniową 120 g/m².

Tabela 1. Parametry zgrzeblenia.

Parametry zgrzeblenia	
Zasilanie całkowite	30 g / na pole szczeblaka zasilającego
Parametry igłowania	odbiór 150 Hz, 1,5 cm (nastaw wałka odbierającego)
Rodzaj igieł	15x18x40x3 ½ RB
Głębokość igłowania, mm	12
Gęstość uiglenia	9,5
Liczba przeigłowań, cm ⁻²	30
Krotność przeigłowań	1

4.3.3. Wytwarzanie folii chitozanowych

Procedura wytwarzania folii chitozanowych obejmowała przygotowanie roztworów chitozanu z: 194 g wody destylowanej, 6 g kwasu organicznego i 10 g określonego chitozanu umieszczonego w kolbie stożkowej. Tak przygotowaną zawiesinę mieszano przy użyciu mieszadła mechanicznego (200 obr./min) przez 24 godziny, do uzyskania jednorodnego roztworu.

Następnie próbki odważono na wadze laboratoryjnej. Każdą o masie 3,5 g wylano na szalkę Petriego (50x12 mm). Szalki umieszczono w suszarce laboratoryjnej. Suszono w temperaturze 70°C do całkowitego zestalenia polimeru. Suchą folię odklejano od szalki za pomocą 2% roztworu ługu sodowego. Folie poddano procesowi płukania w wodzie destylowanej w temperaturze 60°C. Wypłukane mokre folie chitozanowe umieszczono na folii PET i przykryto bibułą filtracyjną. Prasowano pod obciążeniem 8 kg/m² do całkowitego wysuszenia.

4.4. Modyfikacje wytworzonych materiałów chitozanowych

Proces modyfikacji umożliwia poprawę szeregu ich właściwości fizykochemicznych. Modyfikacja może mieć charakter fizyczny lub chemiczny.

Modyfikacja fizyczna polega na ukierunkowanej zmianie jego właściwości czynnikami fizycznymi, takimi jak np. energia cieplna, ultradźwięki, pole elektryczne i magnetyczne prowadzących do zmiany kompozycji polimerowej. Modyfikacja chemiczna polimeru polega na zmianie jego właściwości przez kontrolowaną zmianę składu chemicznego makrocząsteczek. Zachodzi ona najczęściej podczas wprowadzania nowych grup funkcyjnych do cząsteczek polimeru lub przemiany grup funkcyjnych w polimerze.

Do przeprowadzenia modyfikacji chemicznej użyto dwóch form chitozanowych: włókninę igłowaną i folię.

4.4.1. Modyfikacja włókien chitozanowych

Pierwszym sposobem modyfikacji była obróbka włókien nasyconymi parami wytypowanych kwasów. Do modyfikacji użyto par nasyconych odpowiedniego kwasu znajdującego się w komorze eksykatora. Użyto kwasu solnego, octowego, mrówkowego, propionowego, masłowego i walerianowego.

Modyfikacji dokonano w następującej procedurze: szalki Petriego o średnicy 20 cm zawierające 20 ml poszczególnych kwasów umieszczono w sześciu eksykatorach o pojemności 3 dm³. Po 24 godzinach wewnątrz eksykatora było nasycone oparami kwasu. Włókniny chitozanowe umieszczano kolejno w środowiskach kwasowych. Próbkę pobierano w odstępach co 15-minut w czasie 120 min. Próbkę po obróbce w atmosferze kwasów zostały umieszczone w kolejnym eksykatorze na 24 godziny nad stałym wodorotlenkiem potasu, celem usunięcia pozostałości kwasu skondensowanego na powierzchni włókien. Po wyjęciu z eksykatora próbki odgazowano za pomocą pompy próżniowej. W końcowej fazie eksperymentu próbki włókien suszono w suszarce laboratoryjnej przy temperaturze do 40 °C, przez okres do 2 godzin.

Podczas procesu przechowywania próbek w atmosferze kwasów następowała kondensacja oparów kwasu na powierzchni włókien a następnie zachodziła reakcja chemiczna na granicy faz pomiędzy cząsteczkami kwasu i chitozanu.

Drugi sposób modyfikacji polegał na poddawaniu włókien chitozanowych działaniu roztworu kwasu octowego w etanolu wraz z procedurą płukania w czystym etanolu. Przygotowano kolejne roztwory kwasu octowego rozpuszczonego w etanolu o stężeniach: 5%, 10%, 15%. Następnie 12 próbek włókien o wymiarach 5 x 5 cm² i masie 1 g umieszczono w zlewkach, do których wiano 200 ml każdego roztworu. Próbki zanurzano w roztworze na okres od 10 min do 60 min w odstępach co 10 minut. Po tym czasie, wyjęto, próbki przepłukano dwukrotnie w czasie 5 minut czystym etanolem, co pozwoliło usunąć nadmiar kwasu. Następnie nadmiar cieczy odcisnięto, osuszono za pomocą bibuły filtracyjnej. Pozostawiono na czas 24 godzin w temperaturze 25 °C do uzyskania stałej masy. Dodatkowo włókninę suszono w suszarce laboratoryjnej w temperaturze 40 °C przez 2 godziny. Całą procedurę powtórzono dla każdego z roztworów.

Trzeci sposób modyfikacji włókien chitozanowych był podobny do drugiego, ponieważ obejmował poddanie próbek działaniu kwasu octowego w etanolu, ale po zakończeniu modyfikacji zrezygnowano z płukania w czystym etanolu. Przygotowano roztwory kwasu octowego w etanolu o stężeniach: 5%, 10%, 15%. Następnie 12 próbek włókien o wymiarach 5 x 5 cm² i masie 1 g umieszczono w zlewkach, do których wiano 200 ml każdego roztworu. Każdą z próbek zanurzono na okres od 10 min do 60 min, wydłużając czas o 10 minut dla kolejnych próbek. Po tym czasie nadmiar roztworu odcisnięto, osuszono za pomocą bibuły filtracyjnej. Pozostawiono na czas 24 godziny w temperaturze 25 °C do uzyskania stałej masy. Następnie włókninę suszono w suszarce laboratoryjnej w temperaturze 40 °C przez 2 godziny. Całą procedurę powtórzono dla każdego z roztworów.

4.4.2. Modyfikacja folii chitozanowych

Modyfikację warstw powierzchniowych folii chitozanowych przeprowadzono zgodnie z procedurą stosowaną dla włókien modyfikowanych parami nasyconymi kwasu octowego. Kolejnym etapem modyfikacji folii chitozanu była reakcja addycji antybiotyku ciprofloksacyny z roztworu NaOH. Następnie zastosowano połączenie tych dwóch metod w celu uzyskania efektu synergii działania biobójczego soli amoniowych chitozanu uzyskanych w wyniku działania kwasów oraz adduktu antybiotyku.

W pierwszym przypadku zmodyfikowano folie chitozanowe w środowisku par nasyconych kwasów. Podczas modyfikacji szalki Petriego o średnicy 20 cm zawierające 20 ml kwasu umieszczono w eksykatorze o pojemności 3 dm³. Po 24 godzinach w eksykatorze uzyskano środowisko nasycone parami kwasu octowego. Folie chitozanowe umieszczono w środowisku kwasowym na czas 2 godzin. Próbkę po obróbce w atmosferze kwasu zostały umieszczone w kolejnym eksykatorze na 24 godziny nad stałym wodorotlenkiem potasu celem usunięcia resztek kwasu skondensowanego na powierzchni folii. Następnie folie odgazowano za pomocą pompy próżniowej. W końcowej fazie eksperymentu próbki folii suszono w suszarce laboratoryjnej przy temperaturze do 40 °C przez 2 godziny.

W drugim przypadku modyfikacja folii chitozanowych dokonana została przez nanoszenie roztworu soli sodowej ciprofloksacyny na powierzchnię folii. Na folie naniesiono roztwór soli sodowej ciprofloksacyny o stężeniu $c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ o objętości 10 ml. Jako rozpuszczalnika użyto ultraczystej wody. Folie poddano działaniu roztworu soli ciprofloksacyny przez 12 godzin. Membrany przemywano trzykrotnie 10 mililitrami ultraczystej wody, w celu usunięcia nadmiaru ciprofloksacyny. Następnie próbki folii suszono w suszarce laboratoryjnej przy temperaturze do 40 °C w czasie 2 godzin.

Przed powyższą poddaną procedurą modyfikacji, folie poddano działaniu roztworu NaOH o stężeniu $c = 5 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$ w czasie 2 godzin celem rozluźnienia struktury polimeru. Po tym czasie folie przemyto ultraczystą wodą i poddano działaniu roztworu soli sodowej ciprofloksacyny.

W trzecim przypadku modyfikacji folii dokonano w połączeniu drugiego sposobu z pierwszym.

4.5. Część analityczna

4.5.1. Oznaczanie ilości grup amoniowych

Standardowa procedura określenia ilości grup amoniowych na powierzchni form chitozanowych oparta była na odwróconym miareczkowaniu zaadsorbowanych reszt kwasowych i przebiegała następująco: do zlewki wprowadzono 50 ml wodorotlenku sodu o stężeniu $0,1 \text{ mol/dm}^3$ i dodano 0,1 g modyfikowanej włókniny. Nadmiar wprowadzonego wodorotlenku sodu miareczkowano konduktometrycznie dodając pipetą automatyczną porcjami 1 mL kwasu solnego o stężeniu $0,1 \text{ mol/dm}^3$ w odstępach co 2 minuty. Odczytywano przewodność roztworu. Następnie ilość obecnego kwasu na powierzchni form chitozanowych obliczono na podstawie wykresu przewodności roztworu. Analogiczną procedurę powtórzono dla wszystkich próbek.

Objętość retencji określono przy użyciu następujących wzorów:

Liczbę zaadsorbowanych moli kwasu (mol) wyznaczono ze wzoru

$$n_x = n_{\text{NaOH}} - n_{\text{HCL}} \text{ (mol)} \quad (1)$$

gdzie:

$$n_{\text{NaOH}} = C_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}}$$

$$n_{\text{HCL}} = C_{\text{HCL}} \cdot V_{\text{HCL}}$$

Liczbę przyłączonych grup kwasowych (AAG) na włókninie wyznaczano ze wzoru:

$$AAG = \frac{n_x}{m} \quad (2)$$

gdzie:

n_x – liczba zaadsorbowanych moli kwasu (mol/g)

m – masa włókniny

Pojemność retencyjną (RV) włókniny wyznaczano przy pomocy wzoru:

$$RV = \frac{\frac{n_x}{m}}{M_{\text{chitozanu}}} \times 100\% \quad (3)$$

gdzie:

n_x – liczba zaadsorbowanych moli kwasu (mol/g)

m – masa włókniny

M_{chitozan} – masa molowa chitozanu

4.5.2. Analiza FTIR kwasowej formy soli chitozanu

Analizowano struktury molekularne włókniny chitozanowej za pomocą spektrometru FTIR, Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA), w trybie tłumionego całkowitego odbicia (ATR) z kryształem diamentowym (kąąt padania 45°). Warunki pomiaru były następujące: rozdzielczość wynosiła 2cm⁻¹, zakres promieniowania podczerwonego (IR) wynosił 4000-600cm⁻¹, a w celu uzyskania widm absorpcji przeprowadzono 32 procedury skanowania każdej próbki promieniowaniem IR. Widma absorpcyjne badanych preparatów włókien wykreślono w układzie: A=f(1/l) jako podstawę do interpretacji struktury molekularnej włókniny.

Wzory (4), (5) zostały wykorzystane do określenia stopnia acetylacji (DA). Do obliczeń wykorzystano oprogramowanie Thermo Scientific™ OMNIC™ Spectra zgodnie z danymi (215).

$$DA(\%) = \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times 100/1.33 \quad (4)$$

gdzie:

A₁₆₅₅, A₃₄₅₀- wartości pola powierzchni piku absorbancji od odpowiedniej linii bazowej poszczególnego pasma dla charakterystycznych grup w chitozanie.

$$DA(\%) = \left(\frac{A_{1320}}{A_{1410}} - 0.03822 \right) / 0.03133 \quad (5)$$

gdzie:

A₁₃₂₀, A₁₄₁₀- wartości pola powierzchni piku absorbancji od odpowiedniej linii bazowej poszczególnego pasma dla charakterystycznych grup w chitozanie.

4.5.3. Pomiary lepkości roztworów chitozanowych

Procedura pomiaru lepkości istotnej roztworów chitozanu po procesie degradacji w roztworach kwasu była następująca: próbki chitozanu po procesie degradacji w postaci liofilizowanych pianek rozpuszczano w kwasie octowym o stężeniu 3%, uzyskując stężenie polimeru 0,2 g/100 cm³.

Przeprowadzono pomiar przy użyciu wiskozymetru firmy SI Analytics GmbH, Mainz, Niemcy, nr kapilary 532.11/la w temperaturze 25 °C. Dodano odpowiednią ilość NaCl, tak aby powstałe roztwory zawierały odpowiednio 0,25 mol/dm³ chitozanu i 0,25 M chlorku sodu.

Zredukowaną lepkość istotną roztworów chitozanu wyznaczono z zależności Salomona-Ciutâ (216):

$$[\eta] = \frac{\sqrt{2}}{c} \sqrt{\eta_{spec} - \ln \eta_{rel}} \quad (6)$$

gdzie:

$[\eta]$ – zredukowana lepkość istotna

C - stężenie polimeru

η_{spec} - lepkość właściwą

η_{rel} - lepkość względna

Wyznaczono średnią wiskozymetryczną masę molową chitozanu według wzoru Marka-Houwink-Sakrura (217) dla parametru $K=1.57 \times 10^{-4}$ i $a = 0.79$ zgodnie zdanymi literaturowymi (218):

$$[\eta] = 1.57 \times 10^{-4} M_v^{0.79} \quad (7)$$

4.5.4. Analiza chromatografii żelowej GPC/SEC próbek chitozanu po procesie degradacji

Przeprowadzono badania molekularne chitozanu, w tym wyznaczenie funkcji rozkładu mas molowych (MMD), średnich wartości mas molowych (M_n , M_w) i polidispersyjności (M_w/M_n), metodą chromatografii żelowej GPC/SEC.

Wykonano analizę GPC/SEC w roztworze buforowym zawierającym 0,2M octanu sodu i 0,3M kwasu octowego przy szybkości przepływu 0,8 ml/min. System Agilent Technologies GPC / SEC z pompą 1260 ISO i autosamplerem 1260 ALS był wyposażony w detektor refraktometryczny Optilab T-rEX (Wyatt Technology, USA). Separacja makrocząsteczek odbywała się w systemie kolumn (Agilent) 2x PL aquagel OH Mixed, o długości 300 mm, w temperaturze 30°C. Kalibrację kolumn przeprowadzono przy użyciu wzorców Varian PEO/PEG o masach molowych w zakresie od 1970 D do 278 100 D. Wyniki analizy GPC/SEC w postaci funkcji rozkładu mas molowych (MMD), średnich wartości mas molowych (M_n, M_w) i polidispersyjności (M_w/M_n) obliczono stosując uniwersalną metodę kalibracji, gdzie parametry a i K równania Mark-Houwink-Sakurada wynoszą odpowiednio: dla wzorców PEO/PEG $a = 0,625$ i $k = 62 \times 10^{-5}$ ml/g, a dla chitozanu $a = 0,76$ i $k = 74 \times 10^{-5}$ ml/g (219).

4.5.5. Analiza spektroskopia 1-H NMR próbek chitozanu

Określono strukturę chemiczną i DDA niezmodyfikowanych próbek chitozanu, jak również próbek chitozanu po obróbce kwasem za pomocą analizy spektroskopii 1H-NMR na spektrometrze Bruker AM 400 przy użyciu mieszanego rozpuszczalnika DC1 i D₂O (1%, w/w) z obecnością DSS jako wzorca wewnętrznego.

Przygotowano próbki w następujący sposób: 50mg soli chitozanu otrzymanych przez liofilizację roztworu w odpowiednim kwasie, zdyspergowano w D₂O i po homogenizacji rozpuszczono przez dodanie DC1 (D₂O/DC1 36:1, v/v). Po utworzeniu homogenicznego roztworu wykonano pomiary w temperaturze 303 K przy użyciu 32-skanowej akumulacji impulsów.

Stożenie deacetylacji chitozanu obliczono za pomocą następnego wzoru:

$$DDA = 100 - \frac{A-CH_3}{C3-C6} \times 166.67 \quad (8)$$

gdzie:

A-CH₃ – pole powierzchni sygnału protonów grupy acetamidowej

C3-C6 – pole powierzchni sygnałów protonów przy węglach od 3 do 6 w pierścieniu cukrowym chitozanu

4.5.6. Analiza spektroskopii 1H - NMR soli kwasów chitozanu

Procedura przygotowania próbek soli kwasów chitozanu do analizy spektroskopii 1H NMR była analogiczna jak procedura sporządzania roztworów przedstawiona w punkcie 4.5.5.

Stożenie deacetylacji chitozanu obliczono przy użyciu następnego wzoru, gdzie DS jest stopniem podstawienia (9):

$$DS = \frac{\frac{1}{3}AC \underline{H}}{\underline{H}2} \quad (9)$$

gdzie:

AC H – pole powierzchni sygnału protonu pochodzącego od reszty kwasowej atomu węgla przyłączonej do chitozanu

H2 – pole powierzchni sygnału protonu przy drugim atomie węgla w pierścieniu cukrowym chitozanu

4.5.7. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa folii chitozanowych

Odporność drobnoustrojów wymusza poszukiwania skutecznych materiałów, substancji wskazujących na działania przeciwdrobnoustrojowe, o szerokim spektrum działania, jednocześnie bezpiecznych dla organizmu.

Przygotowanie próbek do badań przeciwdrobnoustrojowych polegało w pierwszej kolejności na pocięciu zmodyfikowanych próbek chitozanu na kawałki o powierzchni 1 cm². Procedurę badawczą opracowano wykorzystując z niewielkimi modyfikacjami badania opisane przez Maciejewską (220). Testy wykonano na referencyjnych szczepach bakteryjnych. Badania przeprowadzono zgodnie z procedurami zalecanymi przez Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Aktywność badano na podłożu Mueller Hinton Broth II (Biocorp, Warszawa, Polska) metodą mikrorozcieńczeń bulionowych na polistyrenowych płytkach 96-dołkowych (Kartell, Noviglio, Włochy). Dodawano inokulum bakteryjne w ilości ok. 5×10^5 CFU/ml. Płytki inkubowano przez noc w temperaturze 37°C.

Przeprowadzono dwa testy mikrobiologiczne w celu oceny właściwości przeciwdrobnoustrojowych materiałów. Oceniono toksyczność chitozanu.

4.5.8. Podatność na kolonizację mikrobiologiczną próbek włókniny chitozanu

Spostrzeżona podatność dostępnych materiałów do zastosowań medycznych na kolonizację mikrobiologiczną jak i również dostrzegana większa odporność drobnoustrojów na środki biobójcze, wymusza prowadzenie badań nad nowymi, modyfikowanymi materiałami celem zapobiegania zjawisku adhezji bakterii do ich powierzchni.

Niesterylne próbki chitozanu umieszczono w 24-dołkowych płytkach płaskodennych zawierających pożywkę Mueller Hinton II Broth (dla bakterii) oraz pożywkę Sabouraud Broth (dla grzybów) w celu oceny odporności materiałów na kolonizację mikrobiologiczną. Inkubowano fragmenty próbek chitozanu przez 24 godziny w temperaturze 37°C (w celu zaobserwowania wzrostu bakterii) oraz w temperaturze 25°C (w celu zaobserwowania wzrostu grzybów). Po inkubacji, 10 µl pożywki z każdego dołka wysiano na płytki agarowe. Dokonano oceny wizualnej wyglądu kolonii po upływie 24 godzinnej inkubacji.

4.5.9. Aktywność bakteriobójczą włóknin chitozanowych

W celu przeprowadzenia badania aktywności bakteriobójczej zmodyfikowanego materiału wykonano test według podobnej procedury jak w przypadku badań ich podatności na kolonizację mikrobiologiczną (przedstawioną w punkcie 4.5.8), z różnicą, użycia inokulum bakteryjnego. Sprawdzano zdolności zmodyfikowanego materiału chitozanowego na działanie przeciw mikroorganizmom. Nasączono próbki chitozanu za pomocą 0,5 ml zawiesiny bakteryjnej o gęstości 0,5 McFarlanda. Użyto dwóch szczepów referencyjnych: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Escherichia coli* ATCC 25922. Inkubowano próbki przez 24 godziny w temperaturze 37 °C. Wysiewano po inkubacji, 10 µl pożywki z każdej studzienki na płytki agarowe i obserwowano liczbę kolonii.

4.5.10. Aktywność hemolityczna próbek chitozanu

Przeprowadzono test hemolizy, wykorzystując niektóre etapy procedur badawczych opisanych wcześniej przez Avrahami (221). Procedura badawcza przedstawiała się następująco: Ludzkie krwinki czerwone ze świeżej krwi pobrane do probówek z EDTA jako antykoagulant. Odwirowano krew, a osocze ponownie usunięto. Po przepłukaniu roztworem PBS przygotowano 4% roztwór RBC. Fragmenty chitozanu umieszczono fragmenty chitozanu w 0,5ml roztworu krwinek czerwonych i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Przygotowano procedurę kontrolną z 0% hemolizą (erytrocyty z PBS) i 100% hemolizą (erytrocyty z 1% Tritonem-X). Po inkubacji 100µL roztworu, z każdego dołka przenoszono do 96-dołkowej płytki i odwirowywano (1 h, 4 °C, 7 min, 1000 × g). Otrzymany przesącz ponownie zawieszono w nowej płytce i zmierzono uwalnianie hemoglobiny. Przeprowadzono pomiar absorbancji UV-VIS z maksimum przy 540 nm.

4.5.11. Wyznaczanie kinetyki degradacji chitozanu

Kinetykę degradacji chitozanu określono na podstawie zależności określającej zmiany mas cząsteczkowych w funkcji czasu oddziaływania kwasu organicznego. W tym celu skorzystano z zależności opisującej kinetyczną degradację przez hydrolizę według mechanizmu pierwszego rzędu (219) (222).

$$\frac{1}{(M_w)_t} - \frac{1}{(M_w)_{t_0}} = \frac{k}{M} \times t \quad (10)$$

gdzie:

$(M_w)_0$ – średnia wagowa masa molowa polimeru przed degradacją [g/mol]

$(M_w)_t$ - średnia wagowa masa molowa polimeru po degradacji w czasie [g/mol]

k - stała szybkości degradacji

t - czas degradacji [min]

M- masa molowa chitozanu [g/mol]

4.5.12. Analiza GPC/SEC - określenie masy cząsteczkowej chitozanu

Przeprowadzono badania molekularne chitozanu, w tym wyznaczono funkcję rozkładu mas molowych (MMD), średnie wartości mas molowych (M_n , M_w) oraz polidispersyjności (M_w/M_n). Pomiary wykonano za pomocą chromatografii żelowej/chromatografii wykluczania (GPC/SEC) zgodnie z procedurą opisaną w artykule (223).

4.5.13. Ilościowa ocena zawartości ciprofloksacyny w fizycznym addukcie chitozan - ciprofloksacyna metodą RP-HPLC

Wyznaczono ilość zaadsorbowanej ciprofloksacyny poprzez pomiar jej ubytku z roztworu o stężeniu 2 mg/100 ml w ciągu 48 godzin, w którym zanurzono chitozanowy dysk (folię) o średnicy 6 cm. Testy przeprowadzono metodą HPLC. Dla każdego punktu pomiarowego wykonano 6 analiz. Wyniki te stanowiły podstawę do uzyskania wartości średniej dla danego punktu pomiarowego. Analizy przeprowadzono po 3, 6 i w przedziale od 10 do 60 minut oraz po 21, 24 i 48 godzinach. Mierzono absorpcję ciprofloksacyny przy długości fali 278nm, metodą analityczną: 10-100%, 10 minut, 0,5 ml/min, 25°C, faza ruchoma (A) woda i (B) acetonitryl, oba rozpuszczalniki zawierające 0,1% (v/v) kwasu mrówkowego. Kolumna Agilent, Zorbax SB-C18, 4.6x50mm, 1.8µm. Objętość zastosowanej próbki wynosiła 20µl. RP-HPLC, Waters e2695 Separations Module, detektor Waters 2998 PDA, oprogramowanie Empower 3.

4.5.14. Analiza powierzchni adduktu ciprofloksacyny do chitozanu metodą AFM

Wykonano pomiary w trybie PeakForce Tapping, przy użyciu mikroskopu AFM Multimode 8 firmy Bruker. Bruker Nano Surfaces Division, Santa Barbara, CA USA. Skany AFM uzyskano rejestrując 512 linii dla każdego obrazu, skanując je z częstotliwością około 1 kHz.

Te same parametry analizy AFM zastosowano dla próbek folii chitozanu poddanych działaniu roztworu ciprofloksacyny w NaOH i pary nasyconej kwasu octowego.

4.5.15. Analiza powierzchni adduktu ciprofloksacyny do chitozan - metodą SEM

Próbki folii chitozanu modyfikowanych antybiotykiem przymocowano do stolików mikroskopowych za pomocą przewodzącej taśmy węglowej. Następnie próbki pokryto warstwą węgla o grubości 10 nm. Do tego celu wykorzystano napyłarkę Leica EM ACE 600. Obserwacje mikrostruktury i analizy chemicznej przeprowadzono za pomocą wysokorozdzielczego skaningowego mikroskopu elektronowego Nova NanoSem 200 (FEI, Eindhoven, Holandia) wyposażonego w spektrometr dyspersji energii EDS (EDAX, Tilburg,

Holandia). Dokonano obserwacji i analizy w warunkach niskiej próżni (60Pa), z detektorem LVD pracującym w trybie elektronów wtórnych i przy napięciu przyspieszającym 10kV.

4.5.16. Analiza fizycznych adduktów folii chitozan i chitozan - cirpofloksacyna poddanych działaniu oparów kwasu octowego metodą FTIR

Analizowano struktury molekularne włókien chitozanowych za pomocą spektrometru FTIR Nicolet 6700 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) w trybie tłumionego całkowitego odbicia (ATR), z kryształem diamentowym (kąt padania 45°). Warunki pomiaru były następujące: rozdzielczość wynosiła 2 cm⁻¹, zakres promieniowania podczerwonego (IR) wynosił 4000-600 cm⁻¹. W celu uzyskania widm absorpcji przeprowadzono 32 procedury skanowania każdej próbki przeprowadzono przy użyciu promieniowania IR w celu uzyskania widm absorpcji. Widma absorpcyjne próbek zostały wykreślone w układzie $A = f(1/l)$, jako podstawa do interpretacji struktury molekularnej włókniny.

4.5.17. Analiza fizycznego adduktu chitozan – cirpofloksacyna metodą NMR

Wykonano eksperymenty ¹³C NMR. Zarejestrowano na spektrometrze Bruker Avance III 600 o częstotliwości roboczej 150,93 i 600,15 MHz odpowiednio dla ¹³C i ¹H. W każdym eksperymencie próbkę umieszczano w 4 mm rotorze ZrO₂ i wirowano z prędkością 8 kHz. Mierzono widma ¹³C CP/MAS z czasem powtarzania 10 s w temperaturze otoczenia. Próbka chlorowodoru histydyny znakowanego U-¹³C, ¹⁵N została użyta do ustawienia warunku Hartmanna-Hahna dla ¹³C, z długością impulsu protonowego 90° wynoszącą 4 μs. W przypadku polaryzacji krzyżowej częstotliwość nutacji wynosiła 50,5 kHz dla ¹³C, z kształtem rampy ¹H od 90% do 100% i częstotliwością nutacji ¹H 62,5 kHz. Zastosowano we wszystkich przypadkach sekwencję odsprzęgającą SPINAL-64 z długością impulsu ¹H wynoszącą 3,6 μs. Przesunięcie chemiczne ¹³C zostało odniesione pośrednio przy użyciu adamantanu (rezonans przy 38,48 i 29,46 ppm) jako zewnętrznego odniesienia wtórnego.

Zarejestrowano widma ^{19}F MAS NMR na spektrometrze Bruker Avance III 400 MHz, wyposażonym w głowicę ^1H , ^{19}F , szerokopasmową głowicę rezonansową MAS 2,5 mm, pracującą przy 376,55 MHz dla fluoru. Czas trwania impulsu 90° ustawiono na 2,25 μs . Zastosowano w eksperymencie z odsprężeniem ^{19}F schemat π -impulsowy z impulsem 180° równym 6 μs . Zebrane widma zostały zewnętrznie odniesione do CFCl_3 (0 ppm). Wszystkie widma zostały zarejestrowane i przetworzone za pomocą programu Bruker TopSpin 3.1. Przygotowano do analizy ^{13}C CP MAS i ^{19}F MAS RO NRM w fazie stałej (mieszanina stałego chitozanu i stałej ciprofloksacyny) dwie próbki zawierające 10mg i 50mg ciprofloksacyny i obie próbki wypełniono do 0,3g chitozanu, celem zhomogenizowania próbki. Wymieszano ciała stałe dokładnie i roztarto w moździerzu. Celem przeprowadzenia analizy ^{13}C CP MAS NMR fizycznego adduktu chitozan - ciprofloksacyna, próbki folii chitozanej w postaci krążków inkubowano w 10ml $15,1 \times 10^{-4}$ M w ciprofloksacynie przez 48 godzin.

4.5.18. Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej fizycznego adduktu folii chitozan - ciprofloksacyna i chitozan - ciprofloksacyna poddanych działaniu oparów kwasu octowego

Oceniono właściwości przeciwdrobnoustrojowe próbek chitozanu wobec bakterii: Gram-dodatnich *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i Gram-ujemnych *Escherichia coli* ATCC 8739 oraz grzybów: *Candida albicans* ATCC 10231 i *Penicillium expansum* LOCK 0535, metodą dyfuzji agarowej przeprowadzonej zgodnie z metodami przygotowania środków przeciwdrobnoustrojowych według procedury Jianga (224).

Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Przygotowano zawiesiny drobnoustrojów przez zawieszenie 3-5 dobrze oddzielonych kolonii z płytek Tryptic Soy Agar TSA (bakterie) lub Malt Extract Agar MEA (grzyby) w 3 ml roztworu Ringera, a zmętnienie dostosowano do standardu 0,5 McFarlanda (Desitometer D1, Merck, Darmstadt, Niemcy).

Zawiesiny wykorzystano bezpośrednio jako końcowy materiał siewny w metodzie dyfuzyjnej. Do testów dyfuzyjnych płytki agarowe zostały zaszczerpione zawiesinami mikroorganizmów opisanych powyżej poprzez równomierne wymazanie w trzech kierunkach w celu utworzenia podłoża. Następnie sterylne kwadraty chitozane

o wymiarach 5 mm x 5 mm (sterylizowane w świetle UV 265 nm przez 1 godzinę z każdej strony) umieszczano na powierzchni zaszczipionych płytek agarowych za pomocą sterylnych kleszczyków. W podobny sposób na płytkach agarowych umieszczono próbki kontrolne, kontrolę pozytywną - papierowy kwadrat nasączony roztworem ciprofloksacyny i kontrolę negatywną - papierowy kwadrat bez antybiotyków. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny (bakterie) i 25°C przez 3 dni (grzyby) i mierzono średnice stref zahamowania wzrostu.

Do testów aktywności przeciwbakteryjnej wykorzystano zestaw folii chitozanowych, fizyczny addukt chitozan - ciprofloksacyna oraz folie chitozan - ciprofloksacyna poddane działaniu oparów kwasu octowego w postaci folii (tabela 2).

Tabela. 2 Charakterystyka chitozanu użytego do modyfikacji wraz z metodą modyfikacji.

Li	Nazwa	Mn, g/mol	Mw g/mol	Mw/Mn	Opis
1	CS 1	94 700	209 500	2,21	bez modyfikacji
2	CS 2	13 600	28 900	2,12	bez modyfikacji
3	CS 3	5 380	154 200	2,87	bez modyfikacji
4	CS 4	85 700	216 200	2,52	bez modyfikacji
5	CS 5	113 100	189 800	1,68	bez modyfikacji
6	CS 6	53 900	129 200	2,40	bez modyfikacji
7	CS 1C	-	-	-	Modyfikacja cyprofloksacyną
8	CS 2C	-	-	-	Modyfikacja cyprofloksacyną
9	CS 3C	-	-	-	Modyfikacja cyprofloksacyną
10	CS 4C	-	-	-	Modyfikacja cyprofloksacyną
11	CS 1G	-	-	-	Modyfikacja oparami kwasu octowego
12	CS 2G	-	-	-	Modyfikacja parami kwasu octowego
13	CS 3G	-	-	-	Modyfikacja parami kwasu octowego
14	CS 4G	-	-	-	Modyfikacja parami kwasu octowego
15	CS 5G	-	-	-	Modyfikacja parami kwasu octowego
16	CS 6G	-	-	-	Modyfikacja parami kwasu octowego
17	CS 1CG	-	-	-	Modyfikacja cyprofloksacyną z późniejszą modyfikacją parami kwasu octowego
18	CS 2CG	-	-	-	Modyfikacja cyprofloksacyną z późniejszą modyfikacją parami kwasu octowego

Czas inkubacji w przypadku modyfikacji parami kwasu octowego wynosił 120 min.

V. ZESTAWIENIE I OMÓWIENIE WYNIKÓW

5.1. Wyniki pomiarów degradacji chitozanu w różnych kwasach

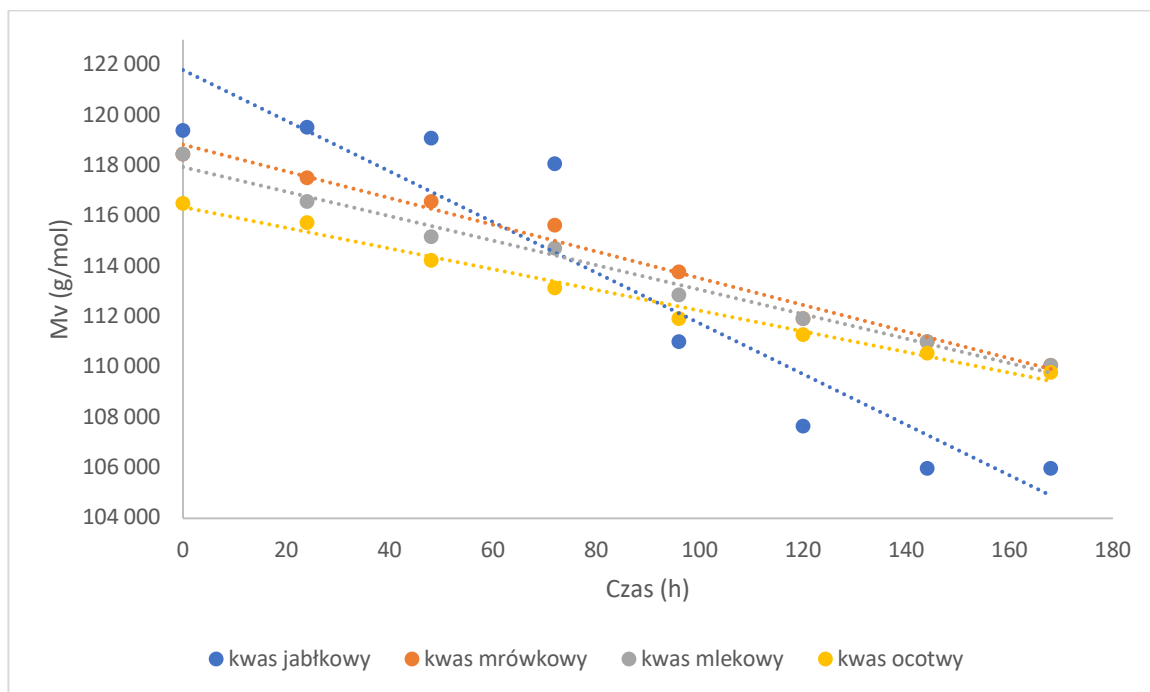
5.1.1. Wyniki pomiarów lepkości istotnej soli chitozanu poddanej procesowi degradacji.

Wartości lepkości wewnętrznej rozcieńczonych roztworów chitozanu poddanych procesowi starzenia w kwasach organicznych, różniących się pKa oraz wyznaczone na ich podstawie średnie wiskozymetryczne masy molowe M_v przedstawiono w tabeli 3 i na rysunku 13. Natomiast wartość współczynnika kąтового uzyskanego z liniowej zależności zmian M_v od czasu degradacji przedstawia tabela 4.

Tabela 3. Wyniki pomiarów zredukowanej lepkości istotnej soli chitozanu poddanej procesowi degradacji oraz wartości średniej wiskozymetrycznej masy molowej

Czas degradacji (h)	Sól kwasu jabłkowego pKa = 3.51		Sól kwasu octowego pKa = 4.76	
	η	M_v (g/mol)	η	M_v (g/mol)
0	1,61	119 400	1,58	116 500
24	1,61	119 400	1,57	115 700
48	1,62	118 500	1,55	114 300
72	1,59	117 500	1,54	113 000
96	1,52	111 000	1,53	111 900
120	1,48	107 300	1,52	111 300
144	1,32	106 300	1,51	110 600
168	1,31	106 000	1,51	109 800
Czas degradacji (h)	Sól kwasu mrówkowego pKa = 3.75		Sól kwasu mlekowego pKa = 3.81	
	η	M_v (g/mol)	η	M_v (g/mol)
0	1,60	118 500	1,60	118 500
24	1,59	117 500	1,58	116 600
48	1,58	116 600	1,57	115 200
72	1,57	115 700	1,56	114 700
96	1,55	113 800	1,54	112 900
120	1,53	111 900	1,53	111 900
144	1,52	111 000	1,52	111 010
168	1,51	110 100	1,51	110 100

Wyniki umieszczone w tabeli 3 przedstawiają wartości średniej wiskozymetrycznej masy molowej M_v oraz zredukowaną lepkość istotną, potwierdzają występowanie degradacji we wszystkich badanych kwasach. Największy spadek zredukowanej lepkości istotnej występuje w przypadku kwasu jabłkowego, podczas gdy w pozostałych kwasach, takich jak kwas octowy, mrówkowy i mlekowy, wpływ ten jest równomierny w odniesieniu do spadku wiskozymetrycznej średniej masy molowej.



Rysunek 13. Zmiany M_v chitozanu po czasie degradacji

Tabela 4. Wartość współczynnika kąтового uzyskanego z liniowej zależności zmian M_v od czasu degradacji

	pKa	Współczynnik kąta Rysunek 1 [g/mol*h]	Błędy Współczynnika kąta	R ²
Kwas jabłkowy	3,51	-150.24	6,14	0.99
Kwas mrówkowy	3,75	-53.06	2,61	0.98
Kwas mlekowy	3,81	-48.65	2,43	0.98
Kwas octowy	4,76	-41.11	2,07	0.98

Na podstawie przedstawionej graficznie zależności między M_v a czasem degradacji (rysunek 13) oraz wartości współczynnika kąтового uzyskanego z liniowej zależności M_v (tabela 4) obserwuje się widoczne zmiany, wskazujące na trwający proces degradacji polimeru. Wartości współczynnika kąтового przedstawiono w tabeli 4 uzyskanego z liniowej zależności M_v . Największy spadek wartości M_v w czasie, odpowiadający zmniejszeniu o 11,22% w $t = 168$ godzin, obserwuje się dla chitozanu obrabianego kwasem jabłkowym (wartość nachylenia -150,24). W przypadku kwasu mrówkowego, octowego i mlekowego zmiany M_v nie były tak gwałtowne jak w przypadku kwasu jabłkowego (dla kwasu octowego - spadek o 5,75% w $t = 168$ godzin; dla kwasu mrówkowego i mlekowego – o 7,09%). Niemniej jednak, one również wykazują na destrukcyjny wpływ kwasu na makrocząsteczki chitozanu. Kolejnym kwasem pod względem aktywności degradacyjnej jest kwas octowy, a następnie kwas mrówkowy. Kwas mlekowy charakteryzuje się najmniejszym wpływem na zmiany M_v w czasie. Można przypisać następującą kolejność (siła degradacji):

kwas octowy \rightarrow kwas mlekowy \rightarrow kwas mrówkowy \rightarrow kwas jabłkowy

5.1.2. Analiza wyników GPC/SEC

Na podstawie analizy chromatograficznej GPC/SEC wyznaczono następujące parametry molekularne: średnią liczbową masę molową (M_n), średnią wagową masę molową (M_w), polidispersyjność (P_d) oraz rozkład masy molowej (MMD) dla próbek chitozanu poddanych procesowi degradacji w temperaturze 20°C. Wyniki zostały podsumowane w tabeli 5.

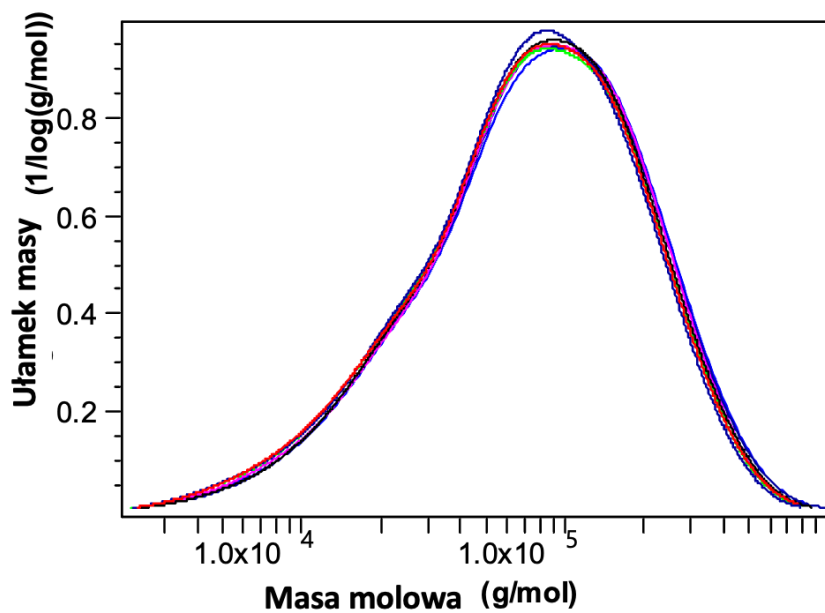
Tabela 5. Wartości parametrów molekularnych wyznaczonych techniką GPC/SEC.

Czas degradacji (h)	Sól kwasu jabłkowego pKa = 3.51			Sól kwasu octowego pKa = 4.76		
	M _n (g/mol)	M _w (g/mol)	Pd (M _w /n)	M _n (g/mol)	M _w (g/mol)	Pd (M _w /n)
0	45 300	114 100	2,52	44 200	114 200	2,58
24	43 800	111 800	2,55	43 900	113 000	2,57
48	43 800	108 100	2,47	43 600	110 900	2,54
72	42 100	106 200	2,52	43 300	110 900	2,56
96	41 400	103 100	2,49	42 900	109 500	2,55
120	40 700	100 500	2,47	42 600	108 500	2,55
144	40 800	100 000	2,45	41 900	108 000	2,58
168	39 650	97 000	2,45	41 800	107 800	2,58
Czas degradacji (h)	Sól kwasu mrówkowego pKa = 3.75			Sól kwasu mlekowego pKa = 3.81		
	M _n (g/mol)	M _w (g/mol)	Pd (M _w /M _n)	M _n (g/mol)	M _w (g/mol)	Pd (M _w /M _n)
0	44 600	119 200	2,67	48 500	114 400	2,36
24	44 800	117 000	2,61	46 900	110 000	2,35
48	43 900	116 000	2,64	45 800	108 100	2,36
72	41 900	114 500	2,73	44 800	105 500	2,35
96	41 400	113 400	2,74	44 100	101 400	2,30
120	43 000	112 600	2,62	43 700	101 800	2,33
144	41 700	111 600	2,68	44 100	100 300	2,27
168	41 700	110 000	2,64	42 900	99 000	2,31

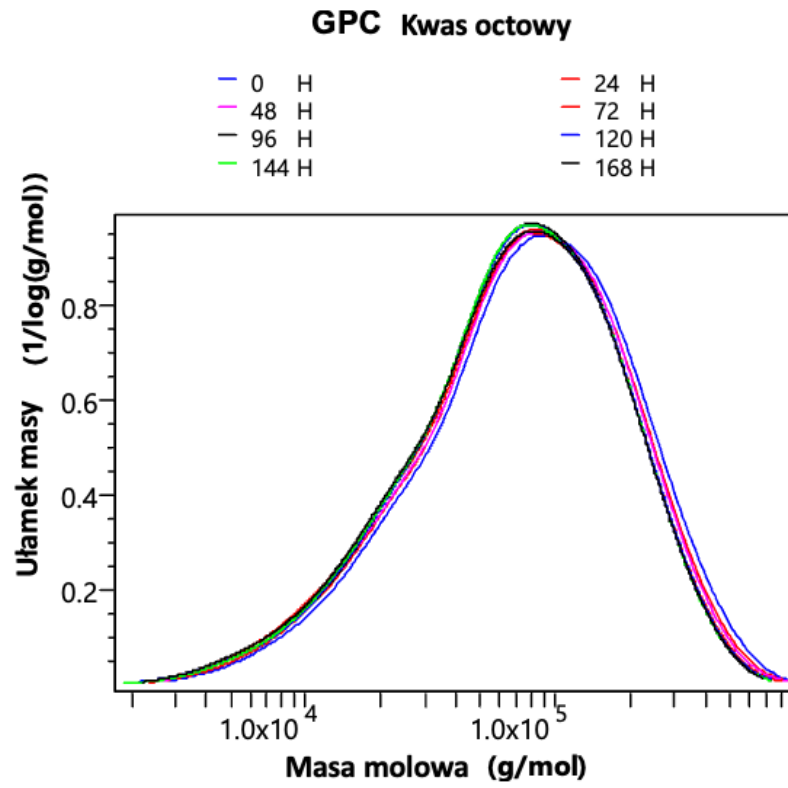
W tabeli 5 przedstawiono parametry molekularne wyznaczone techniką GPC/SEC. Zaobserwowano, że proces degradacji przebiegał we wszystkich badanych kwasach. Największy spadek średnich mas molowych występuje w przypadku kwasu mlekowego i jabłkowego. Na podstawie przedstawionej graficznie zależności między M_w a czasem degradacji, pokazanej na (Rysunek 18, Tabela 6), największy spadek wartości M_w w czasie obserwuje się dla chitozanu rozpuszczonego w kwasie jabłkowym - wartość nachylenia - 101,49 [g/mol*h], następnie kwasem mlekowym - 88,94 [g/mol*h], kwasem mrówkowym - 50,94 [g/mol*h] i kwasem octowym - 38,89 [g/mol*h]. Podobną zależność obserwuje się dla wartości M_n (Rysunek 19, Tabela 7). Na podstawie analizy wyników GPC/SEC można przypisać następującą kolejność siły degradacji kwasów dla roztworów chitozanu: kwas octowy → kwas mrówkowy → kwas mlekowy → kwas jabłkowy.

GPC Kwas jabłkowy

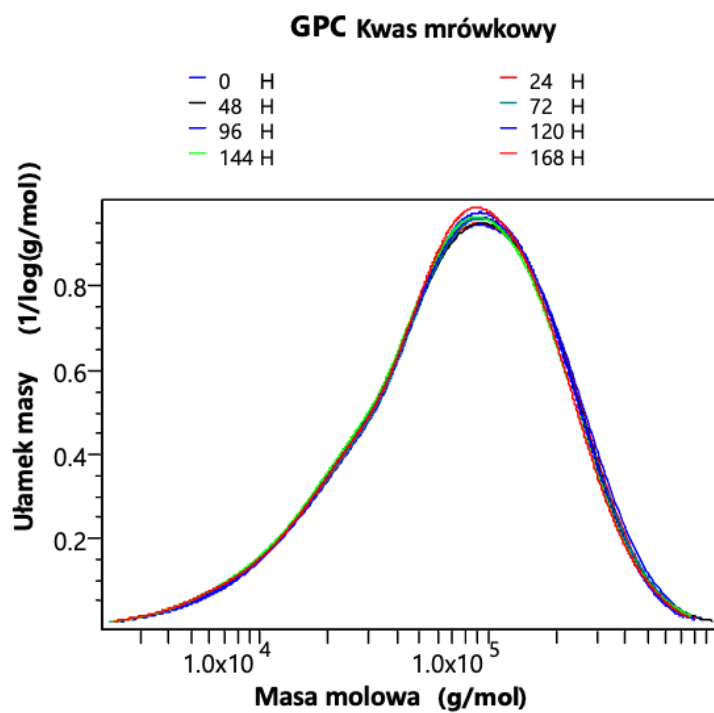
- 0 H
- 24 H
- 48 H
- 72 H
- 96 H
- 120 H
- 144 H
- 168 H



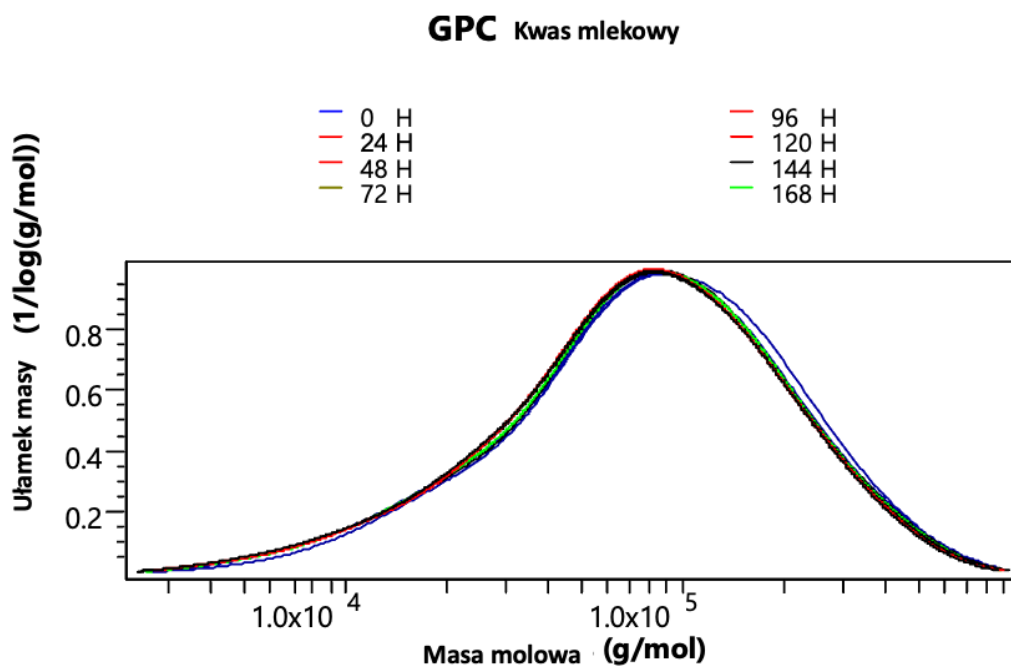
Rysunek 14. Rozkład masy molowej chitozanu degradowanym w kwasie jabłkowym



Rysunek 15. Rozkład masy molowej chitozanu degradowanym w kwasie octowym.



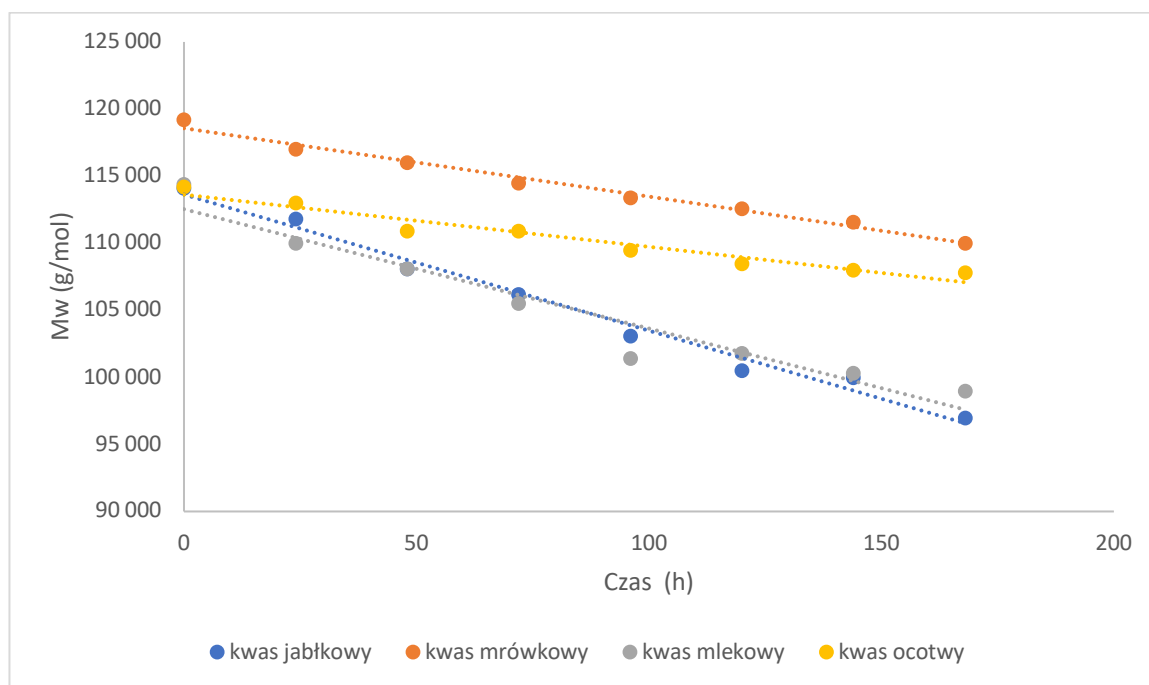
Rysunek 16. Rozkład masy molowej chitozanu degradowanym w kwasie mrówkowym.



Rysunek 17. Rozkład masy molowej chitozanu degradowanym w kwasie mlekowym.

Tabela 6. Wartość współczynnika kątego uzyskanego z liniowej zależności zmian Mw w czasie degradacji

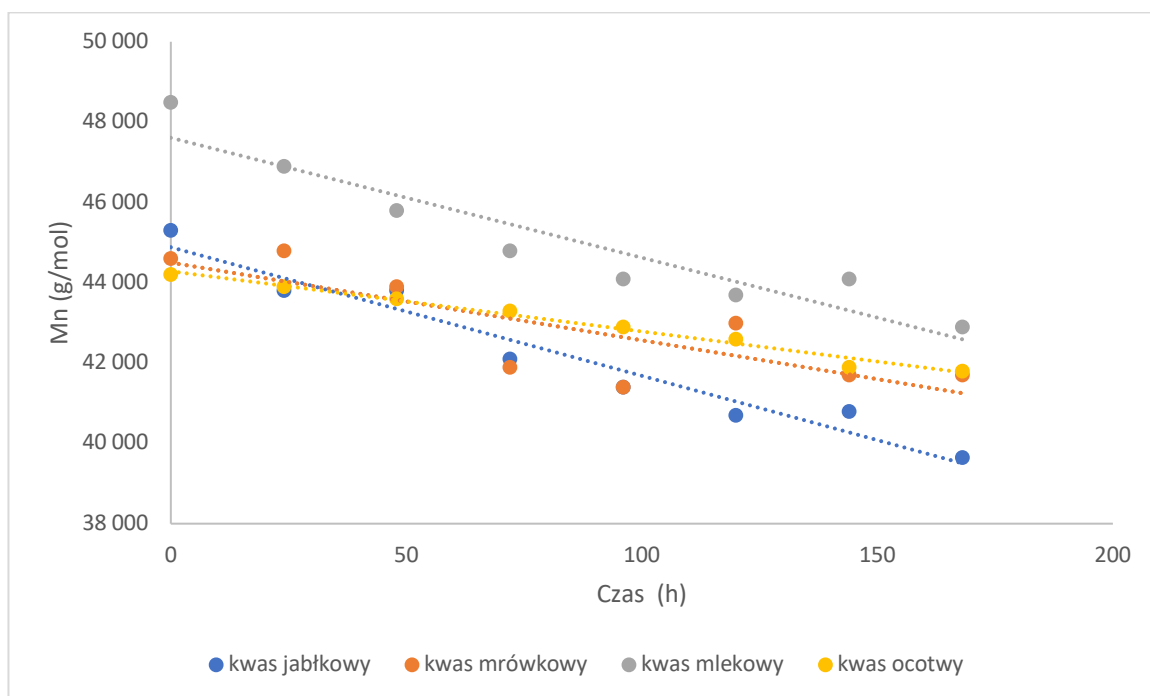
	pKa	Współczynnik kąta [g/mol*h] rysunek 18	Błędy Współczynnika kąta	R ²
Kwas jabłkowy	3.51	-101,49	5,05	0,99
Kwas mrówkowy	3.75	-50,94	2,52	0,99
Kwas mlekowy	3.81	-88,94	9,51	0,94
Kwas octowy	4.76	-38,89	3,74	0,95



Rysunek 18. Zmiany wartości Mw chitozanu po czasie degradacji.

Tabela 7. Wartość współczynnika kątego uzyskanego z liniowej zależności zmian Mn od czasu degradacji

	pKa	Współczynnik kąta [g/mol*h] rysunek 19	Błędy Współczynnika kąta	R ²
Kwas jabłkowy	3.51	-32,02	2,98	0,95
Kwas mrówkowy	3.75	-19,35	5,61	0,66
Kwas mlekowy	3.81	-29,86	4,23	0,89
Kwas octowy	4.76	-14,98	0,77	0,98



Rysunek 19. Zmiany wartości Mn chitozanu po czasie degradacji

5.1.3. Kinetyka degradacji chitozanu

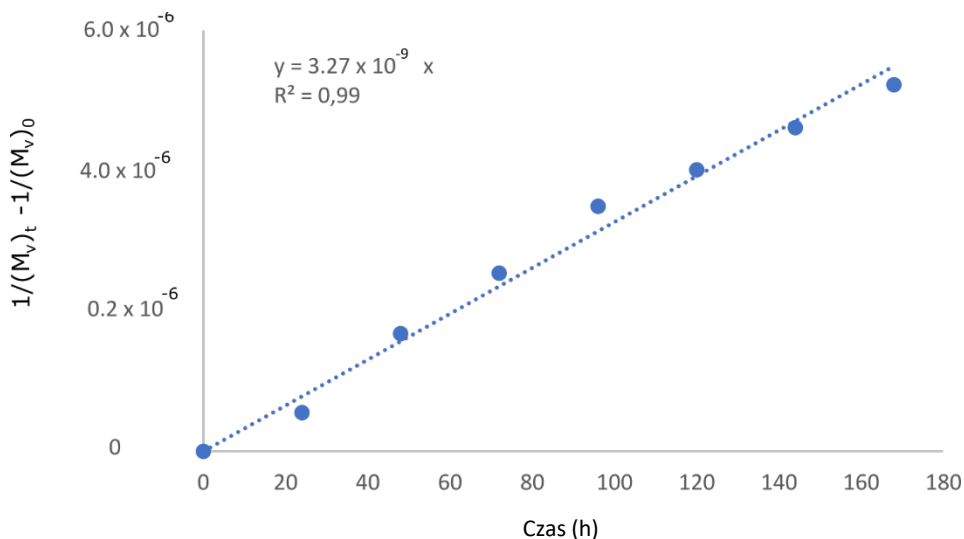
Depolimeryzacja najczęściej przebiega według mechanizmu reakcji pierwszego rzędu. W przypadku, gdy mechanizm jest zgodny z degradacją pierwszego rzędu, równanie kinetyczne jest opisane następującym wzorem.

$$\frac{1}{(M_w)_t} - \frac{1}{(M_w)_{t_0}} = \frac{k}{M} \times t \quad (10)$$

Wykreślając zależność $\frac{1}{(M_w)_t} - \frac{1}{(M_w)_{t_0}}$ w funkcji czasu, można stwierdzić (na podstawie liniowości punktów) zgodność z mechanizmem degradacji opisanym równaniem pierwszego rzędu, przedstawionym w (218). Wartości korelacji przedstawione w tabelach 8 - 10 dodatkowo potwierdzają liniowość funkcji.

Tabela 8. Dane kinetyki degradacji opracowane na podstawie zmian wartości M_v chitozanu rozpuszczonego w odpowiednich kwasach organicznych

Acid	pKa	k (1/h)	Błędy k	R ²
Kwas jabłkowy	3,51	$18,87 \times 10^{-7}$	$5,61 \times 10^{-8}$	0,98
Kwas mrówkowy	3,75	$6,09 \cdot \times 10^{-7}$	$1,30 \times 10^{-8}$	0,99
Kwas mlekowy	3,81	$6,46 \cdot \times 10^{-7}$	$1,06 \times 10^{-8}$	0,99
Kwas octowy	4,76	$5,26 \times 10^{-7}$	$0,75 \times 10^{-8}$	0,99

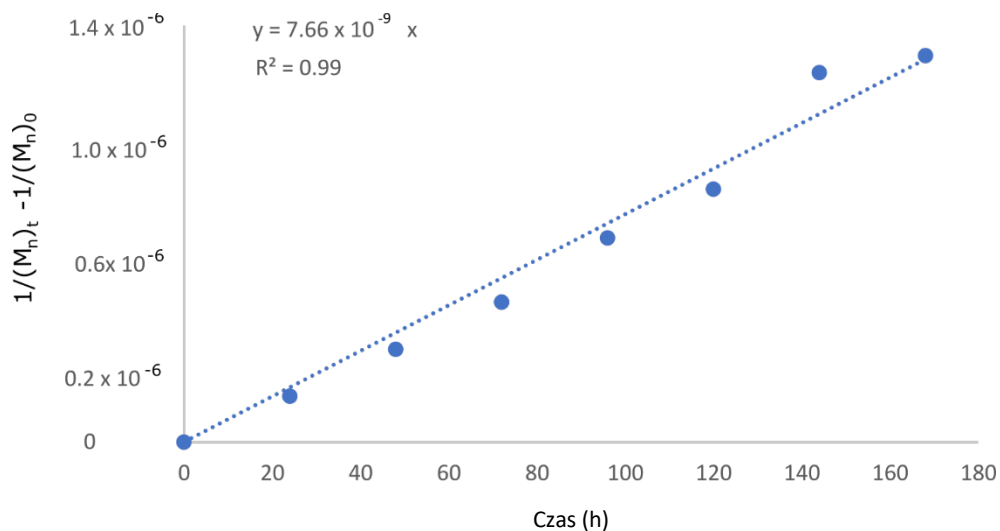


Rysunek 20. Kinetyka degradacji chitozanu w 3% kwasie octowym w 20°C dla zmian wartości M_v

Zależność kinetyczną pierwszego rzędu degradacji chitozanu w 3% kwasie octowym dla zmian wartości M_v przedstawia rysunek 20. Jak widać na przedstawionym wykresie, proces degradacji jest bardzo dobrze odzwierciedlony przez kinetykę pierwszego rzędu.

Tabela 9. Dane kinetyki degradacji opracowane na podstawie wartości zmian wartości M_n chitozanu rozpuszczonego w odpowiednich kwasach organicznych

kwas	pKa	k (1/h)	Błędy k/ M_n	R ²
Kwas jabłkowy	3,51	$31,01 \times 10^{-7}$	$8,51 \times 10^{-8}$	0,99
Kwas mrówkowy	3,75	$14,80 \cdot \times 10^{-7}$	$4,71 \times 10^{-8}$	0,98
Kwas mlekowy	3,81	$28,25 \cdot \times 10^{-7}$	$1,24 \times 10^{-8}$	0,96
Kwas octowy	4,76	$12,33 \cdot \times 10^{-7}$	$2,75 \times 10^{-8}$	0,99

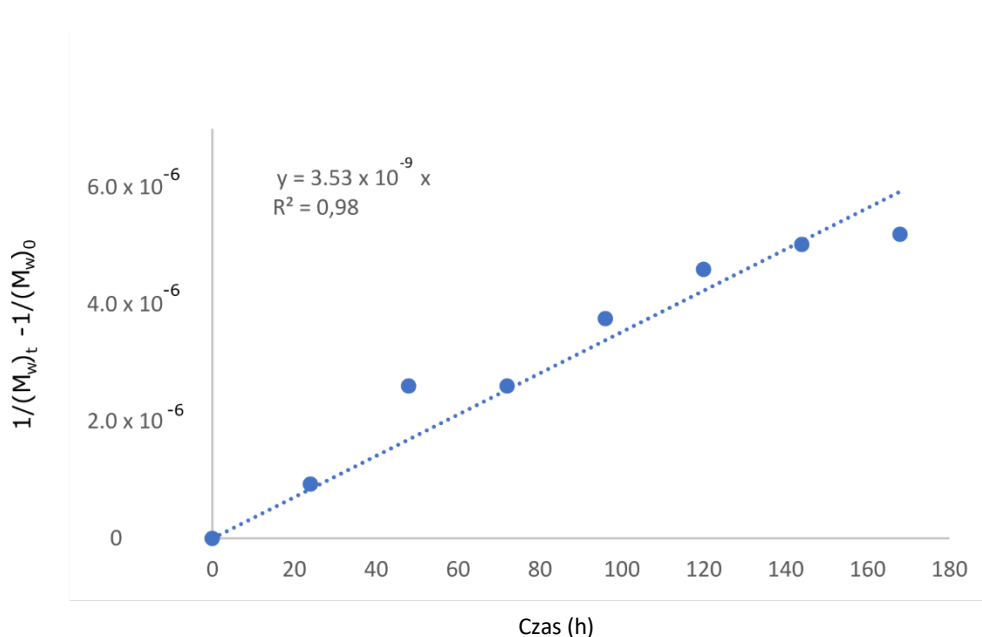


Rysunek 21. Kinetyka degradacji chitozanu w 3% kwasie octowym w 20°C dla zmian wartości M_n

Zależność kinetyczną pierwszego rzędu degradacji chitozanu w 3% kwasie octowym dla zmian wartości M_n przedstawia rysunek 21. Jak widać na przedstawionym wykresie, proces degradacji jest bardzo dobrze odzwierciedlony przez kinetykę pierwszego rzędu.

Tabela 10. Dane kinetyki degradacji opracowane na podstawie wartości Mw.

kwasy	pKa	k (1/h)	Błędy k/M	R ²
Kwas jabłkowy	3,51	14,86 x 10 ⁻⁷	1,93 x 10 ⁻⁸	0,99
Kwas mrówkowy	3,75	6,76 x 10 ⁻⁷	1,17 x 10 ⁻⁸	0,99
Kwas mlekowy	3,81	14,55 x 10 ⁻⁷	4,71 x 10 ⁻⁸	0,98
Kwas octowy	4,76	5,68 x 10 ⁻⁷	1,75 x 10 ⁻⁸	0,98



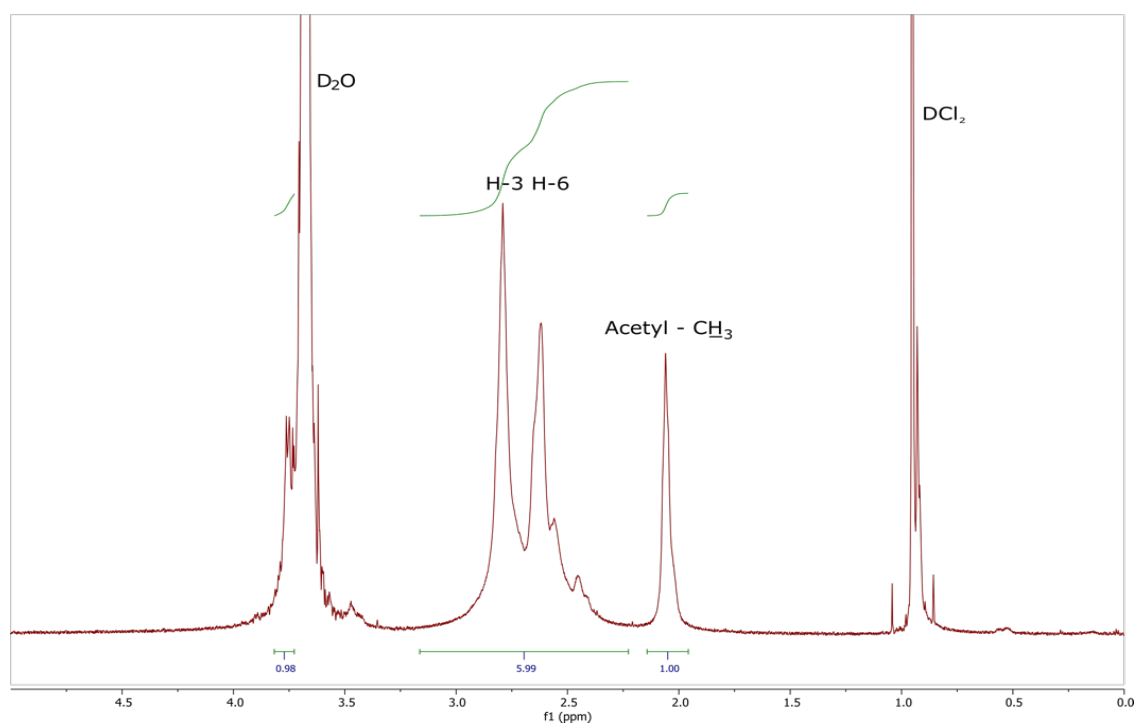
Rysunek 22. Kinetyka degradacji chitozanu w 3% kwasie octowym w 20°C dla zmian wartości Mw

Rysunek 22 przedstawia zależność kinetyczną pierwszego rzędu dla degradacji chitozanu w rozcieńczonym kwasie octowym dla zmian wartości Mw. Jak widać na przedstawionym wykresie, proces degradacji jest bardzo dobrze odzwierciedlony przez kinetykę pierwszego rzędu.

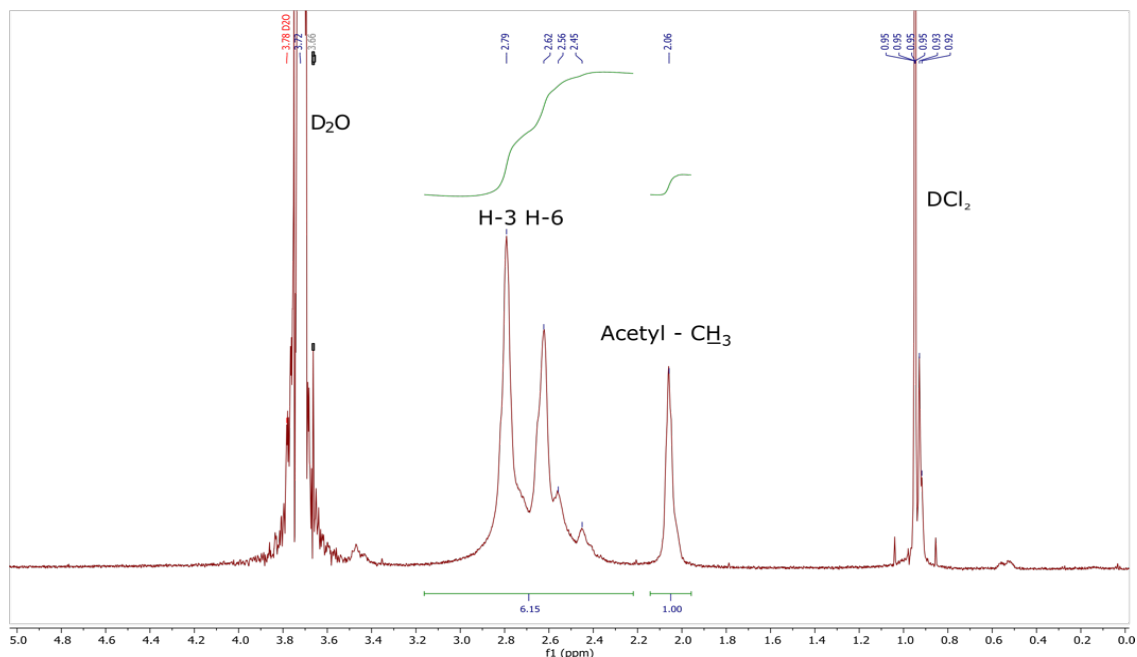
W tabelach 8 - 10 przedstawiono wartość stałej szybkości reakcji degradacji chitozanu w rozcieńczonych kwasach organicznych, wyznaczoną na podstawie zmian odpowiednio M_v , M_n , M_w . Wykresy na rysunkach 20, 21 i 22 przedstawiają kinetykę degradacji chitozanu w kwasie octowym dla parametrów M_v , M_n i M_w . Zgodnie z wykresami, odpowiadają one kinetyce dla I rzędu.

5.1.4. Analiza ^1H NMR

Rysunki 23 i 24 przedstawiają przykładowe widmo ^1H NMR chitozanu przed degradacją i po 168 godzinach degradacji w 3% roztworze kwasu octowego w temperaturze $20\text{ }^\circ\text{C}$.



Rysunek 23. Widmo ^1H NMR chitozanu przed degradacją ($t=0$ min) w rozcieńczonym kwasie octowym w temperaturze $25\text{ }^\circ\text{C}$



Rysunek 24. Widmo ^1H NMR chitozanu degradowanego w rozcieńczonym kwasie octowym (3%) w temperaturze $25\text{ }^\circ\text{C}$ ($t=168\text{ min}$).

Tabela 11. Stopień deacetylacji chitozanu obliczony na podstawie widm ^1H NMR po degradacji w rozcieńczonych kwasach organicznych (5%), temperatura $20\text{ }^\circ\text{C}$, stężenie polimeru 3%.

Nazwa próbki	Stopień deacetylacji [%]	
	0 (h)	168 (h)
Kwas octowy	72,2	72,9
Kwas mlekowy	72,9	71,6
Kwas mrówkowy	72,2	72,2
Kwas jabłkowy	72,2	71,1

Wyznaczony stopień deacetylacji chitozanów, na podstawie widm ^1H NMR (przykładowo rysunek 23, 24), poddanych procesowi degradacji w rozcieńczonych kwasach organicznych (tabela 11) pokazuje, że nie ulega on zmianom w sposób znaczący. Brak pojawienia się nowych sygnałów na widmach ^1H NMR chitozanów np. protonów grupy aldehydowej potwierdza, że reakcja degradacji prawdopodobnie następuje poprzez zerwanie wiązań β -1,4-glikozydowych.

5.2. Wyniki pomiarów przeciwdrobnoustrojowych włókien chitozanowych w różnych kwasach

5.2.1. Objętość retencji kwasu dla próbek włókien chitozanu

W celu określenia ilości przyłączonych grup kwasowych (odpowiadających ilości grup amonowych utworzonych w chitozanie) zastosowano metodę miareczkowania odwrotnego (kwasowo-zasadowego). Roztwory 0,1 M HCl i 0,1 M NaOH zostały użyte odpowiednio jako titrant i jako substancja zobojętniająca cząsteczki kwasu biorących udział w tworzeniu soli chitozanu. Dodatkowo dla modyfikowanych materiałów chitozanowych zmierzono objętość retencji. Tabele 12-14 przedstawiają tylko wyniki dla pochodnych chitozanu, dla których wzrost kolonii był ograniczony lub nieobecny.

Tabela 12. Objętość retencji kwasu włókien chitozanowych modyfikowanych w atmosferze nasyconej pary kwasu HCl i CH₃COOH

Czas inkubacji materiału chitozanowego w atmosferze nasyconej pary kwasu [min]	Objętość retencji (%) po obróbce nasyconymi parami HCl	Objętość retencji (%) po obróbce nasyconymi parami CH₃COOH
15	93	92
60	86	87
120	85	88

Po 15 minutach działania nasyconej pary kwasu octowego i solnego obserwuje się, iż wartość objętości retencji dla octanu chitozanu i chlorowodoru chitozanu wynosiła powyżej 90% dla wszystkich badanych włókien chitozanowych (Tabela 1). Dla chlorowodoru chitozanu objętość retencji wynosiła 93%, a dla octanu chitozanu 92%. Po 120 minutach objętość retencji była niższa dla chitozanu modyfikowanego chlorowodorem (85%) niż dla chitozanu modyfikowanym parami nasyconymi kwasu octowego (88%).

Na podstawie danych z tabeli 12 można stwierdzić, że w początkowym okresie procesu modyfikacji przeważał proces sorpcji powierzchniowej i związany z nim chwilowy wzrost ilości zaadsorbowanego kwasu. Po upływie 60 min nastąpił nieznaczny spadek ilości zaadsorbowanego kwasu, którego zawartość po tym okresie się ustabilizowała. Może to być związane z ustanowieniem się stanu równowagi pomiędzy procesami sorpcji i desorpcji cząsteczek kwasu.

Tabela 13. Objętość retencji modyfikowanych włókien chitozanowych po obróbce w roztworach kwasu octowego w etanolu - procedura bez płukania

Próbka	Objętość retencji (%)
5/10	88
5/20	81
5/30	82
5/40	80
5/50	87
5/60	89
Próbka	Objętość retencji (%)
10/10	95
10/20	92
10/30	90
10/40	93
10/50	93
10/60	95
Próbka	Objętość retencji (%)
15/10	92
15/20	93
15/30	94
15/40	93
15/50	94
15/60	94

gdzie:

Cyfry 5,10,15 - stężenie kwasu octowego w etanolu;

Cyfry od 10 do 60 - czas obróbki (min) włókien w kąpeli kwasu octowego w etanolu.

Tabela 14. Objętość retencji modyfikowanych włókien chitozanowych po obróbce w roztworach kwasu octowego i etanolu - procedura z płukaniem.

Próbka	Objętość retencji (%)
5/10	85
5/20	86
5/30	88
5/40	90
5/50	92
5/60	91
Próbka	Objętość retencji (%)
10/10	86
10/20	85
10/30	84
10/40	89
10/50	91
10/60	92
Próbka	Objętość retencji (%)
15/10	90
15/20	86
15/30	88
15/40	89
15/50	91
15/60	92

gdzie:

Cyfry 5,10,15 - stężenie kwasu octowego w etanolu;

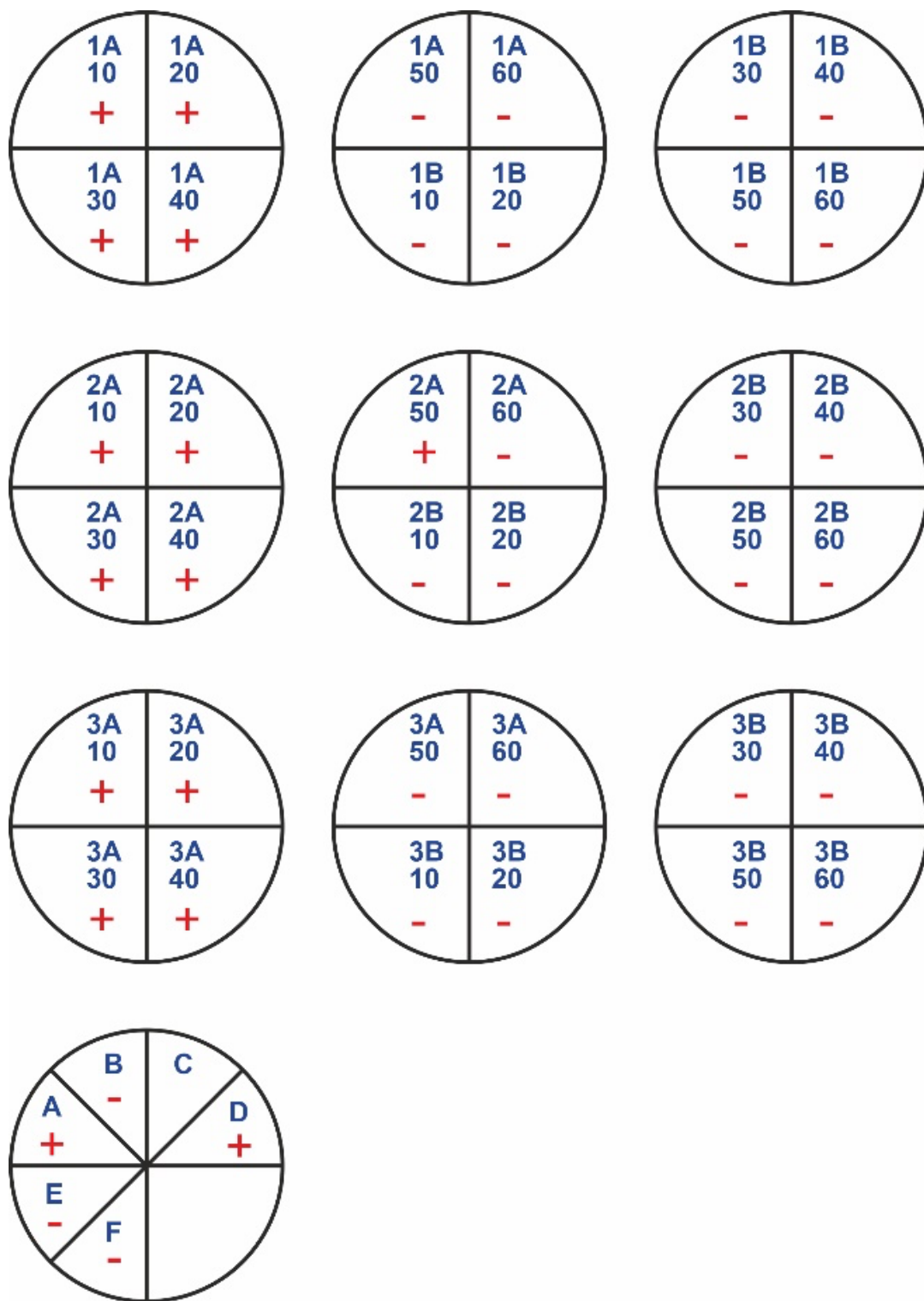
Cyfry od 10 do 60 - czas obróbki (min) włókien w kąpeli kwasu octowego w etanolu.

Dane przedstawione w tabeli 13 pokazują, że wielkości retencji octanu chitozanu wynosiły od 80% do 94% dla wszystkich roztworów kwasu w etanolu i różnych czasów obróbki, w procedurze bez płukania próbek. Najwyższą wartość retencji uzyskano dla próbek poddanych obróbce 10% roztworu kwasu octowego w etanolu i czasu obróbki 60 min, a najniższą wartość w przypadku zastosowania 5% roztworu CH_3COOH w etanolu i czasu obróbki 20 min.

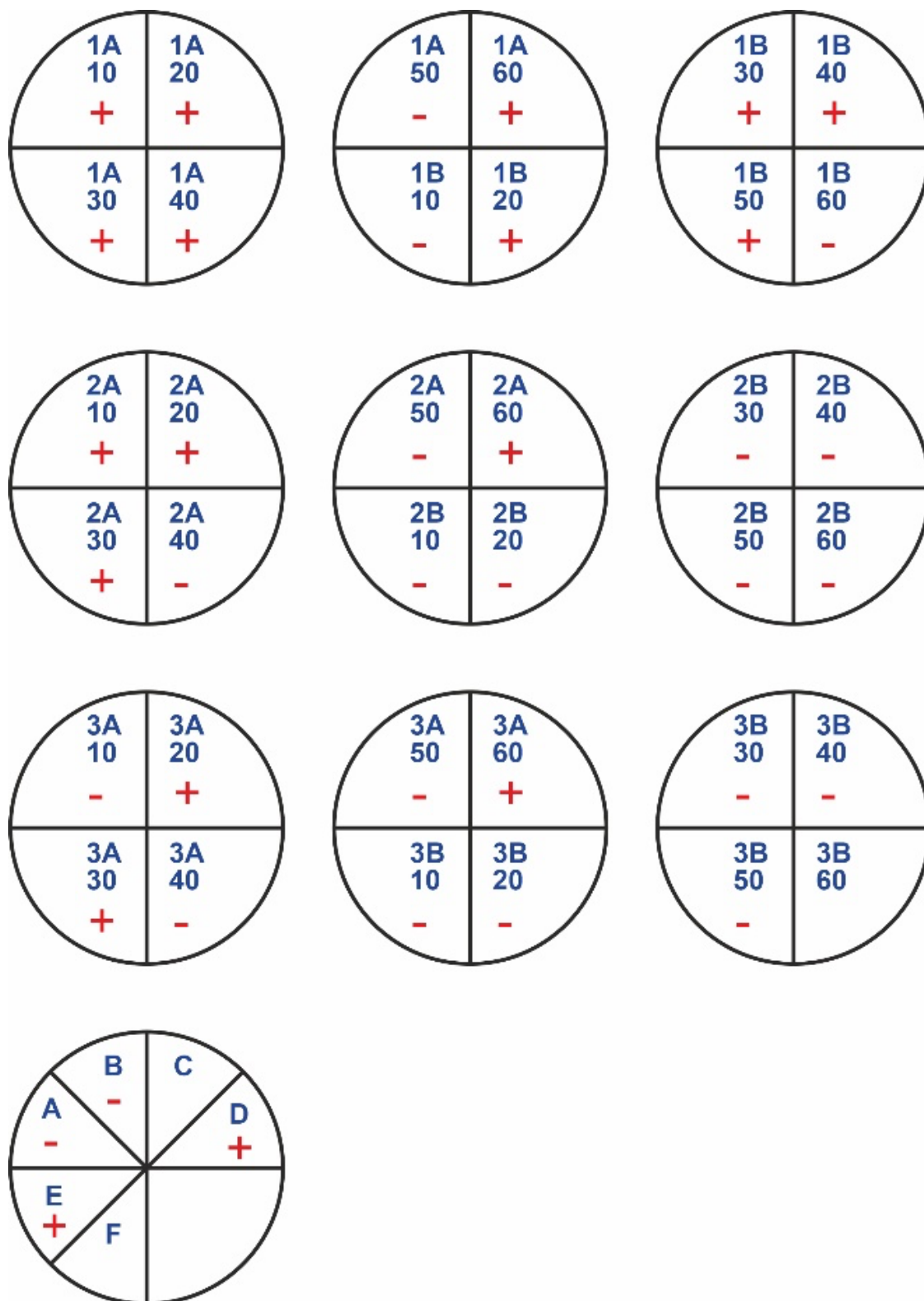
Tabela 14. przedstawia objętość retencji octanu chitozanu otrzymanego w wyniku obróbki kwasem octowym i etanolem z procedurą płukania końcowego. Wartości objętości retencji octanu chitozanu po płukaniu próbek są nieco niższe w porównaniu z metodą bez płukania końcowego. Uzyskane wartości wynosiły powyżej 80%. Najwyższe wskaźniki retencji były w przypadku zastosowania 10% i 15% roztworów CH₃COOH przez 60 min.

5.2.2. Badania mikrobiologiczne i wpływ modyfikowanych materiałów chitozanowych na proces hemolizy i toksyczność dla ludzkich krwinek czerwonych

Podczas badań zastosowano metodę przesiewową w celu wytypowania zmodyfikowanych włókien o najlepszych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Fragmenty włókien nie były dodatkowo sterylizowane. Próbki umieszczano w płynnych pożywkach dla grzybów lub bakterii. Umożliwiło to określenie, czy badane materiały były podatne na kolonizację przez mikroorganizmy. Po 24 godzinach inkubacji próbki zostały wysiane na stałe podłoże.



Rysunek 25. Schemat badań wzrostu bakterii Gram-dodatnich i Gram ujemnych w pożywce (MHA) na włókninach chitozanu



Rysunek 26. Schemat badań wzrostu grzybów w pożywce (SDA) na włókninach chitozanu

Na rysunkach 25 i 26 symbol "+" oznacza, że zaobserwowano wzrost bakterii/grzybów. Mueller Hinton Agar (MHA) był podłożem stosowanym dla bakterii, natomiast w przypadku grzybów jako podłoże zastosowano agar Sabourauda (SDA). Literą A oznaczono próbki włókniny z płukaniem. Literą B oznaczono próbki włókniny bez płukania. Próbki włókniny 1, 2 i 3 odpowiadają materiałom poddanym działaniu 5%, 10% i 15% kwasu octowego w etanolu. Liczby 10-60 odnoszą się do czasów obróbki od 10 do 60 min. Najbardziej obiecujące wyniki uzyskano dla próbek bez płukania, a także dla próbek z płukaniem, ale dłuższym czasem obróbki (50 min lub 60 min). Zauważono, że próbka chlorowodoru chitozanu uległa natychmiastowemu rozpuszczeniu w ciekłym medium.

Ostatnie dwa okręgi z oznaczeniami od A do F na rys. 25 i 26 przedstawiają wyniki przeciwdrobnoustrojowego działania materiałów na bazie chitozanu poddanych działaniu nasyconych par różnych kwasów, wyniki są przedstawione w tabeli 15.

Tabela 15. Opisy symboli opisujące próbki na testowanych płytkach Petriego

Symbol na okręgu	Atmosfera kwasu
A	kwas walerianowy
B	kwas propionowy
C	kwas mrówkowy
D	kwas masłowy
E	kwas solny
F	kwas octowy

Aktywność wobec bakterii odnotowano dla próbek włókien chitozanu modyfikowanych w atmosferze nasyconych par kwasu bez procesu płukania. Dla próbki włókniny chitozanu niemodyfikowanej na drodze oddziaływania nasyconej pary kwasu zaobserwowano wzrost organizmów świadczący o braku właściwości przeciwbakteryjnej niemodyfikowanego chitozanu.

Tabela 16. Wpływ modyfikacji włókien chitozanu roztworem kwasu octowego w etanolu bez płukania końcowego na wzrost drobnoustrojów *S. aureus* i *E. coli*

Próbka	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922
5/10	Wzrost	Wzrost
5/20	Wzrost	Wzrost
5/30	Wzrost	Wzrost
5/40	Wzrost	Wzrost
5/50	Wzrost	Wzrost
5/60	Wzrost	Wzrost
10/10	Wzrost: widoczna redukcja wzrostu	Wzrost
10/20	Wzrost: 170* kolonii	Wzrost
10/30	Wzrost	Brak wzrostu
10/40	Wzrost: 70* kolonii	Wzrost
10/50	Wzrost: redukcja	Wzrost
10/60	Brak wzrostu	Wzrost
15/10	Wzrost: 14* kolonii	Wzrost
15/20	Wzrost: 12* kolonii	Wzrost
15/30	Wzrost: 30* kolonii	Brak wzrostu
15/40	Brak wzrostu	Brak wzrostu
15/50	Wzrost: 9* kolonii	Brak wzrostu
15/60	Brak wzrostu	Brak wzrostu

* - średnia wartość z 3 powtórzeń

Tabela 17. Wpływ modyfikacji włókien chitozanu modyfikowanych nasyconymi parami różnych kwasów bez płukania końcowego na wzrost drobnoustrojów *S. aureus* i *E. coli*

Próbka	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922
Kwas walerianowy	Wzrost	Wzrost
Kwas propionowy	Wzrost	Wzrost
Kwas mrówkowy	Wzrost: 5* kolonii	Wzrost
Kwas masłowy	Wzrost	Wzrost
Kwas chlorowodorowy	Brak wzrostu	Brak wzrostu
Kwas octowy	Brak wzrostu	Brak wzrostu

* - średnia wartość z 3 powtórzeń

W tabeli 16 przedstawiono wpływ modyfikacji włókien chitozanowych roztworem kwasu octowego w etanolu bez płukania końcowego na wzrost drobnoustrojów *S. aureus* i *E. coli*. W 10% roztworze kwasu octowego w etanolu aktywność zmodyfikowanych włókien chitozanowych wzrosła wobec komórek bakterii *S. aureus* (zmniejszenie liczby kolonii bakterii lub brak wzrostu). Nie zaobserwowano zmniejszenia wzrostu szczepu *E. coli* dla innych modyfikatorów niż kwas octowy i kwas chlorowodowy. Dla włókien chitozanowych modyfikowanych nasyconymi parami kwasów organicznych: kwas mrówkowy, propionowy, kwas masłowy i kwas walerianowy nie zaobserwowano działania biobójczego (Tabela 17).

W tabeli 18 przedstawiono wyniki badania toksyczności próbek włókien chitozanowych modyfikowanych roztworem kwasu octowego w etanolu poddawanych płukaniu końcowemu w czystym etanolu oraz bez procedury płukania końcowego.

Tabela 18. Toksyczność dla ludzkich krwinek czerwonych mierzona jako % hemolizy włókien modyfikowanych przy użyciu roztworu kwasu octowego w etanolu - procedury bez płukania i z płukaniem

Próbki	% hemolizy w próbkach “płukanych”	% hemolizy w próbkach “niepłukanych”
5/10	0,24	0,09
5/20	0,45	1,17
5/30	0,80	1,52
5/40	0,36	2,70
5/50	0,13	1,28
5/60	0,54	0,46
10/10	0,00	14,34
10/20	0,26	3,59
10/30	0,16	14,24
10/40	0,00	17,51
10/50	0,65	15,36
10/60	0,82	14,88
15/10	0,47	10,09
15/20	0,26	1,12
15/30	0,55	13,21
15/40	0,16	16,99
15/50	2,01	14,78
15/60	3,21	20,87

W tabeli 19 przedstawiono % hemolizy dla próbek włókien chitozanu poddanych obróbce nasyconymi parami kwasów organicznych.

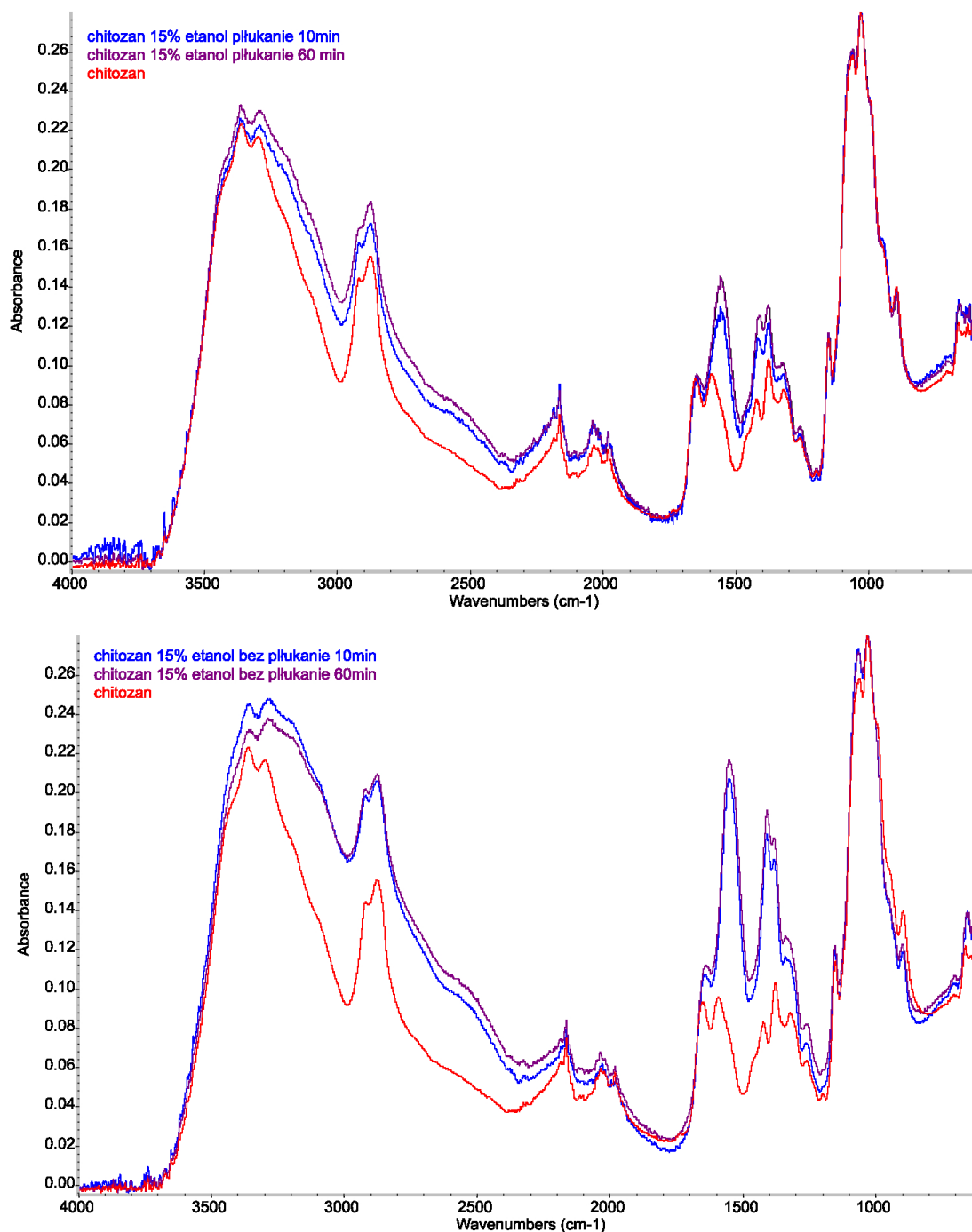
Tabela 19. Toksyczność dla ludzkich czerwonych krwinek mierzona jako % hemolizy w włókninach modyfikowanych oparami różnych kwasów (otrzymywanie zmodyfikowanych materiałów w warunkach gazowania).

Kwasy	% Hemoliza
Kwas walerianowy	0,00
Kwas propionowy	0,26
Kwas mrówkowy	0,00
Kwas masłowy	1,04
Kwas chlorowodorowy	0,88
Kwas octowy	21,18

Całkowity brak hemolizy odnotowano w przypadku materiałów modyfikowanych kwasem walerianowym i kwasem mrówkowym. Hemolizy nie zaobserwowano w niemodyfikowanej próbce włókniny chitozanowej niepoddanej modyfikacji. Włókniny modyfikowane kwasem octowym w roztworze etanolu, płukane końcowo za pomocą etanolu, wykazywały znacznie mniejszy wpływ na hemolizę w porównaniu do próbek niepłukanych (Tabela 18). Cytotoksyczność odnotowano dla próbek modyfikowanych kwasem masłowym, kwasem solnym i kwasem octowym. Najwyższą toksyczność (21,18%) zaobserwowano w przypadku obróbki nasyconymi parami kwasu octowego (Tabela 19).

5.2.3. Analiza struktury chemicznej otrzymanych soli chitozanu w oparciu o FTIR ATR

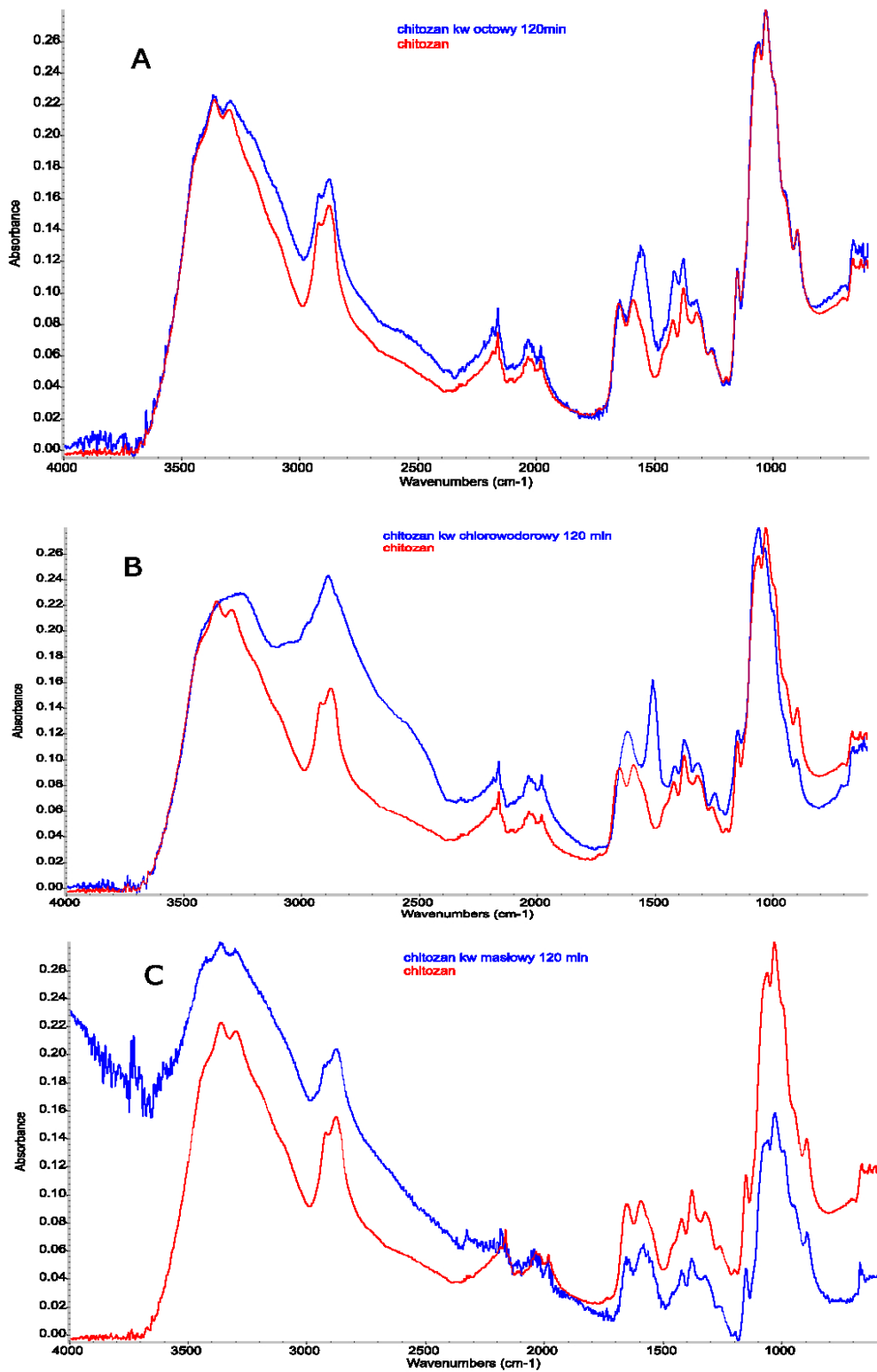
Zmiany w strukturze chemicznej próbek analizowano na podstawie widm spektroskopii FTIR ATR.



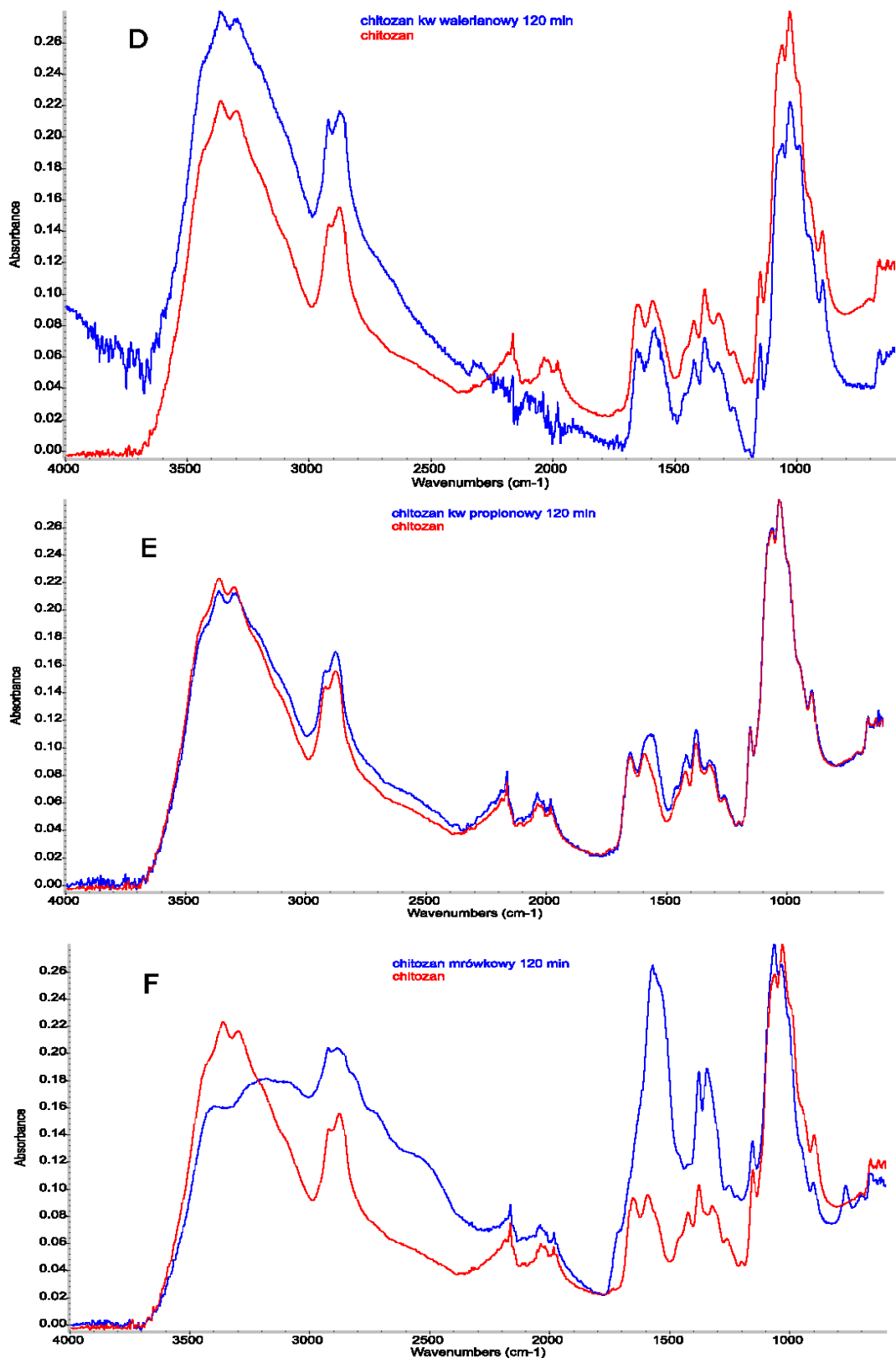
Rysunek 27. Przykładowe widma FTIR ATR dla włókniny chitozanowej poddanej działaniu roztworu kwasu octowego w etanolu poddanych procesowi płukania czystym etanolem i bez płukania końcowego

Na widmie FTIR -ATR wyjściowego chitozanu przedstawionym na rysunku 27 widoczne są charakterystyczne piki tego polimeru, ostry pik przy maksimum 564 cm^{-1} (drżania zginające poza płaszczyznę wiązań w grupie NH, drżania zginające poza płaszczyznę wiązanie C-O), 711 cm^{-1} (drżania zginające poza płaszczyznę wiązanie NH), 1174 cm^{-1} (drżania rozciągające wiązanie w grupie C-O-C), 2871 cm^{-1} (drżania rozciągające wiązania w grupie CH₂) i 3430 cm^{-1} (drżania rozciągające w wiązania w grupie -OH). Wibracje drgań rozciągające wiązań w grupie amidu C=O zaobserwowano przy maksimum przy 1650 i 1590 cm^{-1} .

Widma próbek włókien chitozanowych poddanych działaniu kwasu octowego w etanolu poddanych procesowi płukania czystym etanolem jak i bez płukania końcowego przedstawiono na rysunku 27. Na podstawie tych widm obliczono stopień deacetylacji stosując równania (4) i (5) zaproponowane przez Czechowską-Biskup (215). Zgodnie z pierwszym równaniem stopień deacetylacji wynosił DDA + 87%, a zgodnie z drugim równaniem DDA = 89,7%.



Rysunek 28 Przykładowe widma FTIR ATR dla włókniny poddanej działaniu nasyconych par kwasów: octowego (A), chlorowodorowego (B) i masłowego (C)



Rysunek 29 Przykładowe widma FTIR ATR dla włókniny poddanej działaniu nasyconych par kwasów: walerianowego (D), propionowego (E) i mrówkowego (F)

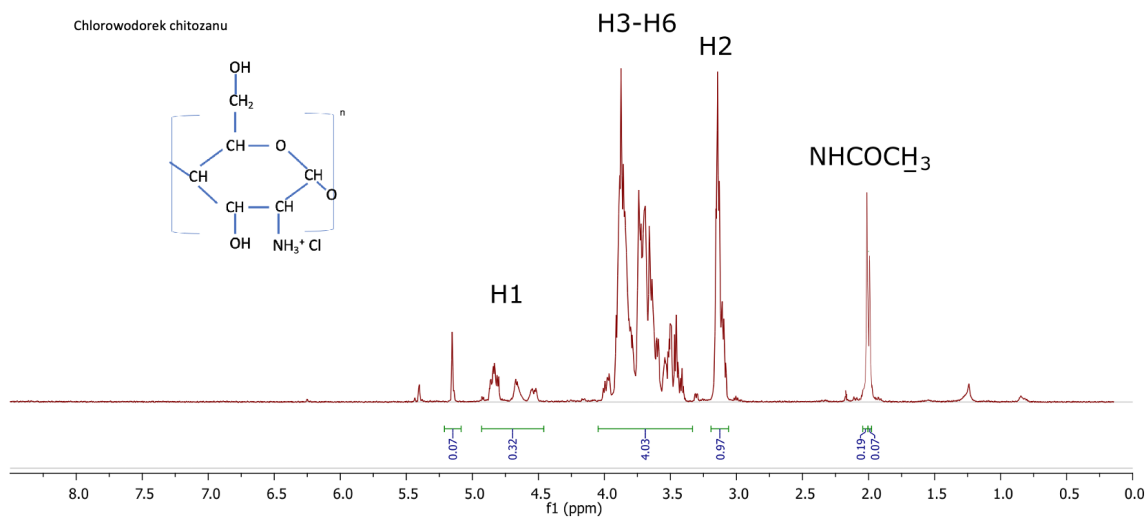
Zmiany w strukturze chemicznej próbek włókien poddanych modyfikacji w atmosferze nasyconej par kwasów organicznych analizowano na podstawie zmian w widmach FTIR-ATR (rysunek 28 i 29). Dodatkowo dla analizowanych próbek określono zmiany stopnia deacetylacji dla badanych próbek.

Jak widać na przedstawionych widmach FTIR-ATR, istnieją różnice potwierdzające powstawanie pochodnej chitozanu, w postaci soli kwasu octowego, po 10-60 min ekspozycji na kwas organiczny w fazie gazowej. Występuje silny sygnał dla grup karboksylowych, z maksimami przy 1550 cm^{-1} i 1400 cm^{-1} . Adsorpcja kwasu octowego na powierzchni włókniiny chitozanowej w postaci gazowej może zachodzić w wyniku oddziaływania wiązań wodorowych między grupami hydroksylowymi chitozanu i grupą karboksylową kwasu octowego. Po 1 h ekspozycji na nasycone pary kwasu octowego pojawiają się nowe piki w zakresie 1600 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} , w wyniku tworzenia się grup soli amoniowej chitozanu i kwasu octowego. Występują silne sygnały dla grup karboksylowych, z maksimami przy 1549 i 1405 cm^{-1} . Pojawienie się sygnału z maksimum przy 1549 cm^{-1} świadczy o powstawaniu soli amoniowej chitozanu i kwasu octowego. Sygnały zlokalizowane w zakresie $1410\text{-}1340\text{ cm}^{-1}$ są wynikiem występowania drgań rozciągających wiązania COO- w resztach kwasowych przyłączonego kwasu octowego.

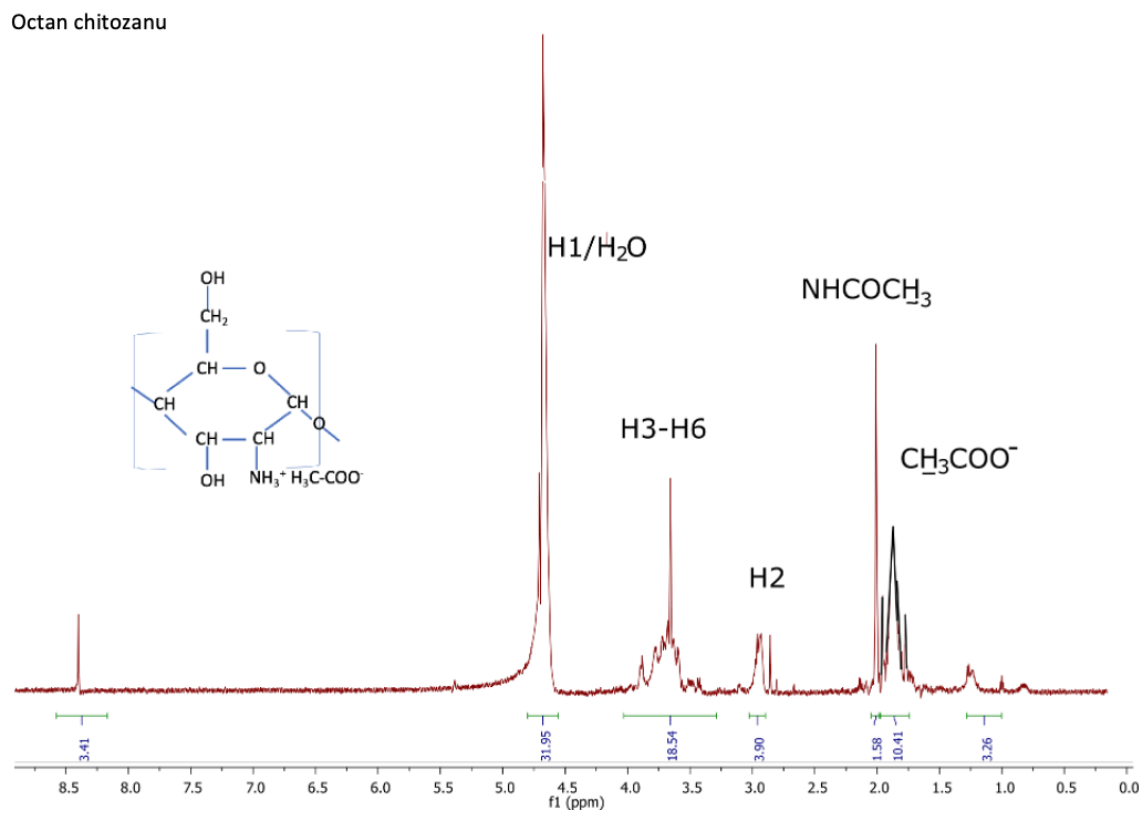
Widma FTIR-ATR przedstawione na rysunkach 28 i 29 dla pozostałych modyfikacji materiału badawczego nasyconymi parami kwasów potwierdziły powstanie soli chitozanowych. Największą różnicę zauważano dla obróbki kwasem mrówkowym, gdzie w paśmie z maksimum przy 1200cm^{-1} i 1690 cm^{-1} widać nakładanie się pików o dużej intensywności pochodzących od kwasu mrówkowego (F).

5.2.4. Analiza $^1\text{H-NMR}$ soli chitozanu i kwasu chlorowodorowego i octowego

Na rysunkach 30 i 31 przedstawione są przykładowe widma $^1\text{H-NMR}$ soli chitozanu i kwasu chlorowodorowego oraz soli chitozanu i kwasu octowego otrzymanych w wyniku obróbki włókniiny chitozanowej z nasyconymi parami odpowiedniego kwasu.



Rysunek 30. Widmo ¹H-NMR soli chitozanu i kwasu chlorowodorowego (chlorowodoru chitozanu)



Rysunek 31. Widmo ¹H-NMR soli chitozanu i kwasu octowego (octanu chitozanu)

Na widmie $^1\text{H-NMR}$ chlorowodoru chitozanu (rysunek 30) widoczne są następujące sygnały protonów: w zakresie 1,8-2,3 ppm protony grupy acetamidowej NHOCCH_3 , 3,1-3,2 ppm protony związane z drugim węglem pierścienia cukrowego (H2), w zakresie 3,3-4,1 ppm protony związane z węglami (C3-C6) pierścienia cukrowego (H3-H6), w zakresie 4,4-4,9 ppm proton związany z pierwszym węglem pierścienia cukrowego (H1).

Na widmie $^1\text{H NMR}$ octanu chitozanu (rysunek 31) widoczne są następujące sygnały protonowe: w zakresie 1,6-1,8 ppm dla protonów soli kwasu octowego $-\text{OOCCH}_3$; w zakresie 1,8-2,1 ppm dla protonów grupy acetamidowej NHOCCH_3 ; 2,8-3. 1 ppm dla protonów związanych z drugim węglem pierścienia cukrowego (H2); w zakresie 3,3-4,1 dla protonów związanych z węglami (C3-C6) pierścienia cukrowego (H3-H6); w zakresie 4,6-4,8 dla protonów związanych z pierwszym węglem pierścienia cukrowego (H1), który pokrywa się z resztami H_2O .

Jak widać z widm $^1\text{H-NMR}$ dla soli chlorowodoru chitozanu o dobrych właściwościach antybakteryjnych (Rysunek 30), nie obserwuje się dodatkowego sygnału protonu pochodzącego od kwasu HCl . Sygnał protonu soli HCl chitozanu pokrywa się z resztkowymi protonami obecnymi w rozpuszczalniku DCl .

Na rysunku 31 w widmie $^1\text{H-NMR}$ soli octanu chitozanu, widoczny jest wyraźny sygnał protonu reszty kwasowej CH_3COO . Pole pod powierzchnią sygnału protonów grupy CH_3 kwasu octowego wykorzystano do obliczenia stopnia podstawienia. Wyniki obliczeń przedstawiono w tabeli 20. Dodatkowo zamieszczono w celach porównawczych wartości stopnia podstawienia obliczone na podstawie analizy miareczkowej.

Tabela 20. Stopień podstawienia dla soli chitozanu, obliczony na podstawie widm ¹H-NMR i analizy miareczkowej

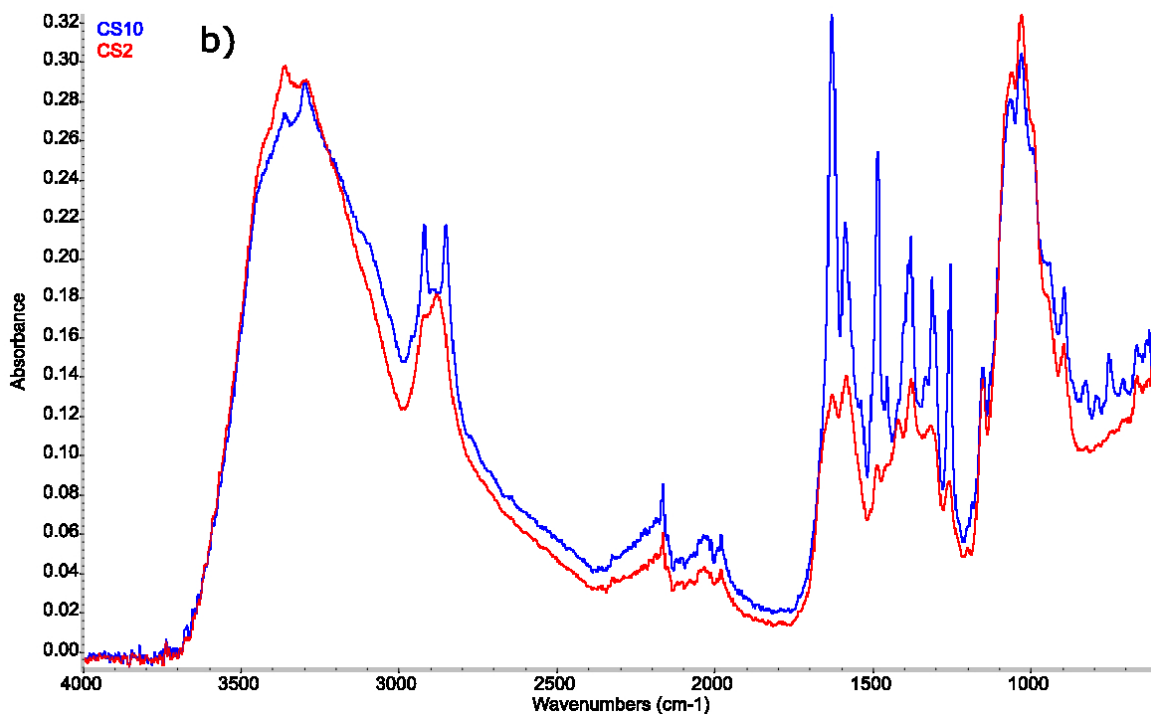
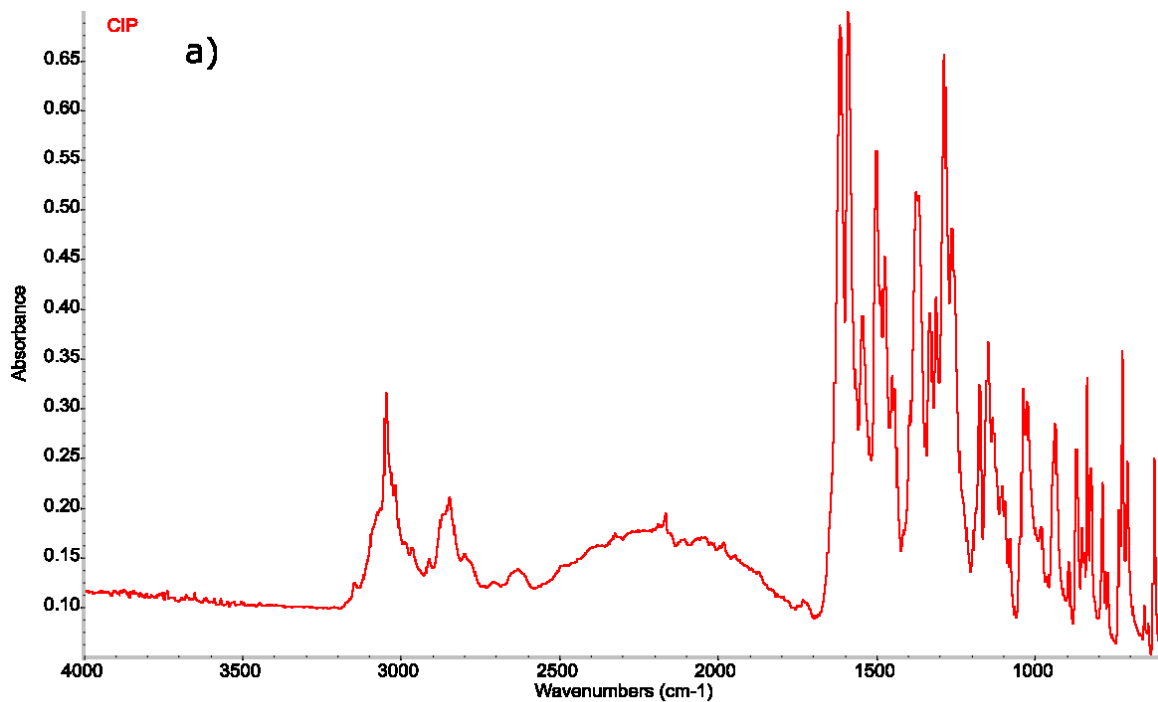
Próbka	Stopień podstawienia obliczony na podstawie ¹ H-NMR [%]	Stopień podstawienia obliczony na podstawie miareczkowania [%]
Chlorowodorek chitozanu	-	85
Octan chitozanu	88,0	89

Jak można odczytać z tabeli 20 zarówno dla metody ¹H-NMR jak i metody odwróconego miareczkowania konduktometrycznego otrzymano podobnie wyniki w przypadku octanu chitozanu. Z uwagi na stosowanie do ¹H-NMR DCL deuterowanego chlorowodoru nie ma możliwości odczytania pola powierzchni pochodzącego od protonu HCl z uwagi na to, że sygnał protonowy wodoru soli chlorowodoru chitozanu pokrywa się z protonami DCl.

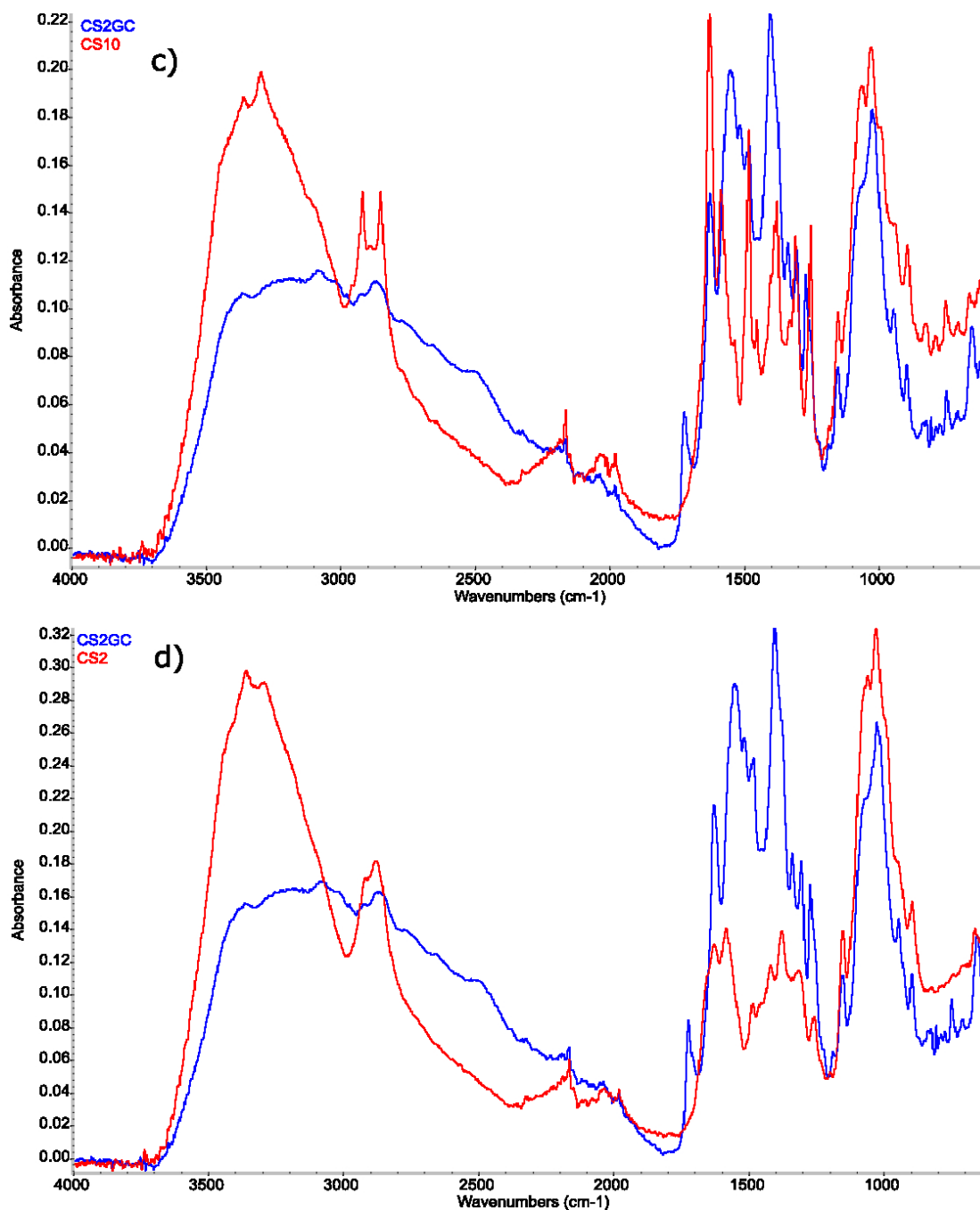
5.3. Wyniki pomiarów przeciwdrobnoustrojowych folii chitozanu z adduktem ciprofloksacyny

5.3.1. Analiza otrzymanych folii soli chitozanu w oparciu o widma FTIR ATR

W pierwszym etapie badań podjęto próbę sprawdzenia, czy modyfikacja folii chitozanowej za pomocą ciprofloksacyny (addukt fizyczny CS-CIP) i dodatkową obróbką nasyconą parą kwasu octowego skutkuje uzyskaniem nowej aktywnej pochodnej chitozanu. Przygotowane materiały poddano badaniu metodą FTIR-ATR. Poniżej przedstawiono przykładowe widma niemodyfikowanego chitozanu, chitozanu modyfikowanego ciprofloksacyną fizyczne addukty CS-CIP oraz fizycznych adduktów CS-CIP dodatkowo poddanych działaniu oparów kwasu octowego (rysunek 32 i 33).



Rysunek 32. Widma FTIR-ATR folii chitozanych modyfikowanych adduktami fizycznymi CS-CIP i dodatkowo poddanych obróbce nasyconą parą kwasu octowego. a) CIP, b) nałożone widma niezmodyfikowanego CS (CS2) i adduktu fizycznego CS-CIP (CS10)



Rysunek 33. Widma FTIR-ATR folii chitozanowych modyfikowanych adduktami fizycznymi CS-CIP i dodatkowo traktowanych parami kwasu octowego. c) nałożone widma CS10 i CSGC dodatkowo poddanych obróbce nasyconą parą kwasu octowego, d) nałożone widma CS2 (niezmodyfikowanego) i CS2GC dodatkowo poddanych obróbce nasyconą parą kwasu octowego i ciprofloksacyny.

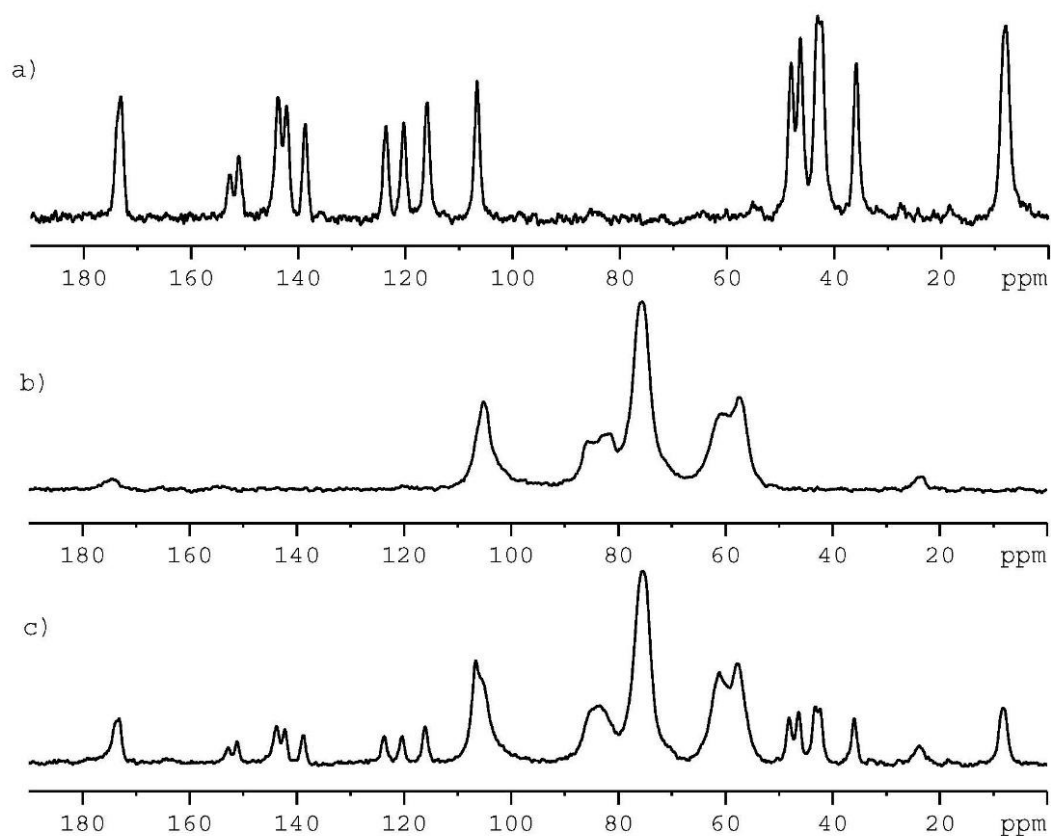
Porównując widma FTIR-ATR niezmodyfikowanych filmów chitozanu (CS) i fizycznego adduktu ciprofloksacyny do chitozanu w postaci filmu (CS-CIP) można zaobserwować zmiany w intensywności charakterystycznych sygnałów CS, co sugeruje, że CIP została utrwalona na powierzchni poprzez oddziaływania międzycząsteczkowe. Zaobserwowano przesunięcie sygnałów w zakresie $1700-1200\text{ cm}^{-1}$, co jest zgodne z danymi literaturowymi Durgapal oraz Singh (225,226) od dla nanocząstek chitozanu zawierających ciprofloksacynę.

Zmiany w widmach FTIR ATR niezmodyfikowanego chitozanu (CS2) i fizycznego adduktu CS-CIP (CS10) dodatkowo poddanego działaniu par kwasu octowego są widoczne w zakresie $1800-1700\text{ cm}^{-1}$, co wskazuje na tworzenie się niewielkich ilości octanu chitozanu na powierzchni. Dodatkowo widoczne są zmiany intensywności sygnału w zakresie $1707-1040\text{ cm}^{-1}$ (227,228), co ilustruje, że CIP i pozostałości kwasu octowego są obecne w powierzchniowych warstwach dysków CS.

Zestawiając widma FTIR ATR folii CS inkubowanej z roztworem CIP (CS10) z folią CS utworzoną przez obróbkę roztworem CIP i następczą obróbkę nasyconą parą kwasu octowego (CS2GC), można zaobserwować poszerzenie sygnałów charakterystycznych dla CS, co może być wynikiem nakładania się sygnałów CIP, octanu chitozanu i CS. Intensywność sygnałów octanu chitozanu w widmie FTIR-ATR jest dominująca w tym widmie, jak pokazano na rysunku 1c, co jest prawdopodobnie wynikiem zachodzącej reakcji między wolnymi grupami aminowymi chitozanu z kwasem octowym.

5.3.2. Badania NMR ciała stałego adduktu ciprofloksacyny do chitozanu

Badania NMR ciała stałego adduktu ciprofloksacyny do chitozanu rozpoczęto od analizy ^{13}C CP/MAS (cross-polarization magic angle spinning) poszczególnych składników, które posłużyły do przygotowania fizycznego adduktu CS-CIP w postaci filmu.



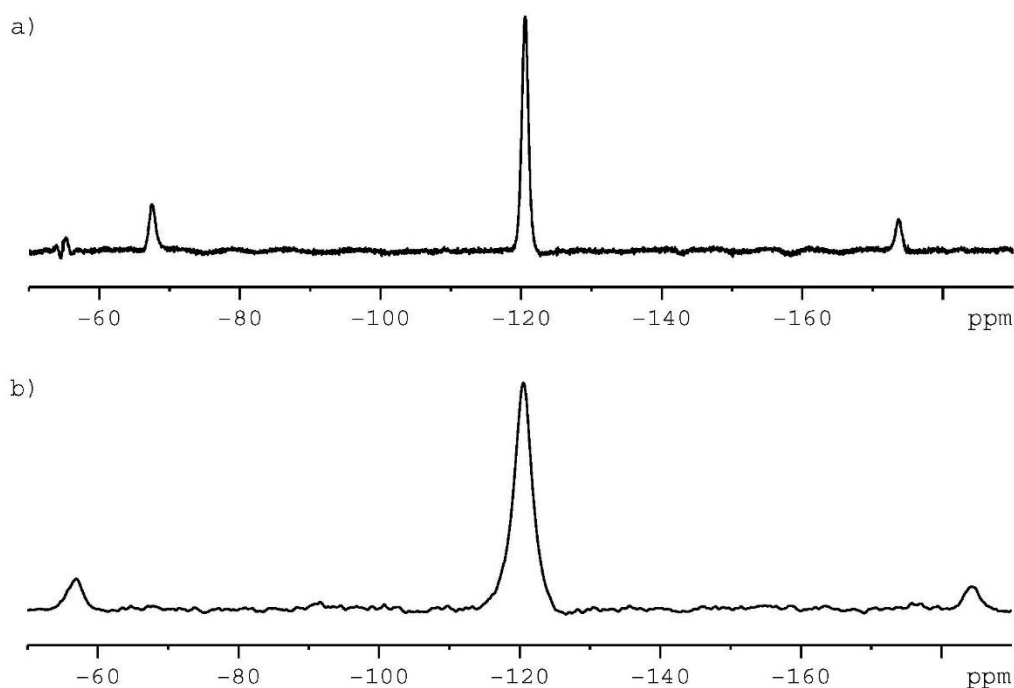
Rysunek 34. Widma 100 MHz ^{13}C CP/MAS NMR dla a) czystego krystalicznego CIP, b) CS, c) fizycznej mieszaniny CIP i CS w stosunku molowym 1:1. Wszystkie widma zarejestrowano przy szybkości wirowania 8 kHz w temperaturze otoczenia.

Rysunek 34a przedstawia widmo 100 MHz ^{13}C CP/MAS CIP zarejestrowane przy częstotliwości wirowania 8 kHz. Z wcześniejszych badań wiadomo, że CIP występuje w różnych formach krystalograficznych: jako kryształy bezwodne i jako dwa hydraty o różnej zawartości wody. Formy te zostały szczegółowo zbadane przez Mafre (229).

Rezonanse ^{13}C NMR dla każdej formy zostały przypisane przy użyciu eksperymentalnych technik 2D NMR i teoretycznych obliczeń GIPAW. Na podstawie danych literaturowych możemy stwierdzić, że próbka użyta w naszym projekcie jest formą bezwodną z Z' równym jeden (refcode UHITOV).

Rysunek 34b przedstawia widmo ^{13}C CP/MAS CS. Literatura opisująca widma ^{13}C NMR chitozanu w stanie stałym jest bardzo obszerna i do tej pory opublikowano wiele artykułów. CS użyty w naszym projekcie wykazuje typowy wzór z wyraźnie widocznymi sygnałami jednostki węglowodanowej (region 50 ppm - 115 ppm) i słabymi sygnałami reprezentującymi grupę acylową (karboksylan przy $\delta = 176$ ppm i karboksylan metylu przy $\delta = 23$ ppm).

Widmo ^{13}C CP/MAS fizycznej mieszaniny CIP i CS o stosunku molowym 1:1 otrzymanej przez ręczne zmielenie dwóch składników pokazano na rysunku 34c. Jak widać, widmo to jest prostą sumą widm pokazanych na rysunkach 34a i 34b. Warto zauważyć nakładanie się karboksylanowych składników CIP i CS przy $\delta = 176$ ppm.



Rysunek 35. Widma 376,55 MHz ^{13}C MAS NMR a) czystego, krystalicznego CIP b) fizycznej mieszaniny CIP i CS w stosunku molowym 1:1. Widmo a) zarejestrowano przy

szybkości wirowania 20 kHz w temperaturze otoczenia. Widmo b) zarejestrowano przy częstotliwości wirowania 24 kHz w temperaturze otoczenia. W obu przypadkach uzyskano osiem skanów.

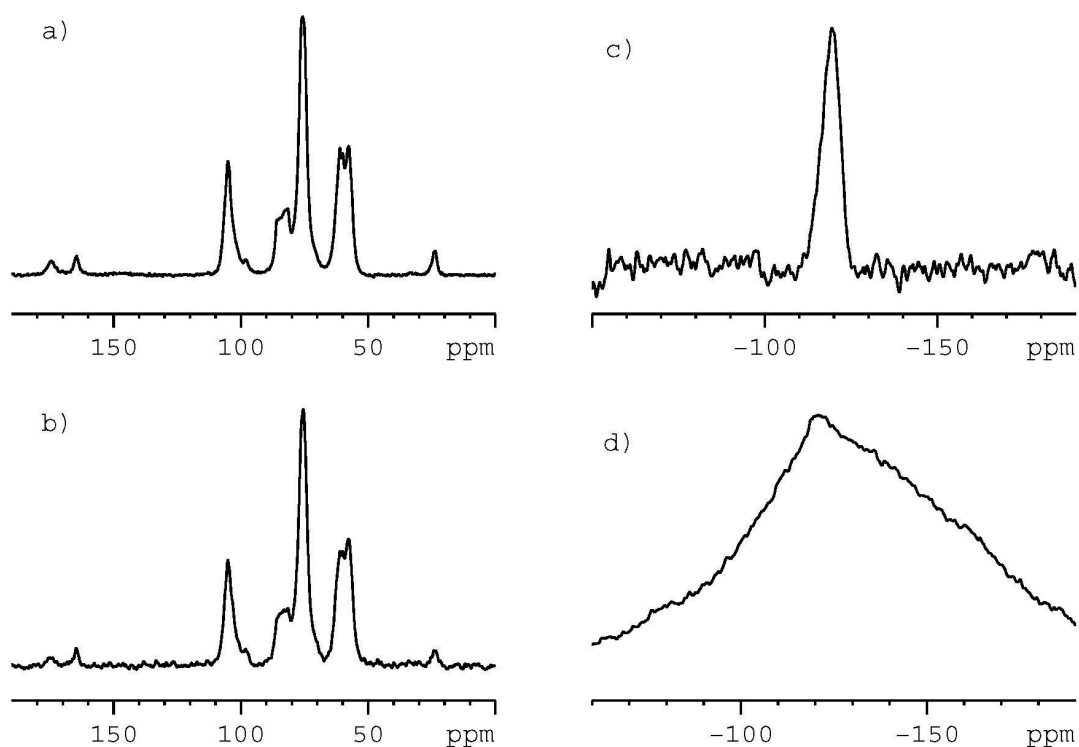
W kolejnym kroku skonfrontowaliśmy nasze wyniki ^{13}C CP/MAS NMR z danymi ^{19}F MAS NMR. Z punktu widzenia spektroskopii NMR, fluor-19 jest "przyjaznym" jądrem, łatwym do wykrycia. ^{19}F ma spin jądrowy I równy $1/2$ z wysokim współczynnikiem żyromagnetycznym i zawiera 100% naturalnie występującego fluoru. Jądro ^{19}F jest trzecim najbardziej czułym jądrem NMR, po jądrami ^3H i ^1H .

Fluor-19 jest bardzo wrażliwy na środowisko chemiczne, w zależności od struktury molekularnej sygnał ^{19}F można wykryć w zakresie 800 ppm. W środowisku asymetrycznym charakteryzuje się wysoką anizotropią przesunięcia chemicznego (CSA). W CSA faza ciekła jest eliminowana przez szybkie ogólne bębnowanie i wykrywany jest tylko sygnał izotropowy. W stanie stałym efekt CSA jest zmniejszany lub eliminowany przez szybkie wirowanie próbki pod kątem magicznym. W większości przypadków, w celu zmniejszenia liczby wirujących pasm bocznych, próbka powinna być rejestrowana z prędkością wirowania powyżej 20 kHz (230–232)(Pawlak i in., 2020; Potrzebowska i in., 2022; Skorupska i in., 2015).

Rysunek 35a przedstawia widmo ^{19}F MAS czystego krystalicznego CIP (patrz rysunek 34a) zarejestrowane przy prędkości wirowania 20 kHz. Tylko 8 skanów wystarczyło do uzyskania dobrej jakości danych. Izotropowy sygnał znaleziony przy $\delta = -120$ ppm jest symetrycznie otoczony przez wirujące satelity (sygnały przy $\delta = -72$ ppm i $\delta = -168$ ppm). Widmo potwierdza, że jedna cząsteczka CIP jest jednostką asymetryczną, jak wynika z testów rentgenowskich dla postaci bezwodnej. Rysunek 35b przedstawia sygnał ^{19}F dla CIP zmieszanego z CS (patrz Rysunek 34c). Widmo zarejestrowano przy częstotliwości wirowania 24 kHz, stąd wirujące satelity są widoczne w innym położeniu niż na rysunku 35a. Sygnał izotropowy, podobnie jak w poprzednim przypadku, występuje przy $\delta = -120$ ppm. Należy podkreślić, że w obu przypadkach szerokości linii rezonansowych ^{19}F są znacząco różne. Dla czystego CIP pełna szerokość w połowie wysokości (FWHH) wynosi 610 Hz, podczas gdy dla mieszaniny CIP/CS FWHH wynosi 1150 Hz. Różnica ta sugeruje, że podczas mielenia składników może wystąpić częściowa amorfizacja CIP. Ponadto warto

zauważyć, że takiego poszerzenia sygnałów nie zaobserwowano na widmach ^{13}C CP/MAS. Oznacza to, że jądro ^{19}F jest bardzo czułą sondą (bardziej czułą niż jądro ^{13}C) nie tylko na efekty wewnętrzne, ale także na odległe oddziaływania.

W ostatnim etapie zbadaliśmy próbki folii chitozanowych impregnowanych CIP. Zastosowaliśmy dwa rodzaje chitozanu odpowiednio oznaczone CS 100 i CS 30. Rysunki 36a i 36b przedstawiają widma ^{13}C CP/MAS odpowiednio dla CS 100 impregnowanego CIP i CS 30 impregnowanego CIP.



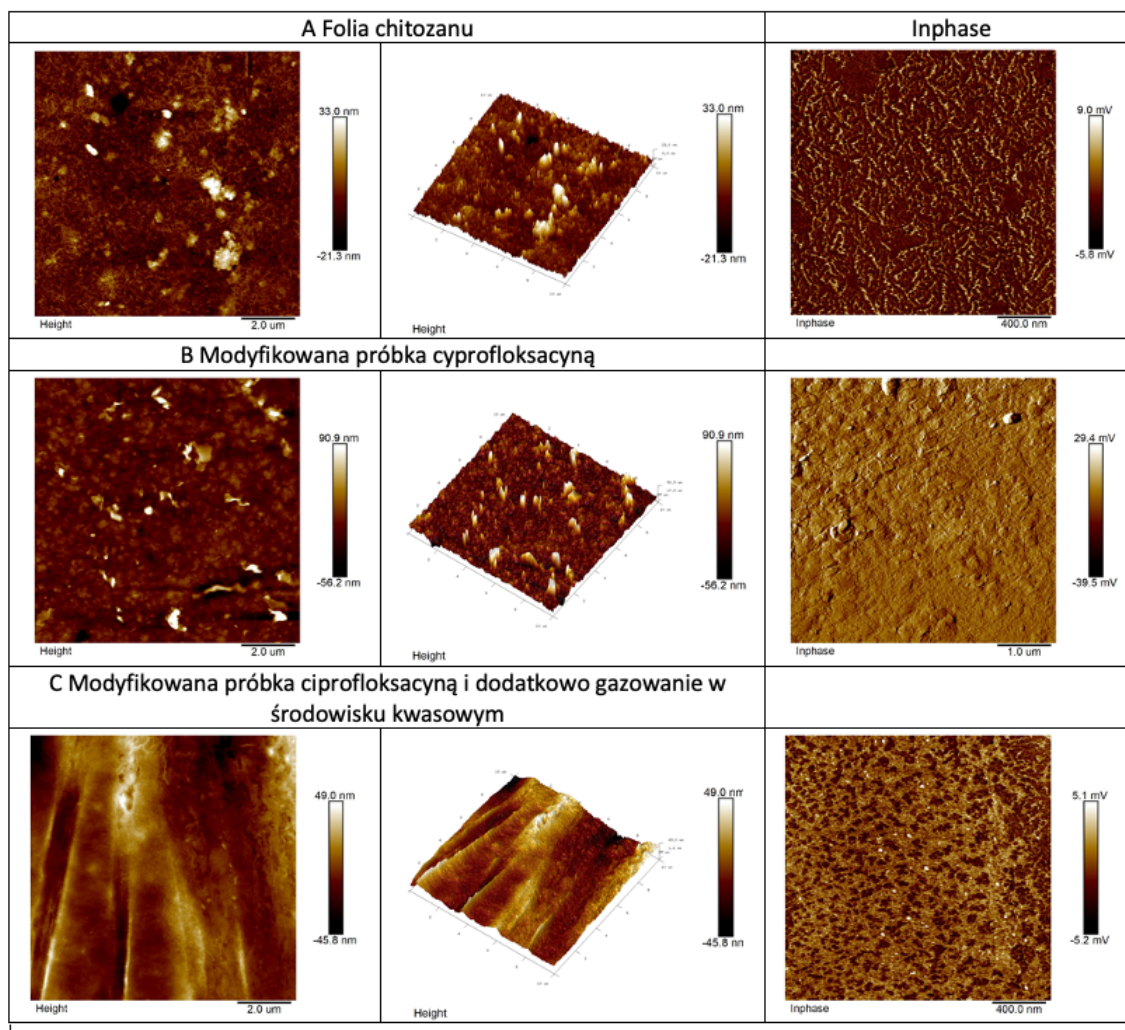
Rysunek 36. a) Widmo ^{13}C CP/MAS NMR CS 100 impregnowanego CIP zarejestrowane z szybkością wirowania 8 kHz. b) Widmo ^{13}C CP/MAS NMR CS 30 impregnowanego CIP zarejestrowane z szybkością wirowania 8 kHz. c) Widmo ^{19}F MAS NMR CS 100 impregnowanego CIP zarejestrowane z szybkością wirowania 20 kHz. d) Widmo ^{19}F MAS NMR CS 30 impregnowanego CIP zarejestrowane z szybkością wirowania 20 kHz.

Z analizy widm ^{13}C NMR jasno wynika, że rezonanse reprezentujące CIP nie są obserwowane. Jedyne nowy sygnał pojawił się przy $\delta = 166$ ppm, który nie jest reprezentatywny dla CIP. Wynik ten można interpretować w następujący sposób: a) CIP nie jest włączony do CS podczas impregnacji, b) CIP jest włączony w bardzo małej ilości do CS, ale sonda ^{13}C NMR nie jest wystarczająco czuła, aby wykryć sygnały NMR c) CIP jest włączony w bardzo małej ilości do CS, ale jest bardzo amorficzny. W takich przypadkach linie rezonansowe są bardzo szerokie i trudne (lub niemożliwe) do zmierzenia. Aby wyjaśnić te wątpliwości w dalszych badaniach, zastosowaliśmy bardziej czułą sondę NMR niż ^{13}C - jądro ^{19}F . Rysunek 36c przedstawia widmo ^{19}F MAS NMR dla próbki CS 100 impregnowanej CIP zarejestrowane przy prędkości wirowania 20 kHz. Dane uzyskano w ciągu nocy (5 k skanów). Sygnał CIP jest wyraźnie widoczny. Jego FWHH wynosi 2480 Hz, znacznie więcej w porównaniu do krystalicznej próbki CIP lub mieszaniny CIP/CS. Widmo ^{19}F MAS dla próbki CS 30 impregnowanej CIP jest jeszcze bardziej spektakularne (Rysunek 36d). W tym przypadku FWHH wynosi ponad 20 kHz (Rysunek 36d).

Podsumowując, zgodnie z wynikami NMR, możemy powiedzieć, że CIP jest zawarty w CS i jest silnie amorficzny. Niestety, nasze pomiary nie pozwalają nam na wyciągnięcie wniosków ilościowych i określenie ilości CIP w CS.

5.3.3. Analiza AFM adduktu ciprofloksacyny do chitozanu w postaci folii

Analiza obrazów AFM adduktu ciprofloksacyny do chitozanu w postaci folii (rysunek 37) wskazuje, że zastosowana modyfikacja folii CS za pomocą CIP (B) i obróbki nasyconymi parami kwasu octowego (C) znacząco wpływa na zmianę morfologię powierzchni.



Rysunek 37. Obrazy AFM powierzchni folii chitozanu (A), adduktu ciprofloksacyny do folii chitozanu (B) i poddanej następnie obróbce nasyconą para kwasu octowego CS-CIP-AC(C).

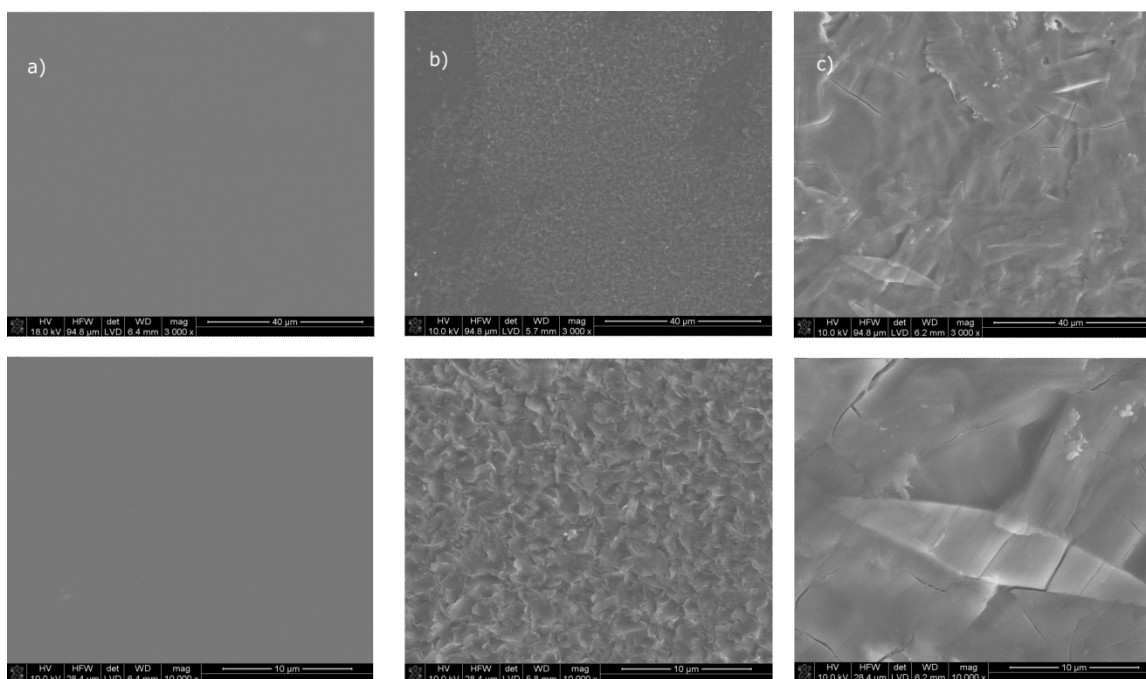
W porównaniu do obrazu wyjściowej folii chitozanu (rysunek 37A) na obrazie folii zawierającej addukt ciprofloksacyny (rysunek 37B) można zaobserwować obecność adduktu CIP na powierzchni folii CS w postaci aglomeratów. Dodatkowa obróbka folii CS modyfikowanej CIP (addukt fizyczny) i nasyconymi parami kwasu octowego (CS-CIP-AC) powoduje całkowite pokrycie powierzchni folii (rysunek 37C). Obrazy AFM ilustrują topografię w wąskich warstwach, jak pokazano na rysunkach 37 A-C. Topografię powierzchni folii można scharakteryzować za pomocą określenia średniej kwadratowej chropowatości powierzchni (RMS) (233). Wartość RMS powierzchni jest obliczana na podstawie profilu przekroju lub pola powierzchni badanych folii. Chropowatość powierzchni RMS uzyskana dla wąskich warstw chitozanu wynosiła odpowiednio 33 nm, 90,9 nm i 49 nm. Chropowatość powierzchni RMS folii CS wzrasta w wyniku pokrycia jej warstwą CIP, co można przypisać połączeniu dwóch materiałów: CS i CIP. Wartość chropowatości powierzchni dla modyfikowanych folii CIP i następnie nasyconymi parami kwasu octowego, sugeruje mechanizm wygładzania poprzez dyfuzję CIP na powierzchni. Aktywność kwasu octowego powoduje rozprzestrzenianie się CIP na powierzchni próbki.

Dodatkowo przeprowadzono test w trybie fazowym. Test In-phase jest związany z interakcjami mechaniczno-lepkociowymi i powierzchniowo-sondowymi, które z kolei są związane ze składem chemicznym powierzchni. Każda zmiana składu chemicznego wpływa następnie na zmianę sygnału, który pozwala na „rozdzielenie” faz, a właściwie na ich rozmieszczenie na powierzchni próbki. Jest to szczególnie dobrze widoczne dla próbek folii chitozanowych modyfikowanych CIP (addukt fizyczny) i następnie nasyconą parą kwasu octowego (rysunek 37C). Efekt ten jest nieco mniej widoczny dla próbek folii CS modyfikowanych CIP (addukt fizyczny) (rysunek 37B). Podkreśla on obszary o różnych właściwościach (inny kolor na skanach); mają one również inny kształt niż w przypadku próbki CS-CIP-AC (rysunek 37C). Technika AFM okazała się bardzo pomocna w ocenie właściwości powierzchniowych badanych materiałów, co zauważyli również inni autorzy badający folie chitozanowe. Według danych literaturowych, Almalik i współpracownicy ((234) zastosowali metodę AFM do badania nanocząstek CS, które zostały pokryte kwasem hialuronowym (HA). W tym teście AFM został użyty do określenia obecności HA na CNP. Grubość pokrycia HA na CPS oszacowano na około 20-30 nm w stanie suchym. Fauzi et al. (235) wykorzystali AFM do badania morfologii powierzchni nanokompozytowych cienkich

warstw chitozanu/maghemitu w celu potencjalnego zastosowania tych warstw do optycznej detekcji jonów Hg^{2+} za pomocą rezonansu plazmonów powierzchniowych. Rubina (236) wykorzystali mikroskopię sił atomowych jako podstawowe narzędzie do badań morfologicznych folii CS. Badane folie CS zostały wyjęte z roztworów kwasu octowego o różnych stężeniach, a także folie CS zawierające złoto i srebro.

5.3.4. Analiza obrazów SEM folii chitozanowych z adduktem ciprofloksacyny

Obrazy SEM próbek folii chitozanowych jak i również modyfikowanych samym CIP jak również z dodatkową modyfikacją nasyconymi parami kwasu octowego przedstawiono na rysunku 38

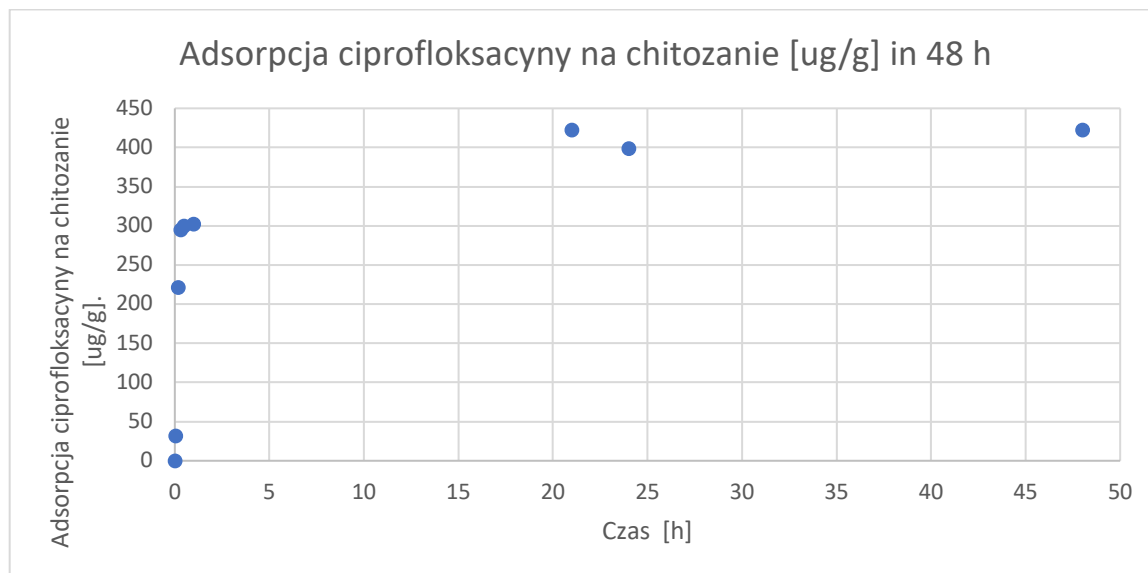


Rysunek 38. Obrazy mikrostruktury folii CS (a) poddanej działaniu soli sodowej CIP (b), a następnie działaniu nasyconych par kwasu octowego (c).

Analiza obrazu SEM badanych próbek potwierdza obecność ciprofloksacyny (CIP) na powierzchni folii fizycznych adduktów CS-CIP (rysunek 38b) oraz fizycznych adduktów CS-CIP i dodatkowo poddanych działaniu nasyconej pary kwasu octowego (rysunek 38c). Powierzchnia niezmodyfikowanej folii chitozanowej (CS) jest gładka i płaska, podczas gdy zmodyfikowane próbki wykazują chropowatą powierzchnię z charakterystycznymi cechami występujących aglomeratów co jest zgodne z danymi otrzymanymi z analizy AFM. Rathore i współpracownicy wykazali również podobną zależność (237), wraz ze wzrostem stężenia CIP wzrastała również porowatość folii. W przypadku próbek dodatkowo obrabianych nasyconymi parami kwasu octowego można zauważyć zmiany w strukturze stałej CIP, wykazujące bardziej równomierne rozmieszczenie leku na powierzchni folii. Zmiany te skutkują lepszym pokryciem krążków CS filmem CIP w stosunku do filmów nie poddanych działaniu oparów kwasu octowego. Prawdopodobnie jest to związane z rozpuszczaniem CIP w środowisku kwaśnym podczas inkubacji próbki w oparach kwasu octowego, a także z występowaniem przewidywanego dodatkowego efektu pęcznienia CS w środowisku kwaśnym.

5.3.5. Analiza adhezji ciprofloksacyny na powierzchni krążków chitozanowych

Pomiary zmian stężenia CIP w wyniku adhezji CIP na powierzchni krążków chitozanowych przeprowadzono metodą RP-HPLC.



Rysunek 39. Zależność wyczerpywania z roztworu CIP ($C_0=15 \times 10^{-4} M$) podczas adhezji do powierzchni krążka chitozanowego (CS2, $m = 0,15 g$) w funkcji czasu (test przeprowadzono w temperaturze $25^\circ C$).

Na rysunku 39 przedstawiono ubytek CIP z roztworu modyfikującego folię chitozanową. Intensywny proces sorpcji CIP na powierzchni CS można zaobserwować w ciągu 12 godzin, natomiast osiągnięcie równowagi procesów sorpcji i desorpcji CIP na powierzchni krążka CS zaobserwowano po 21 godzinach. Dla badanej folii CS o grubości $50 \mu m$ ilość zaadsorbowanego CIP określono na poziomie $420 mg$ CIP na $1 g$ chitozanu.

Adsorpcję CIP na chitozanie przeprowadzono dla wielu różnych wariantów kompozytów chitozanowych. We wszystkich przypadkach adsorpcja CIP zmieniła strukturę materiałów chitozanowych (238–242). Zwykle modyfikowane materiały chitozanowe są wykorzystywane jako materiały do usuwania zanieczyszczeń wody, w tym pozostałości leków.

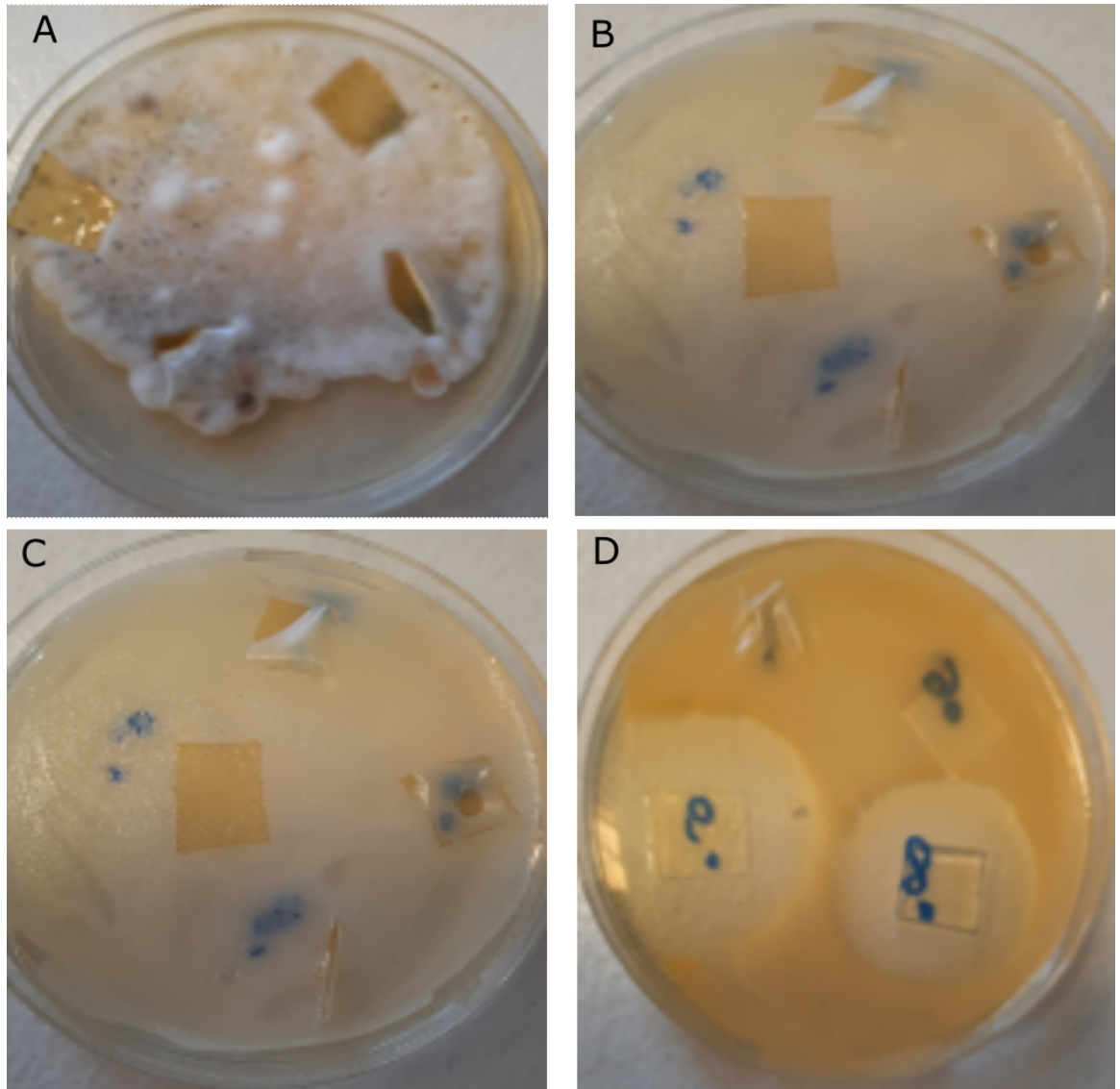
5.3.6. Analiza aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej adduktu CIP-chitozan w postaci filmu

Aktywność przeciwdrobnoustrojową wynikającą z pomiaru strefy zahamowania wzrostu drobnoustrojów ϕ [mm] przedstawiono w tabeli 21.

Tabela 21. Wyniki pomiaru narastania kolonii bakterii *E. coli* i *S. aureus* na powierzchni krążków chitozanowych analizy mikrobiologicznej adduktu CIP

Lp	Symbol próbek	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
1	CS 1	0	0
2	CS 2	0	0
3	CS 3	0	0
4	CS 4	0	0
5	CS 5	0	0
6	CS 6	30	0
7	CS 1C	45	36
8	CS 2C	47	36
9	CS 3C	50	36
10	CS 4C	52	36
11	CS 1G	24	0
12	CS 2G	0	0
13	CS 3G	0	0
14	CS 4G	0	0
15	CS 5G	24	0
16	CS 6G	32	0
17	CS 1CG	58	45
18	CS 2CG	60	60
11	Kontrola – ciprofloksacyna 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$	42	31

Chitozan (CS1), masa cząsteczkowa 890 kDa; Chitozan (CS2), masa cząsteczkowa 30 kDa; Chitozan (CS3), masa cząsteczkowa 150 kDa; Chitozan (CS4), masa cząsteczkowa 325 kDa, Chitozan (CS5), masa cząsteczkowa 84 kDa; Chitozan (CS6), masa cząsteczkowa 60 kDa. G – obróbka nasyconymi parami kwasu octowego; CS1C- obróbka roztworem ciprofloksacyny; CG – obróbka roztworem ciprofloksacyny i nasyconymi parami kwasu octowego



Rysunek 40. Efekt biobójczy dla poszczególnych szczepów bakterii i grzybów. A - *Penicillium expansum* CS6, CS1C-CS3C; B - *Candida albicans* CS6, CS1C-CS3C, C - *Escherichia coli* CS6, CS1C-CS3C i D - *Staphylococcus aureus* CS6, CS1C-CS3C - wyraźnie widoczna strefa inhibicji.

Masa cząsteczkowa CS i stopień deacetylacji znacząco wpływają na jego aktywność biologiczną (243)(Bagheri-Khoulenjani et al., 2009). CS został opisany jako silny środek przeciwdrobnoustrojowy przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, Gram-ujemnym i grzybom (244)(Rejane C. Goy, n.d.). Właściwości przeciwdrobnoustrojowe CS zależą jednak od istotnych czynników, w tym rodzaju szczepu drobnoustrojów, poziomu pH i jego właściwości strukturalnych (245)(Qin & Li, 2020).

Wprowadzenie nowych ugrupowań do łańcucha polimerowego może poprawić właściwości biologiczne CS. Dostępna literatura opisuje różne modyfikacje CS za pomocą katecholu (246)(Amato i in., 2018), czwartorzędowych grup amoniowych (247)(Martins i in., 2014) lub zasad Schiffa (248)(Wei i in., 2019). Dostępne są różne podejścia syntetyczne do otrzymywania pochodnych CS, takie jak bezpośrednia modyfikacja, reakcje enzymatyczne lub szczepienie chemiczne (249)(Nagy, 2018). Należy zauważyć, że przeprowadzenie udanej wieloetapowej syntezy organicznej złożonych cząsteczek może być trudnym procesem. Główną obawą może być to, że niektóre grupy funkcyjne mogą zakłócać reakcję, powodując powstawanie niepożądanych produktów. Sytuacji tej można uniknąć, stosując grupy ochronne, które tymczasowo maskują grupy funkcyjne, które mogłyby przeszkadzać (250)(Abd El-Hack i in., 2020).

Testowane materiały CS wykazały zróżnicowaną aktywność przeciwdrobnoustrojową. Żaden z nich nie był aktywny wobec testowanych szczepów grzybów. CS o różnej masie cząsteczkowej i lepkości nie wykazały znaczącej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, z wyjątkiem modyfikacji CS6 o słabej aktywności przeciwko bakteriom Gram-ujemnym *E. coli*. Jednakże, chemiczne modyfikacje chitozanu wywołały obiecujące efekty przeciwdrobnoustrojowe. Bardzo interesujące wyniki uzyskano dla modyfikacji CS za pomocą CIP - skuteczny efekt przeciwbakteryjny odnotowano zarówno w stosunku do bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich. Fakt ten jest wart odnotowania, ponieważ CIP jest znany jako antybiotyk o dobrej aktywności wobec większości bakterii Gram-ujemnych, ale jego działanie wobec szczepów bakterii Gram-dodatnich może być umiarkowane lub słabe(251) (Davis i in., 1996).

Modyfikacje chitozanu kwasem octowym skutkowały z kolei słabszym działaniem przeciwdrobnoustrojowym, mimo że kwas octowy znany jest z szerokiego działania przeciwbakteryjnego. Substancja ta jest powszechnie stosowana w medycynie od ponad 6000 lat do dezynfekcji ran, a zwłaszcza jako środek antyseptyczny w leczeniu i profilaktyce dżumy. Spektrum mikrobiologiczne kwasu octowego jest szerokie, nawet przy niskim stężeniu 3% (252,253)(Pangprasit et al., 2020; Ryssel et al., 2009).

Modyfikując CS kwasem octowym i dodatkową substancją czynną istnieje możliwość uzyskania materiałów o wysokiej skuteczności biobójczej. Ostatnio zsyntetyzowano pochodne chitozanu z kwasem octowym i grupami guanidynowymi i scharakteryzowano je za pomocą ^{13}C NMR, spektroskopii FT-IR, termogravimetrii i analizy elementarnej. Zarówno octan N-guanidyniowy CS, jak i chlorek N-guanidyniowy CS wykazywały wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową w porównaniu z czystym CS (254)(Salama i in., 2020). Ponadto, liofilizowany octan CS z wbudowanymi nanocząsteczkami srebra skutecznie kontrolował wzrost bakterii (255)(Huang et al., 2011). Dane te sugerują, że synergiczne połączenie octanu chitozanu i innych środków przeciwdrobnoustrojowych prowadzi do poprawy skuteczności przeciwbakteryjnej CS.

Efekt ten został również potwierdzony w moich badaniach. Najlepszy efekt przeciwbakteryjny uzyskano poprzez modyfikację CS za pomocą CIP i kwasu octowego. Modyfikacje te prowadziły do silnego synergistycznego działania zarówno przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, jak i Gram-dodatnim.

Wyniki sugerują, że przygotowany materiał antybakteryjny o właściwościach dostarczania leków może być odpowiednim kandydatem do wielu zastosowań medycznych i higienicznych.

V. Wnioski

Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badania nad wytwarzaniem i modyfikacją struktur wykonanych z chitozanu pozwalają na sformułowanie następujących wniosków końcowych:

1. Badania porównawcze degradacji chitozanu w różnych roztworach kwasów organicznych z wykorzystaniem kwasu mlekowego, octowego, jabłkowego i mrówkowego pozwoliły wskazać, który z tych kwasów ma najmniejszy wpływ na degradację chitozanu. Obliczone na podstawie oznaczonych wartości zredukowanej lepkości istotnej dla próbek chitozanu degradowanych w roztworach wytypowanych kwasów, potwierdzają występowanie degradacji w czasie ich przetrzymywania w temperaturze 20 °C. Najwyższy spadek zredukowanej lepkości istotnej roztworu chitozanu w czasie obserwuje się dla kwasu jabłkowego, w pozostałych zastosowanych roztworach kwasów ten spadek jest znacznie powolniejszy. Do sporządzania roztworów chitozanu przeznaczonych do długotrwałego przechowywania rekomendowane są roztwory uszeregowane w kolejności stabilności lepkości istotnej: kwas octowy, kwas mrówkowy i kwas mlekowy.
2. Na podstawie analizy produktu degradacji chitozanu w wytypowanych kwasach organicznych metodą chromatografii GPC/SEC, można je uszeregować według ich zdolności do degradacji makrocząsteczek chitozanu od naj najmniejszej do największej: kwas octowy→kwas mrówkowy→kwas mlekowy→kwas jabłkowy.
3. Analiza kinetyki degradacji chitozanu w roztworach kwasów organicznych wpisuje się z model opisujący kinetykę pierwszego rzędu. Wartości stałej szybkości degradacji pierwszego rzędu dla badanych kwasów organicznych przedstawia się następująco dla analizy Mv: $k_{\text{kwas octowy}}=5,26 \times 10^{-7}$, $k_{\text{kwas mrówkowy}}=6,09 \times 10^{-7}$, $k_{\text{kwas mlekowy}}=6,46 \times 10^{-7}$, $K_{\text{kwas jabłkowy}}=18,87 \times 10^{-7}$, dla analizy Mw: $k_{\text{kwas octowy}}=5,68 \times 10^{-7}$, $k_{\text{kwas mrówkowy}}=6,76 \times 10^{-7}$, $k_{\text{kwas mlekowy}}=14,55 \times 10^{-7}$; $K_{\text{kwas jabłkowy}}=14,86 \times 10^{-7}$; dla analizy Mn: $k_{\text{kwas octowy}}=12,33 \times 10^{-7}$, $k_{\text{kwas mrówkowy}}=14,80 \times 10^{-7}$, $k_{\text{kwas mlekowy}}=28,25 \times 10^{-7}$, $K_{\text{kwas jabłkowy}}=31,01 \times 10^{-7}$

4. Na podstawie analizy widm ^1H NMR próbek chitozanu poddanych procesowi degradacji wyznaczono dla każdej z nich wartości stopnia deacetylacji (DDA). Wyznaczone wartości wskazują, że DDA nie ulega zmianom w sposób znaczący w czasie procesu degradacji. Ponadto brak pojawienia się nowych sygnałów np. protonów grupy aldehydowej na widmach ^1H NMR potwierdza, że reakcja degradacji w roztworach kwasów organicznych następuje jedynie poprzez zerwanie wiązań β -1,4-glikozydowych.
5. Zaproponowana metoda modyfikacji na drodze obróbki nasyconymi parami kwasów organicznych oraz roztworami kwasów organicznych w alkoholu etylowym, pozwoliła na wytworzenie nowych pochodnych chitozanowych, niemożliwych do uzyskania konwencjonalnymi metodami z uwagi na rozpuszczalność chitozanu w kwasowym środowisku. Zastosowane przedstawionego w pracy sposobu modyfikacji pozwala uzyskać nowy, innowacyjny materiał, który może być poddawany dalszym modyfikacjom.
6. Analiza włókien chitozanowych poddanych obróbce nasyconymi parami wytypowanych kwasów organicznych oraz ich roztworami w alkoholu etylowym z zastosowaniem spektroskopii FTIR ATR potwierdziła tworzenie w warstwach powierzchniowych włókien elementarnych nowych pochodnych – soli chitozanu.
7. Zaproponowana w niniejszej pracy procedura modyfikacji form chitozanowych alkalicznym roztworem ciprofloksacyny prowadzi do uzyskania aktywnego biologicznie adduktu względem bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych
8. Badania NMR ciała stałego ^{13}C CP/MAS oraz ^{19}F MAS NMR dla adduktu ciprofloksacyny do chitozanu, potwierdziły obecność ciprofloksacyny na powierzchni folii chitozanowych. Ponadto analiza widm ^{19}F MAS NMR wskazuje, że ciprofloksacyna została przekształcona na powierzchni folii chitozanowych z formy krystalicznej w amorficzną, co poprawia jej biodostępność oraz zakres aktywności mikrobiologicznej. Badania spektroskopii FTIR ATR potwierdziły również obecności ciprofloksacyny na wytworzonych foliach
9. Badanie AFM adduktu ciprofloksacyny do chitozanu w postaci folii potwierdziło jej przyłączenie do powierzchni folii. Wartość chropowatości powierzchni dla modyfikowanych folii ciprofloksacyną i poddanych obróbce nasyconymi parami

kwasu octowego skutkuje efektem jej wygładzenia, poprzez dyfuzję ciprofloksacyny na powierzchni folii chitozanowej.

10. Badania mikrobiologiczne przeprowadzone zarówno dla włókniń jak i folii chitozanowych pozwoliły potwierdzić modyfikacje zastosowanymi kwasami oraz ich skuteczność względem bakterii. Efekty skutecznej biobójczości uzyskano dla folii chitozanowych modyfikowanych kwasem octowym oraz chlorowodorowym.
11. Badanie procesu hemolizy w obecności modyfikowanych form chitozanu wytypowanymi kwasami pozwoliło określić cytotoksyczność materiałów modyfikowanych parami różnych kwasów jak i w roztworze etanolu.
12. Cytotoksyczność wytworzonych form soli chitozanowych wytypowanych kwasów organicznych zmniejsza się znacząco poprzez zastosowanie procesu usuwania nadmiaru zaadsorbowanego kwasu organicznego procesem ługowania modyfikowanych włókniń czystym alkoholem etylowym.
13. Modyfikacja wytworzonych form chitozanowych poprzez obróbkę z zastosowaniem alkalicznego roztworu ciprofloksacyny oraz następczą modyfikację nasyconą parą kwasu octowego zwiększa ich zdolności biobójcze w wyniku synergistycznego działania soli chitozanu oraz adduktu ciproflaksyny do chitozanu.

Spis tabel

Tabela 1. Parametry zgrzeblenia.

Tabela 2. Charakterystyka chitozanu użytego do modyfikacji wraz z metodą modyfikacji. Czas odparowania wynosił 120 min

Tabela 3. Wyniki pomiarów lepkości wewnętrznej soli chitozanu poddanej procesowi degradacji oraz wartości średniej wiskozymetrycznej masy molowej.

Tabela 4. Wartość współczynnika kąтового uzyskanego z liniowej zależności zmian M_v od czasu degradacji

Tabela 5. Wartości parametrów molekularnych wyznaczonych techniką GPC/SEC.

Tabela 6. Wartość współczynnika kąтового uzyskanego z liniowej zależności zmian M_w w czasie degradacji

Tabela 7. Wartość współczynnika kąтового uzyskanego z liniowej zależności zmian M_n od czasu degradacji

Tabela 8. Dane kinetyki degradacji opracowane na podstawie zmian wartości M_v chitozanu rozpuszczonego w odpowiednich kwasach organicznych

Tabela 9. Dane kinetyki degradacji opracowane na podstawie wartości zmian wartości M_n chitozanu rozpuszczonego w odpowiednich kwasach organicznych

Rysunek 21. Kinetyka degradacji chitozanu w 3% kwasie octowym w 20°C dla zmian wartości M_n

Tabela 10. Dane kinetyki degradacji opracowane na podstawie wartości M_w .

Tabela 11. Stopień deacetylacji chitozanu obliczony na podstawie widm 1H NMR po degradacji w rozcieńczonych kwasach organicznych (5%), temperatura 20 °C, stężenie polimeru 3%.

Tabela 12. Objętość retencji kwasu modyfikowanych włókien chitozanowych modyfikowanych w atmosferze nasyconej pary kwasu HCL i CH_3COOH

Tabela 13. Objętość retencji modyfikowanych włókien chitozanowych po obróbce w roztworach kwasu octowego w etanolu - procedura bez płukania

Tabela 14. Objętość retencji modyfikowanych włókien chitozanowych po obróbce w roztworach kwasu octowego i etanolu - procedura z płukaniem.

Tabela 15. Opisy symboli opisujące próbki na testowanych płytkach Petriego

Tabela 16. Wpływ modyfikacji włókien chitozanu roztworem kwasu octowego w etanolu bez płukania końcowego na wzrost drobnoustrojów *S. aureus* i *E. coli*

Tabela 17. Wpływ modyfikacji włókien chitozanu modyfikowanych nasyconymi parami różnych kwasów bez płukania końcowego na wzrost drobnoustrojów *S. aureus* i *E. coli*

Tabela 18. Toksyczność dla ludzkich krwinek czerwonych mierzona jako % hemolizy włókien modyfikowanych przy użyciu roztworu kwasu octowego w etanolu - procedury bez płukania i z płukaniem

Tabela 19. Toksyczność dla ludzkich czerwonych krwinek mierzona jako % hemolizy w włóknach modyfikowanych oparami różnych kwasów (otrzymywanie zmodyfikowanych materiałów w warunkach gazowania).

Tabela 20. Stopień podstawienia dla soli chitozanu, obliczony na podstawie widm ¹H-NMR i analizy miareczkowej

Tabela 21. Wyniki pomiaru narastania kolonii bakterii *E. coli* i *S. aureus* na powierzchni krążków chitozanowych analizy mikrobiologicznej adduktu CIP

Spis rysunków

Rysunek 1. Podział węglowodanów (4,5)

Rysunek 2. Podział polisacharydów przedstawiający kryteria budowy i funkcje w organizmach (11)

Rysunek 3. Podział biopolimerów na podstawie podjednostek meru (16).

Rysunek 4. Zawartości procentowa chityny u skorupiaków (27)

Rysunek 5. Zawartości procentowa chityny u mięczaków (27)

Rysunek 6. Zawartości procentowa chityny w grzybach(27)

Rysunek 7. Zawartości procentowa chityny u owadów(27)

Rysunek 8. Schemat łańcucha chityny (49)

Rysunek 9. Formy alf beta gama chityny (53)

Rysunek 10 Proces przetwarzania chityny (86)

Rysunek 11. Schemat konwersji chityny do chitozanu (87)

Rysunek 12. Schemt mechanizmu działania chitozanu na bakterie Gram-dodatnie oraz Gram-ujemnie (110)

Rysunek 13. Zmiany M_v chitozanu po czasie degradacji

Rysunek 14. Rozkład masy molowej chitozanu degradowanej w kwasie jabłkowym

Rysunek 15. Rozkład masy molowej chitozanu degradowanym w kwasie octowym.

Rysunek 16. Rozkład masy molowej chitozanu degradowanym w kwasie mrówkowym.

Rysunek 17. Rozkład masy molowej chitozanu degradowanym w kwasie mlekowym.

Rysunek 18. Zmiany wartości M_w chitozanu po czasie degradacji.

Rysunek 19. Zmiany wartości M_n chitozanu po czasie degradacji

Rysunek 20. Kinetyka degradacji chitozanu w 3% kwasie octowym w 20°C dla zmian wartości M_v

Rysunek 21. Kinetyka degradacji chitozanu w 3% kwasie octowym w 20°C dla zmian wartości M_n

Rysunek 22. Kinetyka degradacji chitozanu w 3% kwasie octowym w 20°C dla zmian wartości M_w

Rysunek 23. Widmo 1H NMR chitozanu przed degradacją ($t=0$ min) w rozcieńczonym kwasie octowym w temperaturze 25 °C

Rysunek 24. Widmo ^1H NMR chitozanu degradowanego w rozcieńczonym kwasie octowym (3%) w temperaturze $25\text{ }^\circ\text{C}$ ($t=168\text{ min}$).

Rysunek 25. Schemat badań wzrostu bakterii Gram-dodatnich i Gram ujemnych w pożywce (MHA) na włókninach chitozanu

Rysunek 26. Schemat badań wzrostu grzybów w pożywce (SDA) na włókninach chitozanu

Rysunek 27. Przykładowe widma FTIR ATR dla włókniny chitozanowej poddanej działaniu roztworu kwasu octowego w etanolu poddanych procesowi płukania czystym etanolem jak i bez płukania końcowego

Rysunek 28 Przykładowe widma FTIR ATR dla włókniny poddanej działaniu nasyconych par kwasów: octowego (A), chlorowodorowego (B) i masłowego (C)

Rysunek 29 Przykładowe widma FTIR ATR dla włókniny poddanej działaniu nasyconych par kwasów: walerianowego (D), propionowego (E) i mrówkowego (F)

Rysunek 30. Widmo ^1H -NMR soli chitozanu i kwasu chlorowodorowego (chlorowodorku chitozanu)

Rysunek 31. Widmo ^1H -NMR soli chitozanu i kwasu octowego (octanu chitozanu)

Rysunek 32. Widma FTIR-ATR folii chitozanowych modyfikowanych adduktami fizycznymi CS-CIP i dodatkowo poddanych obróbce nasyconą parą kwasu octowego. a) CIP, b) nałożone widma niezmodyfikowanego CS (CS2) i adduktu fizycznego CS-CIP (CS10)

Rysunek 33. Widma FTIR-ATR folii chitozanowych modyfikowanych adduktami fizycznymi CS-CIP i dodatkowo traktowanych parami kwasu octowego. c) nałożone widma CS10 i CS10 dodatkowo poddanych obróbce nasyconą parą kwasu octowego, d) nałożone widma CS (niezmodyfikowanego) i CS10 dodatkowo poddanych obróbce nasyconą parą kwasu octowego (CS2GC).

Rysunek 34. Widma 100 MHz ^{13}C CP/MAS NMR dla a) czystego krystalicznego CIP, b) CS, c) fizycznej mieszaniny CIP i CS w stosunku molowym 1:1. Wszystkie widma zarejestrowano przy szybkości wirowania 8 kHz w temperaturze otoczenia.

Rysunek 35. Widma $376,55\text{ MHz}$ ^{19}F MAS NMR a) czystego, krystalicznego CIP b) fizycznej mieszaniny CIP i CS w stosunku molowym 1:1. Widmo a) zarejestrowano przy szybkości wirowania 20 kHz w temperaturze otoczenia. Widmo b) zarejestrowano przy częstotliwości wirowania 24 kHz w temperaturze otoczenia. W obu przypadkach uzyskano osiem skanów.

Rysunek 36. a) Widmo ^{13}C CP/MAS NMR CS 100 impregnowanego CIP zarejestrowane z szybkością wirowania 8 kHz. b) Widmo ^{13}C CP/MAS NMR CS 30 impregnowanego CIP zarejestrowane z szybkością wirowania 8 kHz. c) Widmo ^{19}F MAS NMR CS 100 impregnowanego CIP zarejestrowane z szybkością wirowania 20 kHz. b) Widmo ^{19}F MAS NMR CS 30 impregnowanego CIP zarejestrowane z szybkością wirowania 20 kHz.

Rysunek 37. Obrazy AFM powierzchni folii chitozanu (A), adduktu ciprofloksacyny do folii chitozanu (B) i poddanej następnie obróbce nasyconą parą kwasu octowego CS-CIP-AC(C).

Rysunek 38. Obrazy mikrostruktury folii CS (a) poddanej działaniu soli sodowej CIP (b), a następnie działaniu oparów kwasu octowego (c).

Analiza obrazu SEM badanych próbek potwierdza obecność CIP na powierzchni folii fizycznych adduktów CS-CIP (rysunek 38b) oraz fizycznych adduktów CS-CIP i dodatkowo

Rysunek 39. Zależność zubożenia roztworu CIP ($C_0=15 \times 10^{-4}\text{M}$) podczas adhezji do powierzchni krążka chitozanowego (CS2, $m = 0,15\text{g}$) w funkcji czasu (test przeprowadzono w temperaturze 25°C).

Rysunek 40. Efekt biobójczy dla poszczególnych szczepów bakterii i grzybów. A - *Penicillium expansum* CS6, CS1C-CS3C; B - *Candida albicans* CS6, CS1C-CS3C, C - *Escherichia coli* CS6, CS1C-CS3C i D - *Staphylococcus aureus* CS6, CS1C-CS3C - wyraźnie widoczna strefa inhibicji.

Literatura:

1. Namazi H. Polymers in our daily life. Vol. 7, *BiImpacts*. Tabriz University of Medical Sciences; 2017. p. 73–4.
2. Li Q, Wang S, Jin X, Huang C, Xiang Z. The application of polysaccharides and their derivatives in pigment, barrier, and functional paper coatings. Vol. 12, *Polymers*. MDPI AG; 2020.
3. Partain EM. INDUSTRIALLY IMPORTANT POLYSACCHARIDES [Internet]. Clara D. Craver CEC, editor. 2000 [cited 2023 Apr 21]. 303–323 p. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-008043417-9/50018-0>.
4. Seidi F, Jenjob R, Phakkeeree T, Crespy D. Saccharides, oligosaccharides, and polysaccharides nanoparticles for biomedical applications. Vol. 284, *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V.; 2018. p. 188–212.
5. Blanco. Chapter 4 - Carbohydrates. 2017.
6. Steinfeld L, Vafaei A, Rösner J, Merzendorfer H. Chitin prevalence and function in bacteria, fungi and protists. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC; 2019. p. 19–59.
7. Sugars. In: *Enological Chemistry* [Internet]. Elsevier; 2012. p. 77–93. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123884381000066>
8. Wine Colloids. In: *Enological Chemistry*. Elsevier; 2012. p. 323–54.
9. Peysselon F, Ricard-Blum S. Heparin-protein interactions: From affinity and kinetics to biological roles. Application to an interaction network regulating angiogenesis. *Matrix Biology*. 2014;35:73–81.
10. Maeda N. Structural Variation of Chondroitin Sulfate and Its Roles in the Central Nervous System. Vol. 10, *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*. 2010.
11. Mohammed ASA, Naveed M, Jost N. Polysaccharides; Classification, Chemical Properties, and Future Perspective Applications in Fields of Pharmacology and Biological Medicine (A Review of Current Applications and Upcoming Potentialities). Vol. 29, *Journal of Polymers and the Environment*. Springer; 2021. p. 2359–71.
12. Baranwal J, Barse B, Fais A, Delogu GL, Kumar A. Biopolymer: A Sustainable Material for Food and Medical Applications. Vol. 14, *Polymers*. MDPI; 2022.
13. Ezeoha SL, Ezenwanne JN. Production of Biodegradable Plastic Packaging Film from Cassava Starch [Internet]. Vol. 3, *IOSR Journal of Engineering*. 2013. Available from: www.iosrjen.org
14. Muriel Gargaud. *Encyclopedia of Astrobiology*. Encyclopedia of Astrobiology. Springer Berlin Heidelberg; 2011.
15. Sun Y, Bai Y, Yang W, Bu K, Tanveer SK, Hai J. Global Trends in Natural Biopolymers in the 21st Century: A Scientometric Review. Vol. 10, *Frontiers in Chemistry*. Frontiers Media S.A.; 2022.
16. Madej-Kiełbik L, Gzyra-Jagięła K, Józwick-Pruska J, Dziuba R, Bednarowicz A. Biopolymer Composites with Sensors for Environmental and Medical Applications. Vol. 15, *Materials*. MDPI; 2022.

17. Elieh-Ali-Komi D, Hamblin M. Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials [Internet]. Article in International Journal of Advanced Research. 2016. Available from: <http://www.journalijar.com>
18. Khoushab F, Yamabhai M. Chitin research revisited. Vol. 8, Marine Drugs. MDPI AG; 2010. p. 1988–2012.
19. Chakravarty J, Edwards TA. Innovation from waste with biomass-derived chitin and chitosan as green and sustainable polymer: A review. Energy Nexus. 2022 Dec;8:100149.
20. Joseph SM, Krishnamoorthy S, Paranthaman R, Moses JA, Anandharamakrishnan C. A review on source-specific chemistry, functionality, and applications of chitin and chitosan. Vol. 2, Carbohydrate Polymer Technologies and Applications. Elsevier Ltd; 2021.
21. Struszczyk H. M A R C IN Chitin and Chitosan Part I. PROPERTIES AND PRODUCTION.
22. Percot A, Viton C, Domard A. Optimization of chitin extraction from shrimp shells. Biomacromolecules. 2003 Jan;4(1):12–8.
23. Dahiya N, Tewari R, Hoondal GS. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: A review. Vol. 71, Applied Microbiology and Biotechnology. 2006. p. 773–82.
24. Okazaki K, Yamashita Y, Noda M, Sueyoshi N, Kameshita I, Hayakawa S. Molecular cloning and expression of the gene encoding family 19 chitinase from *Streptomyces* sp. J-13-3. Biosci Biotechnol Biochem. 2004 Feb;68(2):341–51.
25. Ueda M, Kojima M, Yoshikawa T, Mitsuda N, Araki K, Kawaguchi T, et al. A novel type of family 19 chitinase from *Aeromonas* sp. No.10S-24: Cloning, sequence, expression, and the enzymatic properties. Eur J Biochem. 2003 Jun;270(11):2513–20.
26. Hoell IA, Vaaje-Kolstad G, Eijsink VGH. Structure and function of enzymes acting on chitin and chitosan. Biotechnol Genet Eng Rev. 2010;27(1):331–66.
27. Arbia W, Arbia L, Adour L, Amrane A. Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods-A Review. Food Technol Bio-technol . 2013;51:12–25.
28. Naylor RL, Hardy RW, Buschmann AH, Bush SR, Cao L, Klinger DH, et al. A 20-year retrospective review of global aquaculture. Vol. 591, Nature. Nature Research; 2021. p. 551–63.
29. Gillett R. Global study of shrimp fisheries,. FAO Fisheries Technical Paper 475. 2008;331.
30. Kulawik P, Jamróz E, Özogul F. Chitosan for Seafood Processing and Preservation. Sustainable Agriculture Reviews. 2019;36:45–79.
31. Seenuvasan M, Sarojini G, Dineshkumar M. Recovery of chitosan from natural biotic waste. In: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Resource Recovery from Wastes. Elsevier; 2020. p. 115–33.
32. Naczki M, Synowiecki J, Sikorski ZE. THE GROSS CHEMICAL COMPOSITION OF ANTARCTIC KRILL SHELL WASTE. Vol. 7, Food Chemistry.
33. Cuong HN, Minh NC, Van Hoa N, Trung TS. Preparation and characterization of high purity β -chitin from squid pens (*Loligo chinesis*). Int J Biol Macromol. 2016 Dec 1;93:442–7.

34. Hunt S, Nixon M. A COMPARATIVE STUDY OF PROTEIN COMPOSITION IN THE CHITIN-PROTEIN COMPLEXES OF THE BEAK, PEN, SUCKER DISC, RADULA AND OESOPHAGEAL CUTICLE OF CEPHALOPODS. Vol. 68, *Biochem. Physiol.* 1981.
35. Jardine A, Sayed S. Valorisation of chitinous biomass for antimicrobial applications. In: *Pure and Applied Chemistry*. Walter de Gruyter GmbH; 2018. p. 293–304.
36. S.J. Pittman CAM. Movements of Marine Fish and Decapod Crustaceans: Process, Theory and Application,. *Adv Mar Biol.* 2003;Volume 44:205–94.
37. Abdel-Gawad KM, Hifney AF, Fawzy MA, Gomaa M. Technology optimization of chitosan production from *Aspergillus niger* biomass and its functional activities. *Food Hydrocoll.* 2017 Feb 1;63:593–601.
38. Free SJ. Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis. In: *Advances in Genetics*. Academic Press Inc.; 2013. p. 33–82.
39. Wang C, Zeng ZQ, Zhuang WY. Comparative molecular evolution of chitinases in ascomycota with emphasis on mycoparasitism lifestyle. *Microb Genom.* 2021;7(9).
40. Di Mario F, Rapanà P, Tomati U, Galli E. Chitin and chitosan from Basidiomycetes. *Int J Biol Macromol.* 2008 Jul 1;43(1):8–12.
41. Muszewska A, Pawłowska J, Krzyściak P. Biology, systematics, and clinical manifestations of Zygomycota infections. Vol. 33, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Springer Verlag; 2014. p. 1273–87.
42. Draczynski Z. Honeybee corpses as an available source of chitin. *J Appl Polym Sci.* 2008 Aug 5;109(3):1974–81.
43. Jucker C, Lupi D, Moore CD, Leonardi MG, Savoldelli S. Nutrient recapture from insect farm waste: Bioconversion with *hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae). *Sustainability (Switzerland).* 2020 Jan 1;12(1).
44. Van Huis A. Potential of insects as food and feed in assuring food security. Vol. 58, *Annual Review of Entomology.* 2013. p. 563–83.
45. An R, Liu C, Wang J, Jia P. Recent Advances in Degradation of Polymer Plastics by Insects Inhabiting Microorganisms. Vol. 15, *Polymers*. MDPI; 2023.
46. Beier S, Bertilsson S. Bacterial chitin degradation-mechanisms and ecophysiological strategies. Vol. 4, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Research Foundation; 2013.
47. Lodhi G, Kim YS, Hwang JW, Kim SK, Jeon YJ, Je JY, et al. Chitooligosaccharide and its derivatives: Preparation and biological applications. *Biomed Res Int.* 2014;2014.
48. Pillai CKS, Paul W, Sharma CP. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. Vol. 34, *Progress in Polymer Science (Oxford).* 2009. p. 641–78.
49. Pillai CKS, Paul W, Sharma CP. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science (Oxford).* 2009;34(7):641–78.
50. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. Vol. 31, *Progress in Polymer Science (Oxford).* 2006. p. 603–32.
51. Moussian B. Chitin: Structure, chemistry and biology. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC; 2019. p. 5–18.
52. Kumirska J, Czerwicka M, Kaczyński Z, Bychowska A, Brzozowski K, Thöming J, et al. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. Vol. 8, *Marine Drugs*. MDPI AG; 2010. p. 1567–636.

53. Roy JC, Salaün F, Giraud S, Ferri A, Chen G, Guan J. Solubility of Chitin: Solvents, Solution Behaviors and Their Related Mechanisms. In: Solubility of Polysaccharides. InTech; 2017.
54. Meyers MA, Chen PY, Lin AYM, Seki Y. Biological materials: Structure and mechanical properties. Vol. 53, Progress in Materials Science. 2008. p. 1–206.
55. Brigham CJ. Chitin and Chitosan: Sustainable, Medically Relevant Biomaterials [Internet]. Vol. 6, International Journal of Biotechnology for Wellness Industries. 2017. Available from: <http://www.fao.org/fishery/facp/USA/en>
56. Synowiecki J, Al-Khateeb NA. Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2003;43(2):145–71.
57. Francesko A, Díaz González M, Lozano GR, Tzanov T. Developments in the processing of chitin, chitosan and bacterial cellulose for textile and other applications. In: *Advances in Textile Biotechnology*. Elsevier Inc.; 2010. p. 288–311.
58. Noishiki Y, Takami H, Nishiyama Y, Wada M, Okada S, Kuga S. Alkali-induced conversion of β -chitin to α -chitin. *Biomacromolecules*. 2003 Jul;4(4):896–9.
59. Sajomsang W, Gonil P. Preparation and characterization of α -chitin from cicada sloughs. *Materials Science and Engineering C*. 2010 Apr 6;30(3):357–63.
60. Sikorski P, Hori R, Wada M. Revisit of α -chitin crystal structure using high resolution X-ray diffraction data. *Biomacromolecules*. 2009 May 11;10(5):1100–5.
61. Sikorski P, Hori R, Wada M. Revisit of α -chitin crystal structure using high resolution X-ray diffraction data. *Biomacromolecules*. 2009 May 11;10(5):1100–5.
62. Synowiecki J, Al-Khateeb NA. Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2003;43(2):145–71.
63. Song S, Zhao Y, Yuan X, Zhang J. β -Chitin nanofiber hydrogel as a scaffold to in situ fabricate monodispersed ultra-small silver nanoparticles. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2019 Aug 5;574:36–43.
64. Jung HS, Kim MH, Shin JY, Park SR, Jung JY, Park WH. Electrospinning and wound healing activity of β -chitin extracted from cuttlefish bone. *Carbohydr Polym*. 2018 Aug 1;193:205–11.
65. Lavall RL, Assis OBG, Campana-Filho SP. β -Chitin from the pens of *Loligo* sp.: Extraction and characterization. *Bioresour Technol*. 2007 Sep;98(13):2465–72.
66. Jang MK, Kong BG, Jeong Y Il, Lee CH, Nah JW. Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources. *J Polym Sci A Polym Chem*. 2004 Jul 15;42(14):3423–32.
67. Kaya M, Mujtaba M, Ehrlich H, Salaberria AM, Baran T, Amemiya CT, et al. On chemistry of γ -chitin. *Carbohydr Polym*. 2017 Nov 15;176:177–86.
68. Hou J, Aydemir BE, Dumanli AG. Understanding the structural diversity of chitins as a versatile biomaterial. Vol. 379, *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. Royal Society Publishing; 2021.
69. Kaya M, Baran T, Menten A, Asaroglu M, Sezen G, Tozak KO. Extraction and Characterization of α -Chitin and Chitosan from Six Different Aquatic Invertebrates. *Food Biophys*. 2014;9(2):145–57.
70. Hunt S, Huckerby TN. A COMPARATIVE STUDY OF MOLLUSCAN AND CRUSTACEAN CHITIN PROTEOGLYCANS BY CARBON-13 NMR SPECTROSCOPY. IDENTIFICATION OF

- CARBOHYDRATE AND AMINO ACID CONTRIBUTIONS AND THE DETERMINATION OF AMINO ACID CHEMICAL SHIFTS IN ANHYDROUS FORMIC ACID. Vol. 88, *Biochem. Physiol.* 1987.
71. Kjartansson GT, Zivanovic S, Kristbergsson K, Weiss J. Sonication-assisted extraction of chitin from North Atlantic shrimps (*Pandalus borealis*). *J Agric Food Chem.* 2006 Aug 9;54(16):5894–902.
 72. Philibert T, Lee BH, Fabien N. Current Status and New Perspectives on Chitin and Chitosan as Functional Biopolymers. Vol. 181, *Applied Biochemistry and Biotechnology.* Humana Press Inc.; 2017. p. 1314–37.
 73. El Knidri H, Belaabed R, Addaou A, Laajeb A, Lahsini A. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. Vol. 120, *International Journal of Biological Macromolecules.* Elsevier B.V.; 2018. p. 1181–9.
 74. Jaworska MM, Roberts GAF. The influence of chitin structure on its enzymatic deacetylation. *Chemical and Process Engineering - Inzynieria Chemiczna i Procesowa.* 2016 Jun 1;37(2):261–7.
 75. Mohammed MH, Williams PA, Tverezovskaya O. Extraction of chitin from prawn shells and conversion to low molecular mass chitosan. *Food Hydrocoll.* 2013 Jun;31(2):166–71.
 76. Kim SK, Rajapakse N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydr Polym.* 2005 Dec 14;62(4):357–68.
 77. Win NN, Stevens WF. Shrimp chitin as substrate for fungal chitin deacetylase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001;57(3):334–41.
 78. Shirai K, Guerrero I, Huerta S, Saucedo G, Castillo A, Obdulia Gonzalez R, et al. Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation [Internet]. 2001. Available from: www.elsevier.com/locate/enzmictec
 79. Khanafari A, Marandi R. Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods Biovanillin production View project A Conveint Method For Synthesis Of 4H-Pyran-4-One Derivitives by 1,3 Diphenyl 2-propnon and 2-Aminophenol View project [Internet]. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/26507624>
 80. Xu Y, Gallert C, Winter J. Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008 Jun;79(4):687–97.
 81. Kaur S, Dhillon GS. Recent trends in biological extraction of chitin from marine shell wastes: A review. Vol. 35, *Critical Reviews in Biotechnology.* Informa Healthcare; 2015. p. 44–61.
 82. Kou S (Gabriel), Peters LM, Mucalo MR. Chitosan: A review of sources and preparation methods. Vol. 169, *International Journal of Biological Macromolecules.* Elsevier B.V.; 2021. p. 85–94.
 83. Morgan K, Conway C, Faherty S, Quigley C. A comparative analysis of conventional and deep eutectic solvent (Des)-mediated strategies for the extraction of chitin from marine crustacean shells. Vol. 26, *Molecules.* MDPI; 2021.

84. Benhabiles MS, Abdi N, Drouiche N, Lounici H, Pauss A, Goosen MFA, et al. Protein recovery by ultrafiltration during isolation of chitin from shrimp shells *Parapenaeus longirostris*. *Food Hydrocoll.* 2013 Jul;32(1):28–34.
85. Hayes M, Carney B, Slater J, Brück W. Mining marine shellfish wastes for bioactive molecules: Chitin and chitosan -Part A: Extraction methods. Vol. 3, *Biotechnology Journal*. 2008. p. 871–7.
86. Kardas I, Struszczyk MH, Kucharska M, Broek LAM, van Dam JEG, Ciechańska D. Chitin and chitosan as functional biopolymers for industrial applications. In: *The European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE): Research Initiatives and Results*. Springer-Verlag Vienna; 2013. p. 329–73.
87. Piekarska K, Sikora M, Owczarek M, Józwiak-Pruska J, Wiśniewska-Wrona M. Chitin and Chitosan as Polymers of the Future—Obtaining, Modification, Life Cycle Assessment and Main Directions of Application. Vol. 15, *Polymers*. MDPI; 2023.
88. Sivashankari PR, Prabakaran M. Deacetylation modification techniques of chitin and chitosan. In: *Chitosan Based Biomaterials*. Elsevier Inc.; 2017. p. 117–33.
89. Rehman K ur, Hollah C, Wiesotzki K, Heinz V, Aganovic K, Rehman R ur, et al. Insect-Derived Chitin and Chitosan: A Still Unexploited Resource for the Edible Insect Sector. *Sustainability*. 2023 Mar 9;15(6):4864.
90. Mohan K, Ganesan AR, Muralisankar T, Jayakumar R, Sathishkumar P, Uthayakumar V, et al. Recent insights into the extraction, characterization, and bioactivities of chitin and chitosan from insects. Vol. 105, *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd; 2020. p. 17–42.
91. Ibram A, Ionescu AM, Cadar E. *European Journal of Natural Sciences and Medicine* Comparison of Extraction Methods of Chitin and Chitosan from Different Sources.
92. Ma J, Xin C, Tan C. Preparation, physicochemical and pharmaceutical characterization of chitosan from *Catharsius molossus* residue. *Int J Biol Macromol*. 2015 Sep 1;80:547–56.
93. Hunt S, Nixon M. A COMPARATIVE STUDY OF PROTEIN COMPOSITION IN THE CHITIN-PROTEIN COMPLEXES OF THE BEAK, PEN, SUCKER DISC, RADULA AND OESOPHAGEAL CUTICLE OF CEPHALOPODS. Vol. 68, *Biochem. Physiol*. 1981.
94. Le Dung P, Milas M, Rinaudo M, Desbrières J. Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan. Vol. 24, *Carbohydrate Polymers*. 1994.
95. Pellis A, Guebitz GM, Nyanhongo GS. Chitosan: Sources, Processing and Modification Techniques. Vol. 8, *Gels*. MDPI; 2022.
96. Dongre RS. Introductory Chapter: Multitask Portfolio of Chitin/Chitosan: Biomatrix to Quantum Dot. In: *Chitin-Chitosan - Myriad Functionalities in Science and Technology*. InTech; 2018.
97. Kou S (Gabriel), Peters LM, Mucalo MR. Chitosan: A review of sources and preparation methods. Vol. 169, *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V.; 2021. p. 85–94.
98. Kou S (Gabriel), Peters LM, Mucalo MR. Chitosan: A review of sources and preparation methods. Vol. 169, *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V.; 2021. p. 85–94.

99. Haske-Cornelius O, Bischof S, Beer B, Jimenez Bartolome M, Olatunde Olakanmi E, Mokoba M, et al. Enzymatic synthesis of highly flexible lignin cross-linked succinyl-chitosan hydrogels reinforced with reed cellulose fibres. *Eur Polym J.* 2019 Nov 1;120.
100. Wang C, Chang T, Dong S, Zhang D, Ma C, Chen S, et al. Biopolymer films based on chitosan/potato protein/linseed oil/ZnO NPs to maintain the storage quality of raw meat. *Food Chem.* 2020 Dec 1;332.
101. Guo-Jane TSAI *Wen-HueySU, Hsing-Chen CHEN AND Chorng-Laing PAN. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *FISHERIES SCIENCE.* 2002;66:170–7.
102. Benhabiles MS, Salah R, Lounici H, Drouiche N, Goosen MFA, Mameri N. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocoll.* 2012 Oct;29(1):48–56.
103. Bukzem AL; SR; dos SDM; LLM; ADPR. Optimization of carboxymethyl chitosan synthesis using response surface methodology and desirability function. *Int J Biol Macromol.* 2016;85:615–24.
104. Amir Afshar H; GA. Preparation of aminated chitosan/alginate scaffold containing halloysite nanotubes with improved cell attachment. *Carbohydr Polym.* 2016;151:1120–31.
105. Rwei SP, Lien CC. Synthesis and viscoelastic characterization of sulfonated chitosan solutions. *Colloid Polym Sci.* 2014 Apr 1;292(4):785–95.
106. Jiang S, Wang L, Yu H, Chen Y. Preparation of crosslinked polystyrenes with quaternary ammonium and their antibacterial behavior. *React Funct Polym.* 2005 Feb;62(2):209–13.
107. Tan H, Ma R, Lin C, Liu Z, Tang T. Quaternized chitosan as an antimicrobial agent: Antimicrobial activity, mechanism of action and biomedical applications in orthopedics. Vol. 14, *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI AG; 2013. p. 1854–69.
108. Aranaz I, Mengibar M, Harris R, Paños I, Miralles B, Acosta N, et al. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. Vol. 3, *Current Chemical Biology.* 2009.
109. Sadighara P, Erfanmanesh A, Hagi E, Nikaiein D, Mohajerfar T, Tohidimoghadam T, et al. The Antibacterial Activity of Chitosan between Different Extraction Method. Available from: www.jchps.com
110. Kravanja G, Primožič M, Knez Ž, Leitgeb M. Chitosan-based (Nano)materials for Novel Biomedical Applications. Vol. 24, *Molecules.* MDPI AG; 2019.
111. Gan L, Chen S, Jensen GJ. Molecular organization of Gram-negative peptidoglycan. 2008;105(48):1–8. Available from: [papers3://publication/uuid/6822BC4E-DBEF-4D37-9A8A-CEA665CC0E1B](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18222222/)
112. Rohde M. The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. *Microbiol Spectr.* 2019;7(3):1–21.
113. Kamjumhol W, Chareonsudjai P, Chareonsudjai S. Antibacterial activity of chitosan against *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiologyopen.* 2018 Feb 1;7(1).
114. Kusnadi, Purgiyanti, Kumoro AC, Legowo AM. The antioxidant and antibacterial activities of chitosan extract from white shrimp shell (*Penaeus indicus*) in the waters north of Brebes, Indonesia. *Biodiversitas.* 2022;23(3):1267–72.

115. Lim SH, Hudson SM. Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. *Carbohydr Res.* 2004 Jan 22;339(2):313–9.
116. Rachtanapun P, Thongson Rachtanapun C. Antimicrobial Activity of Oligomer and Polymer Chitosan from Different Sources against Foodborne Pathogenic Bacteria [Internet]. Article in *Kasetsart Journal-Natural Science*. 2011. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/279752569>
117. Abirami S, Emilin Renitta R, Samrot A V., Sakthikavitha M, Revathi P, Varsini AM, et al. Extraction of chitosan from crab shell and fungi and its antibacterial activity against urinary tract infection causing pathogens. *J Pure Appl Microbiol.* 2021 Jun 1;15(2):968–75.
118. Kong M, Chen XG, Xue YP, Liu CS, Yu LJ, Ji QX, et al. Preparation and antibacterial activity of chitosan microspheres in a solid dispersing system. *Front Mater Sci China.* 2008 Jun;2(2):214–20.
119. Takahashi T, Imai M, Suzuki I, Sawai J. Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated with deacetylation degree. *Biochem Eng J.* 2008 Jul 1;40(3):485–91.
120. Sudarshan NR, Hoover DG, Knorr D. Antibacterial Action of Chitosan. *Food Biotechnol.* 1992;6(3):257–72.
121. Tsai GJ, Su WH. Antibacterial Activity of Shrimp Chitosan against *Escherichia coli*. Vol. 62, *Journal of Food Protection*. 1999.
122. Wang GH. Inhibition and Inactivation of Five Species of Foodborne Pathogens by Chitosan. Vol. 55, *Journal of Food Protection*. 1992.
123. Thomas B, Baby D, Sreedevi P, Gautham A, Josey T. Chitosan A Boon or a Bane to the Future of Dentistry. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS) e-ISSN* [Internet]. 2020;19:53–6. Available from: www.iosrjournals.org
124. Rejane C, Goy D de BOBGA. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. *Polímeros: Ciência e Tecnologia.* 2009;19:241–7.
125. Dutta PK, Kumar Dutta P, Dutta J, Tripathi VS. synthesis of chitosan based bio-ion exchange resins for waste water treatment View project CO2 Capture and Conversion View project Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications [Internet]. Vol. 63, *Journal of Scientific & Industrial Research*. 2004. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/242294346>
126. Wang X, Du Y, Fan L, Liu H, Hu Y. Chitosan- metal complexes as antimicrobial agent: Synthesis, characterization and Structure-activity study. *Polymer Bulletin.* 2005 Aug;55(1–2):105–13.
127. Cavalcante EHM, Silva Junior FAG da, Pereira MAT, Pereira PJ, Costa MM da, Oliveira HP de. Antibacterial activity of chitosan and zinc oxide impregnated in PVA-based membranes. *Research, Society and Development.* 2023 Mar 14;12(3):e23812340720.
128. Oliveira ME de FAG de, Peixoto CA, Amorim RV da S. Ultrastructural Analysis of Chitosan Antibacterial Activity against Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*; *Adv Microbiol.* 2019;09(10):893–903.

129. Helander IM, Nurmiäho-Lassila EL, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria [Internet]. Vol. 71, International Journal of Food Microbiology. 2001. Available from: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro
130. Vishu Kumar AB, Varadaraj MC, Gowda LR, Tharanathan RN. Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosanolytic with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*. 2005 Oct 15;391(2):167–75.
131. Takahashi T, Imai M, Suzuki I. Water permeability of chitosan membrane involved in deacetylation degree control. *Biochem Eng J*. 2007 Aug 15;36(1):43–8.
132. Shagdarova BT, Il'ina A V., Varlamov VP. Antibacterial Activity of Alkylated and Acylated Derivatives of Low-Molecular Weight Chitosan. *Appl Biochem Microbiol*. 2016 Mar 1;52(2):222–5.
133. Devlieghere F, Vermeulen A, Debevere J. Chitosan: Antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiol*. 2004 Dec;21(6):703–14.
134. Zubareva A, Shagdarova B, Varlamov V, Kashirina E, Svirshchevskaya E. Penetration and toxicity of chitosan and its derivatives. *Eur Polym J*. 2017 Aug 1;93:743–9.
135. Panda PK, Yang JM, Chang YH, Su WW. Modification of different molecular weights of chitosan by p-Coumaric acid: Preparation, characterization and effect of molecular weight on its water solubility and antioxidant property. *Int J Biol Macromol*. 2019 Sep 1;136:661–7.
136. Tan H, Ma R, Lin C, Liu Z, Tang T. Quaternized chitosan as an antimicrobial agent: Antimicrobial activity, mechanism of action and biomedical applications in orthopedics. *Int J Mol Sci*. 2013;14(1):1854–69.
137. Huang L, Dai T, Xuan Y, Tegos GP, Hamblin MR. Synergistic combination of chitosan acetate with nanoparticle silver as a topical antimicrobial: Efficacy against bacterial burn infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(7):3432–8.
138. Mohamed NA, Sabaa MW, El-Ghandour AH, Abdel-Aziz MM, Abdel-Gawad OF. Quaternized N-substituted carboxymethyl chitosan derivatives as antimicrobial agents. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2013;60:156–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.05.022>
139. Hernández-Ochoa L, Gonzales-Gonzales A, Gutiérrez-Mendez N, Muñoz-Castellanos LN, Quintero-Ramos A. Study of the antibacterial activity of chitosan-based films prepared with different molecular weights including spices essential oils and functional extracts as antimicrobial agents. *Revista Mexicana de Ingeniera Quimica*. 2011;10(3):455–63.
140. Hu Y, Du Y, Wang X, Feng T. Self-aggregation of water-soluble chitosan and solubilization of thymol as an antimicrobial agent. *J Biomed Mater Res A*. 2009;90(3):874–81.
141. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2010;144(1):51–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>

142. Gómez-Estaca J, López de Lacey A, López-Caballero ME, Gómez-Guillén MC, Montero P. Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiol* [Internet]. 2010;27(7):889–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.012>
143. Avadi MR, Sadeghi AMM, Tahzibi A, Bayati K, Pouladzadeh M, Zohuriaan-Mehr MJ, et al. Diethylmethyl chitosan as an antimicrobial agent: Synthesis, characterization and antibacterial effects. *Eur Polym J*. 2004;40(7):1355–61.
144. Ke CL, Deng FS, Chuang CY, Lin CH. Antimicrobial actions and applications of Chitosan. *Polymers (Basel)*. 2021;13(6).
145. Felt O, Carrel A, Baehni P, Buri P, Gurny R. Chitosan as tear substitute: A wetting agent endowed with antimicrobial efficacy. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2000;16(3):261–70.
146. Rabea EI, Badawy MET, Stevens C V., Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*. 2003;4(6):1457–65.
147. Pignatello R, Leonardi A, Fuochi V, Petronio GP, Greco AS, Furneri PM. A method for efficient loading of ciprofloxacin hydrochloride in cationic solid lipid nanoparticles: Formulation and microbiological evaluation. *Nanomaterials*. 2018 May 1;8(5).
148. Li H, Williams GR, Wu J, Lv Y, Sun X, Wu H, et al. Thermosensitive nanofibers loaded with ciprofloxacin as antibacterial wound dressing materials. *Int J Pharm*. 2017 Jan 30;517(1–2):135–47.
149. Egorov AR, Kurliuk A V., Rubanik V V., Kirichuk AA, Khubiev O, Golubev R, et al. Chitosan-Based Ciprofloxacin Extended Release Systems: Combined Synthetic and Pharmacological (In Vitro and In Vivo) Studies. *Molecules*. 2022 Dec 1;27(24).
150. Arauzo B, Lobera MP, Monzon A, Santamaria J. Dry powder formulation for pulmonary infections: Ciprofloxacin loaded in chitosan sub-micron particles generated by electrospray. *Carbohydr Polym*. 2021 Dec 1;273.
151. Cui C, Sun S, Li X, Chen S, Wu S, Zhou F, et al. Optimizing the chitosan-PCL based membranes with random/aligned fiber structure for controlled ciprofloxacin delivery and wound healing. *Int J Biol Macromol*. 2022 Apr 30;205:500–10.
152. Syed Abdullah SS, Faisul Aris FA, Said Azmi SNN, Anak John JHS, Khairul Anuar NN, Mohd Asnawi ASF. Development and evaluation of ciprofloxacin-bacterial cellulose composites produced through in situ incorporation method. *Biotechnology Reports*. 2022 Jun 1;34.
153. Arif W, Rana NF, Saleem I, Tanweer T, Khan MJ, Alshareef SA, et al. Antibacterial Activity of Dental Composite with Ciprofloxacin Loaded Silver Nanoparticles. *Molecules*. 2022 Nov 1;27(21).
154. Pajor K, Pajchel Ł, Zgadzaj A, Kowalska P, Kowalczyk A, Kolmas J. Ciprofloxacin-Loaded Composite Granules Enriched in Silver and Gallium Ions—Physicochemical Properties and Antimicrobial Activity. *Coatings*. 2023 Feb 23;13(3):494.
155. Heydari A, Pardakhti A, Sheibani H. Preparation and Characterization of Zwitterionic Poly(β -cyclodextrin-co-guanidinocitrate) Hydrogels for Ciprofloxacin Controlled Release. *Macromol Mater Eng*. 2017 Jun 1;302(6).

156. Khan YA, Ozaltin K, Bernal-Ballen A, Di Martino A. Chitosan-alginate hydrogels for simultaneous and sustained releases of ciprofloxacin, amoxicillin and vancomycin for combination therapy. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2021 Feb 1;61.
157. Shamshina JL, Berton P, Rogers RD. Advances in Functional Chitin Materials: A Review. Vol. 7, *ACS Sustainable Chemistry and Engineering.* American Chemical Society; 2019. p. 6444–57.
158. Kumar MNVR. A review of chitin and chitosan applications [Internet]. Vol. 46, *Reactive & Functional Polymers.* 2000. Available from: www.elsevier.com/locate/react
159. Chakravarty J, Yang CL, Palmer J, Brigham CJ. APPLIED FOOD BIOTECHNOLOGY, 2018, 5 (3):141-154 Chitin Extraction from Lobster Shell Waste Using Microbial Culture-based Methods. Available from: <http://dx.doi.org/10.22037/afb.v5i3.20787>
160. Cheung RCF, Ng TB, Wong JH, Chan WY. Chitosan: An update on potential biomedical and pharmaceutical applications. Vol. 13, *Marine Drugs.* MDPI AG; 2015. p. 5156–86.
161. Arbia W, Arbia L, Adour L, Amrane A. Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods-A Review.
162. Zhu K, Tu H, Yang P, Qiu C, Zhang D, Lu A, et al. Mechanically Strong Chitin Fibers with Nanofibril Structure, Biocompatibility, and Biodegradability. *Chemistry of Materials.* 2019 Mar 26;31(6):2078–87.
163. K. Kifune KI and SM. Chitin fibers and process for the production of the same. USA; US Patent US4932404A, 1990. p. 1–9.
164. King C, Shamshina JL, Gurau G, Berton P, Khan NFAF, Rogers RD. A platform for more sustainable chitin films from an ionic liquid process. *Green Chemistry.* 2017;19(1):117–26.
165. Duan B, Chang C, Zhang L. Structure and properties of films fabricated from chitin solution by coagulating with heating. *J Appl Polym Sci.* 2014 Feb 15;131(4).
166. Fernando LAT, Poblete MRS, Ongkiko AGM, Diaz LJJ. Chitin Extraction and Synthesis of Chitin-Based Polymer Films from Philippine Blue Swimming Crab (*Portunus pelagicus*) Shells. *Procedia Chem.* 2016;19:462–8.
167. Isobe N, Tsudome M, Kusumi R, Wada M, Uematsu K, Okada S, et al. Moldable Crystalline α -Chitin Hydrogel with Toughness and Transparency toward Ocular Applications. *ACS Appl Polym Mater.* 2020 Apr 10;2(4):1656–63.
168. Shen X, Shamshina JL, Berton P, Gurau G, Rogers RD. Hydrogels based on cellulose and chitin: Fabrication, properties, and applications. Vol. 18, *Green Chemistry.* Royal Society of Chemistry; 2015. p. 53–75.
169. Chang C, Chen S, Zhang L. Novel hydrogels prepared via direct dissolution of chitin at low temperature: Structure and biocompatibility. *J Mater Chem.* 2011 Mar 21;21(11):3865–71.
170. Qiao L, Wang T, Liao Y, Du K. Macroporous chitin microspheres prepared by surfactant micelle swelling strategy for rapid capture of lead (II) from wastewater. *Carbohydr Polym.* 2022 Jan 15;276.

171. Wang Y, Li J, Li B. Chitin microspheres: A fascinating material with high loading capacity of anthocyanins for colon specific delivery. *Food Hydrocoll.* 2017 Feb 1;63:293–300.
172. Silva SS, Duarte ARC, Mano JF, Reis RL. Design and functionalization of chitin-based microsphere scaffolds. *Green Chemistry.* 2013;15(11):3252–8.
173. Dowaidar M, Nasser Abdelhamid H, Hällbrink M, Langel Ü, Zou X. Chitosan enhances gene delivery of oligonucleotide complexes with magnetic nanoparticles–cell-penetrating peptide. *J Biomater Appl.* 2018 Sep 1;33(3):392–401.
174. Je JY, Cho YS, Kim SK. Characterization of (aminoethyl)chitin/DNA nanoparticle for gene delivery. *Biomacromolecules.* 2006 Dec;7(12):3448–51.
175. Kö Ping-Hö Ggård M, Tubulekas I, Guan H, Edwards K, Nilsson M, Vårum KM, et al. Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo [Internet]. Vol. 8, *Gene Therapy.* 2001. Available from: www.nature.com/gt
176. Shao K, Han B, Gao J, Song F, Yang Y, Liu W. Synthesis and characterization of a hydroxyethyl derivative of chitosan and evaluation of its biosafety. *Journal of Ocean University of China.* 2015 Aug 28;14(4):703–9.
177. Ishihara M, Obara K, Nakamura S, Fujita M, Masuoka K, Kanatani Y, et al. Chitosan hydrogel as a drug delivery carrier to control angiogenesis. Vol. 9, *Journal of Artificial Organs.* 2006. p. 8–16.
178. Kamiyama K; OH; MY. Biodisposition characteristics of N-succinyl-chitosan and glycol- chitosan in normal and tumor-bearing mice. *Biol Pharm Bull.* 1999;22:176–86.
179. Dev A, Mohan JC, Sreeja V, Tamura H, Patzke GR, Hussain F, et al. Novel carboxymethyl chitin nanoparticles for cancer drug delivery applications. *Carbohydr Polym.* 2010 Mar 17;79(4):1073–9.
180. Soriano-Ruiz JL, Calpena-Campmany AC, Silva-Abreu M, Halbout-Bellowa L, Bozal-de Febrer N, Rodríguez-Lagunas MJ, et al. Design and evaluation of a multifunctional thermosensitive poloxamer-chitosan-hyaluronic acid gel for the treatment of skin burns. *Int J Biol Macromol.* 2020 Jan 1;142:412–22.
181. Chakravarty J, Semerdzhiev D, Silby MW, Ferreira T, Brigham CJ. Properties of solvent-cast chitin membranes and exploration of potential applications. *Materialia (Oxf).* 2019 Dec 1;8.
182. Dai T, Tanaka M, Huang YY, Hamblin MR. Chitosan preparations for wounds and burns: Antimicrobial and wound-healing effects. Vol. 9, *Expert Review of Anti-Infective Therapy.* 2011. p. 857–79.
183. Örlýgsson G, Laxdal EH, Kárasón S, Dagbjartsson A, Gunnarsson E, Ng CH, et al. Mineralization in a Critical Size Bone-Gap in Sheep Tibia Improved by a Chitosan-Calcium Phosphate-Based Composite as Compared to Predicate Device. *Materials.* 2022 Feb 1;15(3).
184. Chakravarty J, Rabbi MF, Chalivendra V, Ferreira T, Brigham CJ. Mechanical and biological properties of chitin/poly(lactide) (PLA)/hydroxyapatite (HAP) composites cast using ionic liquid solutions. *Int J Biol Macromol.* 2020 May 15;151:1213–23.

185. Kawata M, Azuma K, Izawa H, Morimoto M, Saimoto H, Ifuku S. Biomineralization of calcium phosphate crystals on chitin nanofiber hydrogel for bone regeneration material. *Carbohydr Polym.* 2015 Oct 9;136:964–9.
186. Kjalarsdóttir L, Dýrfjörð A, Dagbjartsson A, Laxdal EH, Örlygsson G, Gíslason J, et al. Bone remodeling effect of a chitosan and calcium phosphate-based composite. *Regen Biomater.* 2019 Aug 1;6(4):241–7.
187. H. Nagahama NNRJSKTFHT. Novel biodegradable chitin membranes for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers* . 2008;73(2):295–302.
188. Freier T, Montenegro R, Koh HS, Shoichet MS. Chitin-based tubes for tissue engineering in the nervous system. *Biomaterials.* 2005 Aug;26(22):4624–32.
189. Peter M, Sudheesh Kumar PT, Binulal NS, Nair S V., Tamura H, Jayakumar R. Development of novel α -chitin/nanobioactive glass ceramic composite scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydr Polym.* 2009 Nov 17;78(4):926–31.
190. Singh N, Chen J, Koziol KK, Hallam KR, Janas D, Patil AJ, et al. Chitin and carbon nanotube composites as biocompatible scaffolds for neuron growth. *Nanoscale.* 2016 Apr 21;8(15):8288–99.
191. Morganti P, Ciotto P Del, Francesco C, Sud M. From Waste Material a New and Safe Anti Aging Compound: A Chitin Nanofiber Complex Chitin nanoparticle-Nanolignin block polymer: Characterization and activity View project [Internet]. 2012. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/235957181>
192. Kelechi TJ, Mueller M, Hankin CS, Bronstone A, Samies J, Bonham PA. A randomized, investigator-blinded, controlled pilot study to evaluate the safety and efficacy of a poly-N-acetyl glucosamine-derived membrane material in patients with venous leg ulcers. *J Am Acad Dermatol.* 2012 Jun;66(6).
193. Balog A, Ferencz L, Hartel T. Effects of chitin and contact insecticide complexes on rove beetles in commercial orchards [Internet]. Vol. 11, Number 93 *Journal of Insect Science*. Available from: www.insectscience.org
194. A. Balog LFTH. Chitin Synthesis Inhibitors: New Class of Insecticides. *Journal of Insect Science:Vol 11 | Article 93.* 2011;11(93):1–10.
195. Jayaprakash K, Kumaran NS, Balamurugan V. EXTRACTION OF CHITIN FROM PENAEUS MONODON SHELL WASTES USED AS FOOD PRESERVATIVE AND LIFE ENHANCER [Internet]. Vol. 12, *Journal of Advanced Scientific Research.* 2021. Available from: <http://www.sciensage.info>
196. Abirami S, Nagarajan D, Samrot A V., Mini Varsini A, Sugasini A, Anand DA. Extraction, characterization, and utilization of shrimp waste chitin derived chitosan in antimicrobial activity, seed germination, preservative, and microparticle formulation. *Biointerface Res Appl Chem.* 2021 Jan 1;11(2):8725–39.
197. Fernández-Marín R, Fernandes SCM, Sánchez MÁA, Labidi J. Halochromic and antioxidant capacity of smart films of chitosan/chitin nanocrystals with curcuma oil and anthocyanins. *Food Hydrocoll.* 2022 Feb 1;123.
198. Mengibar M, Mateos-Aparicio I, Miralles B, Heras Á. Influence of the physico-chemical characteristics of chito-oligosaccharides (COS) on antioxidant activity. *Carbohydr Polym.* 2013;97(2):776–82.

199. Sun T, Zhou D, Xie J, Mao F. Preparation of chitosan oligomers and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*. 2007 Jul;225(3–4):451–6.
200. Zhang J, Xu WR, Zhang YC, Han XD, Chen C, Chen A. In situ generated silica reinforced polyvinyl alcohol/liquefied chitin biodegradable films for food packaging. *Carbohydr Polym*. 2020 Jun 15;238.
201. Ouattara B, Simard RE, Piette G, Begin A, Holley RA. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan [Internet]. Vol. 62, *International Journal of Food Microbiology*. 2000. Available from: www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro
202. Dutta PK, Tripathi S, Mehrotra GK, Dutta J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. Vol. 114, *Food Chemistry*. 2009. p. 1173–82.
203. Sivakami MS, Gomathi T, Venkatesan J, Jeong HS, Kim SK, Sudha PN. Preparation and characterization of nano chitosan for treatment wastewaters. *Int J Biol Macromol*. 2013;57:204–12.
204. Seyed Masoud Seyed Bamamnj. Comparative Cadmium Adsorption from Water by Nanochitosan and Chitosan. *International Journal of Engineering and Innovative Technology (IJEIT)* . 2013;2(9):145–8.
205. Stricker-Krongrad AH, Alikhassy Z, Matsangos N, Sebastian R, Marti G, Lay F, et al. Efficacy of Chitosan-Based Dressing for Control of Bleeding in Excisional Wounds. 2018.
206. Klokkeuold PR, Fukayama H, Sung EC, Bertolami CN. The Effect of Chitosan (poly-N-Acetyl Glucosamine) on Lingual Hemostasis in Heparinized Rabbits. Vol. 57, *J Oral Maxillofac Surg*. 1999.
207. Okamoto Y, Yano R, Miyatake K, Tomohiro I, Shigemasa Y, Minami S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydr Polym*. 2003 Aug 15;53(3):337–42.
208. Hattori H, Ishihara M. Changes in blood aggregation with differences in molecular weight and degree of deacetylation of chitosan. *Biomedical Materials (Bristol)*. 2015 Feb 1;10(1).
209. Biranje SS, Madiwale P V., Patankar KC, Chhabra R, Bangde P, Dandekar P, et al. Cytotoxicity and hemostatic activity of chitosan/carrageenan composite wound healing dressing for traumatic hemorrhage. *Carbohydr Polym*. 2020 Jul 1;239.
210. Paul W, Sharma CP. Chitin nanofibre reinforced thin chitosan films for wound healing application Enteric Coating of Polyclonal Antibody for Colon Delivery View project Immunotherapeutics View project Chitin Nanofibre Reinforced Thin Chitosan Films for Wound Healing Application Chitin Nanofibre Reinforced Thin Chitosan Films for Wound Healing Application [Internet]. Vol. 22, *Article in Trends in Biomaterials and Artificial Organs*. 2007. Available from: <http://www.sbaoi.org>
211. Mi FL, Shyu SS, Wu YB, Lee ST, Shyong JY, Huang RN. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. Vol. 22, *Biomaterials*. 2001.

212. Ong SY, Wu J, Moochhala SM, Tan MH, Lu J. Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties. *Biomaterials*. 2008 Nov;29(32):4323–32.
213. Dai T, Tegos GP, Burkatovskaya M, Castano AP, Hamblin MR. Chitosan acetate bandage as a topical antimicrobial dressing for infected burns. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(2):393–400.
214. Kamoun EA, Kenawy ERS, Chen X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. Vol. 8, *Journal of Advanced Research*. Elsevier B.V.; 2017. p. 217–33.
215. Czechowska-Biskup R, Jarosińska D, Rokita B, Ulański P, Rosiak JM. Determination of degree of deacetylation of chitosan - Comparison of methods. *Prog Chem Appl Chitin Deriv*. 2012;2012(January):5–20.
216. Morris GA, Castile J, Smith A, Adams GG, Harding SE. The kinetics of chitosan depolymerisation at different temperatures. *Polym Degrad Stab* [Internet]. 2009;94(9):1344–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.06.001>
217. Beattie WH, Booth C. Intrinsic viscosity–molecular weight relationship for cis-1,4-polyisoprene. *J Appl Polym Sci*. 1963;7(2):507–14.
218. Kasaai MR. Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydr Polym*. 2007;68(3):477–88.
219. Rinaudo M, Milas M, Dung P Le. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *Int J Biol Macromol*. 1993;15(5):281–5.
220. Maciejewska M, Bauer M, Neubauer D, Kamysz W, Dawgul M. Influence of amphibian antimicrobial peptides and short lipopeptides on bacterial biofilms formed on contact lenses. *Materials*. 2016 Nov 1;9(11).
221. Avrahami D, Shai Y. A New Group of Antifungal and Antibacterial Lipopeptides Derived from Non-membrane Active Peptides Conjugated to Palmitic Acid. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Mar 26;279(13):12277–85.
222. Kasaai MR, Arul J, Charlet G. Fragmentation of chitosan by acids. *The Scientific World Journal*. 2013;2013.
223. Sikorski D, Gzyra-Jagięła K, Draczyński Z. The kinetics of chitosan degradation in organic acid solutions. *Mar Drugs*. 2021 Apr 22;19(5).
224. Jiang L, Wang F, Han F, Prinyawiwatkul W, No HK, Ge B. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antimicrobial activity of water-soluble chitosan derivatives. *J Appl Microbiol*. 2013 Apr;114(4):956–63.
225. Durgapal S, Mukhopadhyay S, Goswami L. Preparation, characterization and evaluation of floating microparticles of ciprofloxacin. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2017;9(1):1–8.
226. Singh K, Mishra A, Singh A. Synthesis Characterization and In Vitro Release Study of Ciprofloxacin-Loaded Chitosan Nanoparticle. *Bionanoscience*. 2018 Mar 1;8(1):229–36.

227. S. PANDEY* PPGTRTAAKR. FTIR Spectroscopy: A Tool for Quantitative Analysis of Ciprofloxacin in Tablets.
228. Sikorski D, Bauer M, Frączyk J, Draczyński Z. Antibacterial and Antifungal Properties of Modified Chitosan Nonwovens. *Polymers (Basel)*. 2022 May 1;14(9).
229. Mafra L, Santos SM, Siegel R, Alves I, Almeida Paz FA, Dudenko D, et al. Packing interactions in hydrated and anhydrous forms of the antibiotic ciprofloxacin: A solid-state NMR, X-ray diffraction, and computer simulation study. *J Am Chem Soc*. 2012 Jan 11;134(1):71–4.
230. Pawlak T, Czajkowska-Szczykowska D, Jastrzebska I, Santillan R, Seroka B, Maj J, et al. Influence of Hydrogen/Fluorine Substitution on Structure, Thermal Phase Transitions, and Internal Molecular Motion of Aromatic Residues in the Crystal Lattice of Steroidal Rotors. *Cryst Growth Des*. 2020 Apr 1;20(4):2202–16.
231. Potrzebowska N, Cavani O, Kazmierski S, Wegrowe JE, Potrzebowski MJ, Clochard MC. Molecular dynamics between amorphous and crystalline phases of e-beam irradiated piezoelectric PVDF thin films employing solid-state NMR spectroscopy. *Polym Degrad Stab*. 2022 Jan;195:109786.
232. Skorupska E, Paluch P, Jeziorna A, Potrzebowski MJ. NMR study of BA/FBA cocrystal confined within mesoporous silica nanoparticles employing thermal solid phase transformation. *Journal of Physical Chemistry C*. 2015 Apr 23;119(16):8652–61.
233. Muhamad Fauzi NI, Fen YW, Abdullah J, Kamarudin MA, Sheh Omar NA, Kamal Eddin FB, et al. Evaluation of Structural and Optical Properties of Graphene Oxide-Polyvinyl Alcohol Thin Film and Its Potential for Pesticide Detection Using an Optical Method. *Photonics*. 2022 May 1;9(5).
234. Almalik A, Donno R, Cadman CJ, Cellesi F, Day PJ, Tirelli N. Hyaluronic acid-coated chitosan nanoparticles: Molecular weight-dependent effects on morphology and hyaluronic acid presentation. *Journal of Controlled Release*. 2013;172(3):1142–50.
235. Fauzi NIM, Fen YW, Omar NAS, Saleviter S, Daniyal WMEMM, Hashim HS, et al. Nanostructured chitosan/maghemite composites thin film for potential optical detection of mercury ion by surface plasmon resonance investigation. *Polymers (Basel)*. 2020 Jul 1;12(7):1–13.
236. Rubina M, Elmanovich I, Vasil'kov A. AFM Studies of Chitosan, Gold-Chitosan, and Silver-Chitosan Films Morphology. *Macromol Symp*. 2020 Feb 1;389(1).
237. Rathore HS, Senthilvelan T, Vasantharaja R, Abraham LS, Prakash D, Sivagnanam UT, et al. Fabrication and characterization of chitosan film impregnated ciprofloxacin drug: A comparative study. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2019 Mar 1;18.
238. Cuprys A, Maletskyi Z, Rouissi T, Ratnaweera H, Brar SK, Knystautas E, et al. Insights into the simultaneous sorption of ciprofloxacin and heavy metals using functionalized biochar. *Water (Switzerland)*. 2021 Oct 1;13(19).
239. Asadi S, Mortezaigholi B, Hadizadeh A, Borisov V, Ansari MJ, Shaker Majdi H, et al. Ciprofloxacin-Loaded Titanium Nanotubes Coated with Chitosan: A Promising Formulation with Sustained Release and Enhanced Antibacterial Properties. *Pharmaceutics*. 2022 Jul 1;14(7).

240. Afzal MZ, Sun XF, Liu J, Song C, Wang SG, Javed A. Enhancement of ciprofloxacin sorption on chitosan/biochar hydrogel beads. *Science of the Total Environment*. 2018 Oct 15;639:560–9.
241. Ma W, Dai J, Dai X, Yan Y. Preparation and Characterization of Chitosan/Kaolin/Fe₃O₄ Magnetic Microspheres and Their Application for the Removal of Ciprofloxacin. 2014.
242. Abd El-Monaem EM, Eltaweil AS, Elshishini HM, Hosny M, Abou Alsoaud MM, Attia NF, et al. Sustainable adsorptive removal of antibiotic residues by chitosan composites: An insight into current developments and future recommendations. Vol. 15, *Arabian Journal of Chemistry*. Elsevier B.V.; 2022.
243. Bagheri-Khoulenjani S, Taghizadeh SM, Mirzadeh H. An investigation on the short-term biodegradability of chitosan with various molecular weights and degrees of deacetylation. *Carbohydr Polym*. 2009 Nov 17;78(4):773–8.
244. Rejane C. Goy D de BOBGA. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan.
245. Qin Y, Li P. Antimicrobial chitosan conjugates: Current synthetic strategies and potential applications. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020.
246. Amato A, Migneco LM, Martinelli A, Pietrelli L, Piozzi A, Francolini I. Antimicrobial activity of catechol functionalized-chitosan versus *Staphylococcus epidermidis*. *Carbohydr Polym*. 2018 Jan 1;179:273–81.
247. Martins AF, Facchi SP, Follmann HDM, Pereira AGB, Rubira AF, Muniz EC. Antimicrobial activity of chitosan derivatives containing N-quaternized moieties in its backbone: A review. Vol. 15, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2014. p. 20800–32.
248. Wei L, Tan W, Wang G, Li Q, Dong F, Guo Z. The antioxidant and antifungal activity of chitosan derivatives bearing Schiff bases and quaternary ammonium salts. *Carbohydr Polym*. 2019 Dec 15;226.
249. Nagy V. Chitosan-natural antioxidant conjugates: Synthesis, antimicrobial and antioxidant properties. 2018.
250. Abd El-Hack ME, El-Saadony MT, Shafi ME, Zabermaawi NM, Arif M, Batiha GE, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. Vol. 164, *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V.; 2020. p. 2726–44.
251. Davis R, Markham A, Balfour JA, Ball P, Peruana Cayetano Heredia U, Guay D, et al. DRUG EVALUATION Ci profloxacin An Updated Review of its Pharmacology, Therapeutic Efficacy and Tolerability. *Drugs*. 1996.
252. Pangprasit N, Srithanasuwan A, Suriyasathaporn W, Pikulkaew S, Bernard JK, Chaisri W. Antibacterial activities of acetic acid against major and minor pathogens isolated from mastitis in dairy cows. *Pathogens*. 2020 Nov 1;9(11):1–6.
253. Rysse H, Kloeters O, Germann G, Schäfer T, Wiedemann G, Oehlbauer M. The antimicrobial effect of acetic acid-An alternative to common local antiseptics? *Burns*. 2009 Aug;35(5):695–700.

254. Salama A, Hasanin M, Hesemann P. Synthesis and antimicrobial properties of new chitosan derivatives containing guanidinium groups. *Carbohydr Polym.* 2020 Aug 1;241.
255. Huang L, Dai T, Xuan Y, Tegos GP, Hamblin MR. Synergistic combination of chitosan acetate with nanoparticle silver as a topical antimicrobial: Efficacy against bacterial burn infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Jul;55(7):3432–8.