

SYNTEZA I WYBRANE WŁAŚCIWOŚCI CHITOZANU MODYFIKOWANEGO KWASAMI TŁUSZCZOWYMI O POTENCJALNYM ZASTOSOWANIU JAKO PRZECIWDROBNOUSTROJOWE WARSTWY WIERZCHNIE NA ELASTOMERACH TERMOPLASTYCZNYCH

AGATA NIEMCZYK, JOANNA GAJOWY, MIROSLAWA EL FRAY*

ZACHODNIOPOMORSKI UNIWERSYTET TECHNOLOGICZNY
W SZCZECINIE, INSTYTUT POLIMERÓW,
ZAKŁAD BIOMATERIAŁÓW I TECHNOLOGII MIKROBIOLOGICZNYCH,
UL. PUŁASKIEGO 10, 70 – 322 SZCZECIN
*E-MAIL: MIRFRAY@ZUT.EDU.PL

Streszczenie

W pracy przedstawiono próbę modyfikacji chitozanu kwasem tłuszczowym stosując kwas linoleinowy oraz chlorowodorek 1-(3-dimetyloaminopropyl)-3-etylokarbodiimidu (EDC*HCl) jako związek inicjujący reakcję pomiędzy grupami funkcyjnymi monomerów (karboksylowymi i aminoglikozydowymi). Analiza widm w podczerwieni potwierdziła zajście reakcji i utworzenie hydrofilowo-hydrofobowych makrocząsteczek, które w kolejnych badaniach zostaną poddane próbom wytwarzania nanocząstek o spodziewanych właściwościach antybakteryjnych.

Słowa kluczowe: chitozan, kwasy tłuszczowe, warstwy przeciwdrobnoustrojowe, biofilm

[Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 74-77]

Wprowadzenie

Materiały i wyroby medyczne obejmują dużą grupę tworzyw sztucznych, przeznaczonych w leczeniu do czasowego lub długotrwałego kontaktu z organizmem. I choć materiały polimerowe stosowane do wyrobu implantów czy protez wykazują pożądaną dla danego zastosowania biokompatybilność, to wciąż często występującym problemem przy ich stosowaniu są infekcje, które mogą prowadzić do poważnych stanów chorobowych, a nawet śmierci pacjenta. Infekcje wywoływane są głównie przez mikroorganizmy, takie jak bakterie czy grzyby, które w wyniku adhezji do powierzchni materiału, rozmnażają się i tworzą biofilm (polisacharydową błonę redukującą aktywność metaboliczną mikroorganizmów, zwiększającą ich odporność na czynniki środowiska zewnętrznego, w tym również na antybiotyki) [1,2].

W interakcji pomiędzy biomateriałem a patogenem oraz zdolnością do tworzenia się biofilmu, główną rolę odgrywa charakterystyka powierzchni materiału jak zwilżalność, ładunek elektryczny, morfologia czy topografia. W profilaktyce powstawania antybiotykooopornych stanów zapalnych konieczne jest zahamowanie procesu powstawania biofilmu. Pierwszym etapem tego procesu (o charakterze odwracalnym), jest występowanie oddziaływań bliskiego za-

SYNTHESIS AND SELECTED PROPERTIES OF CHITOSAN MODIFIED WITH FATTY ACID AS POTENTIAL ANTIMICROBIAL COATINGS FOR POLYMERIC IMPLANTS

AGATA NIEMCZYK, JOANNA GAJOWY, MIROSLAWA EL FRAY*

WEST POMERANIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY SZCZECIN,
POLYMER INSTITUTE, DIVISION OF BIOMATERIALS AND
MICROBIOLOGICAL TECHNOLOGIES,
10 PUŁASKIEGO STR.10, 70-322 SZCZECIN, POLAND
*E-MAIL: MIRFRAY@ZUT.EDU.PL

Abstract

The paper presents preliminary investigation of chitosan modification with fatty acid using linoleic acid and 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC·HCl) as initiator for monomers functional (carboxyl and aminoglycoside) groups. The analysis of Infrared spectra confirmed the formation of hydrophilic-hydrophobic macromolecules, which further will be used for preparation of nanoparticles with antibacterial properties.

Key words: Chitosan, fatty acid, antimicrobial coatings, biofilm

[Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 74-77]

Introduction

Materials and medical devices include a large group of polymers, intended for medical uses for temporary or prolonged contact with the organism. Although polymeric materials used in manufacturing of implants or prostheses are characterized by the desired biocompatibility for a given application, bacterial infections are still a frequent problem in many applications, what can lead to serious illnesses and even patients death. The main reason of infection are microorganisms, such as bacteria or fungi, which proliferate and form a biofilm (polysaccharide matrix reducing the metabolic activity of microorganisms, increasing their resistance to external environmental factors, including antibiotics) as a result of the adhesion to the material surface [1,2].

The surface characteristics like wettability, electric charge, morphology and topography play the major role in the biomaterial and pathogen interaction as well as in the ability to form a biofilm. The biofilm formation process needs to be inhibited in order to prevent the formation of antibiotic-resistant inflammation. The first stage of a process (which is reversible) is the occurrence of short-range interactions (mainly van der Waals) and a key factor for this step is a biomaterial surface wettability. The second (an irreversible) step is related to cell adhesion to the material surface, and revealing specific impact on different types of adhesion proteins on cell surfaces. Subsequently, the cells proliferate and create the layer of microorganisms on the surface. If the biological structure reach an extensive size, some elements are peeled off (by the action of shear forces) and transported to the another location on the material and surrounding tissues, where they are re-adhered to the surface [3,4]. In order to obtain antibacterial properties of biomaterials, various methods of surface modification, such

sięgu (głównie Van der Waalsa), a kluczowym czynnikiem tego etapu jest zwilżalność powierzchni biomateriału. Drogim etapem jest nieodwracalna adhezja komórek do powierzchni materiału związana ze specyficznymi oddziaływaniami różnego typu białek adhezyjnych występujących na powierzchni komórek. Kolejno dochodzi do namnażania się komórek i pokrycia podłoża warstwą mikroorganizmów. Gdy struktura biologiczna zostanie odpowiednio rozbudowana, elementy tej struktury są odrywane (w wyniku działania sił ścinających) i przenoszone na dalsze odcinki materiału i sąsiednich tkanek, gdzie ponownie mogą ulec adhezji do podłoża. [3,4]. W celu uzyskania właściwości antybakteryjnych biomateriałów stosuje się różne metody modyfikacji powierzchni, takie jak naszczepianie związków posiadających właściwości antybakteryjne (np. odpowiednie białka) [2], wprowadzanie dodatków metali - głównie srebra, ale również miedzi, cynku, glinu i żelaza [5], impregnacja powierzchni lekami [6] oraz nakładanie powłok [3].

Chitozan, naturalny polielektrolit, o właściwościach powłokotwórczych, zbudowany z $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2-deoksy-D-glukopiranozy i $\beta(1\rightarrow4)$ -2-acetamido-2-deoksy-D-glukopiranozy (których udział zależy od stopnia deacetylacji, DD) jest nietoksycznym polisacharydem, biodegradowalnym, biokompatybilnym, biofunkcyjnym o szerokim spektrum bakterio- i fungistatycznym [7]. Ponadto, dzięki licznej występującym w cząsteczce grupom funkcyjnym (hydroksylowym i aminowym) w prosty sposób można poddać go modyfikacji chemicznej. I tak, poprzez naszczepienie na hydrofilowe łańcuchy chitozanu cząsteczek o charakterze hydrofobowym, można otrzymać cząsteczki amfifilowe, mające zdolność do samoorganizacji i tworzenia się mieli [8].

Celem pracy była chemiczna modyfikacja chitozanu kwasami tłuszczowymi i otrzymanie cząsteczek o charakterze hydrofilowo/hydrofobowym zdolnych do samoorganizacji i tworzenia nanocząstek. Cząsteczki takie zostaną w kolejnych pracach wykorzystane do tworzenia chitozanolipidowych powłok antybakteryjnych na powierzchni elastomerów termoplastycznych stosowanych w kardiologii i urologii.

Materiały i metody badawcze

Chitozan (Sigma-Aldrich, lepkość 20-300 cP 1% w 1% kwasie octowym, DD 75-85%) rozpuszczono w 1% kwasie octowym. Roztwór kwasu linoleinowego (LA) i chlorowodoru 1-(3-dimetyloaminopropyl)-3-etylokarbodiimidu (EDC·HCl) (1:1 mol/mol) w metanolu wdroplono do roztworu chitozanu, inicjując reakcję grup karboksylowych z grupami aminoglikozydowymi (0,34/1 mol/mol). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 h. Produkt wytrącono w roztworze amoniaku, odwirowano, przemyto wodą destylowaną i metanolem. Osad suszono pod obniżonym ciśnieniem w 30°C przez 24 h. Ocenę budowy chemicznej zmodyfikowanego chitozanu wykonano na podstawie analizy widm podczerwieni. Stopień deacetylacji (DD, %) chitozanu oznaczono miareczkowaniem konduktometrycznym, na podstawie analizy pierwszej pochodnej funkcji przewodnictwa roztworu chitozanu w 0,1 mol HCl, do objętości roztworu miareczkującego (0,1 mol NaOH) oraz korzystając z równania:

$$DD=203,2 \cdot 100 / (42,0 + 1000m \cdot 0,1(V_2 - V_1))^{-1}$$

gdzie m odpowiada ilości chitozanu (g), a $V_2 - V_1$, objętości NaOH potrzebnej do odmiareczkowania grup aminowych chitozanu [8].

as grafting of antibacterial compounds (eg. some protein) [2], the implementation of metal ions, especially silver, but also copper, zinc, aluminum and iron [5], surface impregnation with drugs [6] and different coatings have been used [3].

Chitosan, a natural polyelectrolyte, with film-forming properties, consist of $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose and $\beta(1\rightarrow4)$ -2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose (with ratio depending from the deacetylation degree, DD) is a non-toxic polysaccharide, biodegradable, biocompatible, biofunctional with broad bactericidal and fungicidal spectrum [7]. Moreover, through numerous functional groups (hydroxyl and amine) in chitosan molecule, chemical modification can be carried out in a simple way. Thus, through grafting of hydrophobic chains onto hydrophilic chitosan, amphiphilic molecules, which can self-assembly to form micelle can be obtained [8].

The aim of this work was chemical modification of chitosan by the fatty acids grafting to obtain hydrophilic-hydrophobic macromolecules with self-assembling and nanoparticles formation ability. Such nanoparticles will be used for creating chitosan-fatty antibacterial coatings on the surface of thermoplastic elastomers applied in cardiology and urology.

Materials and methods

Chitosan (Sigma-Aldrich, viscosity 20-300 cP 1% in 1% acetic acid, 75-85% DD) was dissolved in 1% acetic acid. Linoleic acid (LA) and 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC·HCl) (1:1 mol / mol) in methanol solution was added dropwise to chitosan, initiating the reaction of carboxyl and aminoglycoside groups (0.34/1 mol/mol). The reaction was carried out at room temperature for 24 h. The product was precipitated in a solution of ammonia, centrifuged, washed with distilled water and methanol. The precipitate was dried under vacuum at 30°C for 24 h. Assessment of the chemical structure of modified chitosan was performed by analyzing the infrared spectra. Deacetylation degree (DD, %) of chitosan was determined by conductometric titration method, taking the first derivative of conductivity of chitosan solution (dissolved in 0,1 mol HCl) and the volume of titration solution (0.1 mol NaOH), and using equation:

$$DD=203,2 \cdot 100 / (42,0 + 1000m \cdot 0,1(V_2 - V_1))^{-1}$$

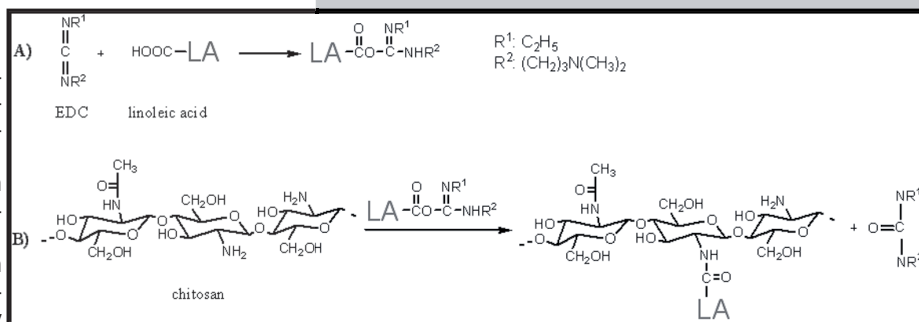
where m is the amount of chitosan (g), $V_2 - V_1$ is the volume of NaOH solution consumed in titration of amino groups of chitosan [8].

Results and discussion

The starting point for carrying out the modified of chitosan by fatty acid was the determination of degree of deacetylation of chitosan. For this purpose we used conductometric titration, which is one of the simplest methods for determining the deacetylation degree of chitosan. The first measurement point (V_1) is the volume of NaOH solution needed to equilibrate free H^+ ions from the excess of HCl, while the second measurement point (V_2) is the volume of NaOH solution needed to protonate the amino groups. The determined degree of deacetylation was ~ 78%.

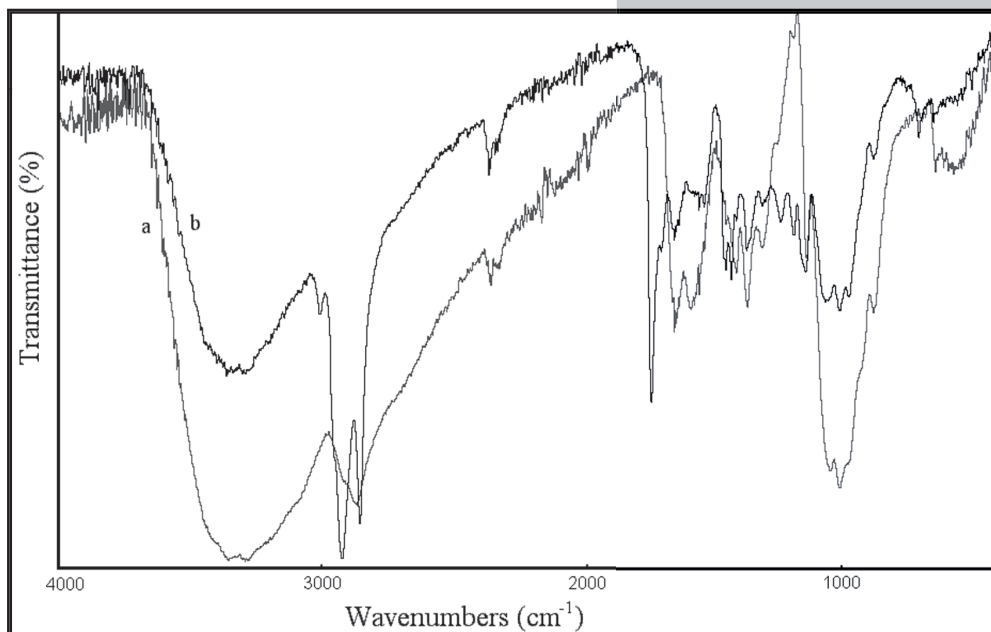
The reaction of chitosan with fatty acid was catalyzed with water-soluble carbodiimide EDC, which reacts with carboxyl group of fatty acid to form an active ester intermediate (FIG. 1A). The intermediate can react with primary amine groups of chitosan to form an amide bond [9] (FIG.1 B). The reaction does not require high temperatures and the catalyst can easily be removed from the reaction. Chemical structure of

Punktem wyjścia do przeprowadzenia syntez modyfikacji chitozanu kwasem tłuszczowym było oznaczenie stopnia deacetylacji chitozanu. W tym celu zastosowano miareczkowanie konduktometryczne, które jest jedną z prostszych metod oznaczania stopnia deacetylacji chitozanu. Pierwszy punkt pomiaru V_1 odpowiada objętości roztworu NaOH potrzebnej do związania wolnych jonów H^+ pochodzących z roztworu HCl, natomiast V_2 to objętość potrzebna do sprotonowania grup aminowych. Wyznaczony DD wyniósł $\sim 78\%$.



RYS. 1. Schemat modyfikacji chitozanu kwasem tłuszczowym.
 FIG. 1. A scheme of chitosan modification with fatty acid.

the product - chitosan grafted with fatty acid chains (CH-LA) was verified from the analysis of IR spectra shown in FIG. 2.



RYS. 2. Spektrofotogramy ATR FTIR wyjściowego chitozanu (a) i produktu modyfikacji (b).
 FIG. 2. The ATR FTIR spectra of (a) chitosan and (b) modified chitosan.

The comparison of infrared spectra of chitosan and modified with linoleic acid product (CH-LA) showed the characteristic absorption at 2924 cm^{-1} , 2854 cm^{-1} , 1464 cm^{-1} , 1182 cm^{-1} assigned to vibrational band corresponding to CH_2 group, as well as the vibrational bands at 1739 cm^{-1} and 1590 cm^{-1} , corresponding to amide group which became stronger. A significant absorption intensity decrease was found at $3000\text{-}3600 \text{ cm}^{-1}$ what can be related to diminished concentration of amino groups of chitosan which were reacted with LA.

Conclusions

The use of a carbodiimide catalyst allowed the chemical modification of chitosan with linoleic acid, as the result, the material with hydrophilic-hydrophobic characteristic was obtained. Such material, under appropriate conditions (i.e. in water or emulsion system) should demonstrate the ability to self-assembly and nanoparticles formation with the antibacterial properties.

Acknowledgments

This work is financially supported by the Polish National Science Center.

Reakcję chitozanu z kwasem tłuszczowym katalizowano wodorozpuszczalnym karbodiimidem EDC, który z grupami karboksylowymi kwasu tworzy estrowy produkt pośredni (RYS. 1A), zdolny do reakcji z pierwszorzędowymi grupami aminowymi chitozanu z utworzeniem wiązań amidowych (RYS. 1B) [9]. Reakcja nie wymaga wysokich temperatur, a katalizator jest łatwo wmywany ze środowiska reakcji. Strukturę chemiczną produktu – chitozanu z naszczepionymi łańcuchami kwasowymi (CH-LA) potwierdzono na podstawie analizy widm IR przedstawionych na RYS. 2.

Porównując widma chitozanu i produktu jego modyfikacji kwasem linoleinowym (CH-LA) widoczny jest wzrost intensywności pasm przy długości fali 2924 cm^{-1} , 2854 cm^{-1} , 1464 cm^{-1} , 1182 cm^{-1} (drgania związane z grupą CH_2 pochodzące od kwasu tłuszczowego), 1739 cm^{-1} i 1590 cm^{-1} (drgania związane z wiązaniem amidowym); oraz istotne zmniejszenie intensywności pasma w obszarze $3000\text{-}3600 \text{ cm}^{-1}$ (wynikające z zmniejszeniem się ilości grup aminowych wykorzystanych w reakcji chitozanu z LA).

Wnioski

Wykorzystanie katalizatora karbodiimidowego pozwoliło na przeprowadzenie chemicznej modyfikacji chitozanu kwasem linoleinowym i otrzymanie materiału o charakterze hydrofilowo/hydrofobowym. Materiał taki, w odpowiednich warunkach (tj. w środowisku wodnym lub układzie emulsyjnym) powinien wykazywać zdolność do samoorganizacji i tworzenia się nanocząstek o spodziewanych właściwościach antybakteryjnych.

Podziękowania

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Piśmiennictwo

- [1] Saldarriaga Fernández I. C., van der Mei H. C., Metzger S., Grainger D. W., Engelsman A. F., Nejadnik M. R., Busscher H. J., In vitro and in vivo comparisons of staphylococcal biofilm formation on a cross-linked poly(ethylene glycol)-based polymer coating. *Acta Biomater* 2010, 6, 1119.
- [2] Gao G., i in., The biocompatibility and biofilm resistance of implant coatings based on hydrophilic polymer brushes conjugated with antimicrobial peptides. *Biomater* 2011, 32(16), 3899.
- [3] Harris L. G., Tosatti S., Wieland M., Textor M., Richards R. G., Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(L-lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) copolymers. *Biomater* 2004, 25, 4135.
- [4] Monroe D., Looking for chinks in the Armor of bacterial biofilms. *PloS Biol* 2007, 5(11), 2458.

References

- [5] Francolini I., D'Illarion L., Guaglianone E., Donelli G., Martinelli A., Piozzi A., Polyurethane anionomers containing metal ions with antimicrobial properties: Thermal, mechanical and biological characterization *Acta Biomater* 2010, 6, 3482.
- [6] Davies D., Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2003, 2, 114.
- [7] Nejati Hafdani F., Sadeghinia N., A Review on Application of Chitosan as a Natural Antimicrobial. *WASET* 2011, 74, 257.
- [8] Sarkar K., Srivastava R., Chatterji U., Kundu P. P., Evaluation of Chitosan and Their Self-Assembled Nanoparticles with pDNA for the Application in Gene Therapy. *J Appl Polym Sci* 2011, 121, 2239.
- [9] Lee K. Y., Kwon I. C., Kim Y.-H., Jo W. H., Jeong S. Y., Preparation of chitosan self-aggregates as a gene delivery system. *J Cont Rel.* 1998, 51, 213.