

# PRZEMIANA FAZOWA ROZTWORÓW CHLORKU CHITOZANU JAKO POTENCJALNEGO MATERIAŁU DO ZASTOSOWAŃ W INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ

PIOTR OW CZARZ, PATRYK ZIÓLKOWSKI\*, ZOFIA MODRZEJEWSKA,  
MAREK DZIUBIŃSKI

WYDZIAŁ INŻYNIERII PROCESOWEJ I OCHRONY ŚRODOWISKA,  
POLITECHNIKA ŁÓDZKA, UL. WÓLCZAŃSKA 213, 90-924 ŁÓDŹ

\* E-MAIL: PATRYK.ZIOLKOWSKI@DOKT.P.LODZ.PL

## Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań reologicznych roztworów chlorku chitozanu formujących żele pod wpływem wzrostu temperatury. Miały one na celu wyznaczenie podstawowych parametrów określających przemianę fazową: temperaturę żelowania oraz energię potrzebną do przeprowadzenia tej przemiany. Prace te są istotne z uwagi na możliwość zastosowania takich układów jako szkieletów do hodowli komórkowej bądź nośników leków umożliwiających ich wprowadzanie do tkanki zmienionej chorobowo drogą iniekcji. Badania wykonano dla chitozanów o różnym pochodzeniu: crab, shrimp i różnej masie cząsteczkowej. Dla każdego z chitozanów przeprowadzono badania roztworów chlorku chitozanu bez oraz z dodatkiem disodowej soli  $\beta$ -glicerofosforanu ( $\beta$ -NaGP). Punkt przemiany fazowej wyznaczano za pomocą pomiarów zmian właściwości reologicznych prowadzonych w układzie stożek-płytki reometru rotacyjnego. Ponadto wyznaczono zmiany wartości pH roztworów oraz zmianę modułów: zachowawczego  $G'$  i stratności  $G''$  w funkcji przyrostu temperatury. Na podstawie wyników pomiarów stwierdzono istotny wpływ pH na temperaturę punktu żelowania. Przeprowadzone pomiary reologiczne pozwoliły wyznaczyć trzy charakterystyczne obszary procesu żelowania: (1) obszar cieczy lepkością, (2) obszar szybkiego żelowania, (3) obszar wolnego procesu żelowania oraz określić, w oparciu o model kinetyki krystalizacji polimeru, energię aktywacji dla obszarów 2 i 3.

**Słowa kluczowe:** chitozan, hydrożel, punkt żelowania, przemiana fazowa żół-żel, energia aktywacji

[Inżynieria Biomateriałów 139 (2017) 18-25]

## Wprowadzenie

Chitozan jest półkrystalicznym amino-polisacharydem otrzymanym przez deacetylację chityny. Zainteresowanie tym polimerem jest duże a perspektywy stosowania są na tyle rozległe, że chitozan został nazwany polimerem XXI wieku [1,2]. Budowa strukturalna chitozanu jest zbliżona do budowy celulozy. Różnica występuje w pierścieniu piranowym przy drugim atomie węgla, gdzie w miejscu grupy wodorotlenowej występuje grupa  $-NH_2$ . Ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne chitozan znajduje szerokie zastosowanie w procesach oczyszczania ścieków (właściwości chelatujące), przemyśle spożywczym oraz biomedycynie – w procesach tworzenia inteligentnych nośników leków [3,4].

# PHASE TRANSITION OF CHITOSAN CHLORIDE SOLUTIONS AS POTENTIAL MATERIAL FOR APPLICATION IN BIOMEDICAL ENGINEERING

PIOTR OW CZARZ, PATRYK ZIÓLKOWSKI\*, ZOFIA MODRZEJEWSKA,  
MAREK DZIUBIŃSKI

FACULTY OF PROCESS AND ENVIRONMENTAL ENGINEERING,  
ŁÓDŹ UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
213 WÓLCZAŃSKA ST., 90-924 ŁÓDŹ, POLAND

\* E-MAIL: PATRYK.ZIOLKOWSKI@DOKT.P.LODZ.PL

## Abstract

The paper presents the results of rheological study on chitosan chloride solutions, forming gels under the influence of increased temperature. Its aim was to establish the basic parameters specifying phase transition: gelation temperature and the energy needed for conducting this transition. This study is significant due to the possibility of applying such systems as scaffolds for tissue engineering or drug delivery systems. The research was conducted for chitosans of various origin: crab, shrimp and of various molecular weights. For each chitosan, research was conducted in two variations of the solutions of chitosan chloride, with or without the addition of  $\beta$ -Glycerophosphate disodium salt ( $\beta$ -NaGP). The phase transition point was estimated by measurements of rheological properties, conducted in a cone-plate system of a rotational rheometer. Moreover, the pH value of the solutions and the evolution of storage modulus  $G'$  and loss modulus  $G''$  in the function of temperature increase were determined. Based on the measurements results a significant impact of pH on the gelation point temperature was observed. The conducted rheological measurements allowed to estimate three characteristic regions of the gelation process: (1) area of viscoelastic liquid, (2) area of fast gelation, (3) area of a slow gelation process. Based on the kinetics model of polymer crystallization, the activation energy for regions 2 and 3 was determined.

**Keywords:** chitosan, hydrogel, gelation point, sol-gel phase transition, activation energy

[Engineering of Biomaterials 139 (2017) 18-25]

## Introduction

Chitosan is a semi-crystalline amino-polysaccharide obtained through deacetylation of chitin. Interest in this polymer is large, and the perspectives of use so vast that chitosan has been called a polymer of the 21st century [1,2]. The structure of chitosan is close to the structure of cellulose. The difference occurs in the pyranose ring, at the second carbon atom, where hydroxyl group is replaced by an amine  $-NH_2$ . Due to its physicochemical properties, chitosan has a variety of applications in sewage treatment processes (chelating properties), food industry and biomedicine – in processes of creating smart drug delivery systems [3,4].

Szerokie zastosowanie chitozanu wynika, obok unikalnych własności fizyko-chemicznych, również z łatwości przeprowadzenia go w formy użyteczne takie jak proszki, mikrogranulki, żele, gąbki lub membrany.

Chitozan rozpuszcza się w niskostężonych roztworach kwasów organicznych i nieorganicznych, w których tworzy sole z jonami rozpuszczalnika. W środowisku kwaśnym jon  $H^+$  zostaje przyłączony do grupy  $-NH_2$  drugiego atomu węgla w pierścieniu piranozowym [5,6]. Właściwości chitozanu ulegają zmianie z hydrofobowych na hydrofilowe i tworzy się układ koloidalny, w którym łańcuchy polimeru pozostają zdyspergowane w ośrodku ciągłym – roztworze kwasu. Układ taki wykazuje możliwość przemiany fazowej żol-żel. Hydrożele chitozanowe mogą formować się w wyniku zwiększenia stężenia polimeru (żelowanie indukowane stężeniem) [7,8], poprzez zmiany pH roztworu lub poprzez jego podgrzewanie [3,4,9-12]. Podczas podgrzewania roztworu, po przekroczeniu najniższej krytycznej temperatury roztworu (LCST), następuje zmiana budowy łańcucha polimeru z kłębka statycznego do postaci liniowej i wytworzenie wzajemnych oddziaływań pomiędzy grupami funkcyjnymi łańcuchów polimeru (w szczególności grupami  $-NH_2$ ). Punkt tej przemiany (temperatura punktu żelowania) zależy od rodzaju rozpuszczalnika oraz od obecności innych substancji wpływających na pH roztworu (wzrost pH powoduje obniżenie temperatury przemiany fazowej [9]).

Jednym z najczęściej stosowanych rozpuszczalników chitozanu jest roztwór kwasu chlorowodorowego (HCl). Dodanie do roztworu chlorku chitozanu disodowej soli  $\beta$ -glicerofosforanu ( $\beta$ -NaGP) podnosi wartość pH roztworu. Tak wytworzony układ koloidalny pozostaje w postaci zolu w temperaturze pokojowej, ale podlega przemianie fazowej w stan żelu, po ogrzaniu do około  $37^\circ C$ . Mechanizm formowania się żelu z roztworów soli chitozanowych w obecności  $\beta$ -NaGP jest w literaturze przedmiotem dyskusji, m.in. Chenite [9], Xueying Qiu [10] oraz Lavertu [11] i Filion [3]. W pracach [3,11] autorzy sugerują, że redukcja  $pK_a$  chitozanu wywołana dostarczoną energią cieplną powoduje uwolnienie protonów z cząsteczki chitozanu ( $-NH_3^+ \leftrightarrow -NH_2 + H^+$ ). Efektem neutralizacji dodatniego ładunku cząsteczki chitozanu jest zanik odpychających sił elektrostatycznych, cząsteczki polimeru zmieniają właściwości z hydrofilowych na hydrofobowe. Sprzyja to tworzeniu sztywnego układu przestrzennego w wyniku dominacji sił przyciągania między cząsteczkami polimeru.

Celem pracy było wytworzenie hydrożeli wrażliwych na zmiany temperatury z niskostężonych roztworów chlorku chitozanu bez oraz zawierających  $\beta$ -NaGP i opisanie przemiany fazowej poprzez wyznaczenie punktu żelowania i energii aktywacji.

## Materiały i metody

Do badań hydrożeli chitozanowych zastosowano trzy rodzaje chitozanu. Chitozan firmy Sigma-Aldrich pochodzenia krabowego, numer produktu 50494, numer Lot 0001424218 (dalej oznaczony jako 'crab'). Chitozan firmy Sigma-Aldrich pochodzenia krewetkowego, numer produktu 50494, numer Lot BCBB5837 (dalej oznaczony jako 'shrimp'). Chitozan firmy Fluka o nieokreślonym pochodzeniu i oznaczony przez producenta jako niskolepki, numer produktu 50949, numer Lot 1078112 (dalej oznaczony jako 'fluka'). Podstawowe parametry fizykochemiczne w postaci średniej masy cząsteczkowej (Mw) oraz stopnia deacetylacji (DD) dla poszczególnych chitozanów przedstawiono w TABELI 1. Stopień deacetylacji wyznaczono jako różnicę  $DD = 1 - DA$ . Stopień acetylacji (DA) oznaczono metodą miareczkowania.

The wide application of chitosan results, apart from the unique physicochemical properties, also from the ease of transforming it into useful forms such as powders, micro-pellets, gels, sponges or membranes.

Chitosan is solved in low concentrated solutions of organic and non-organic acids in which it forms salts with solvent ions. In an acidic environment the  $H^+$  ion is linked to the  $-NH_2$  group in the pyranose ring [5,6]. Chitosan properties change from hydrophobic to hydrophilic and a colloidal system is created in which the polymer chains remain dispersed in a continuous medium – acid solution. Such a system shows a possibility for a sol-gel phase transition. Chitosan hydrogels may form as a result of increasing the concentration of the polymer (gelation induced by concentration) [7,8], through the change of pH of the solution or through heating it [3,4,9-12]. While heating the solution, after crossing the lower critical solution temperature (LCST), a structural change of the polymer chain from a coil to a line form takes place, and mutual interactions among the functional groups of the polymer chains (in particular the  $-NH_2$  groups) are formed. The point of this transition (gelation point temperature) depends on the type of solvents and the presence of other substances influencing the pH of the solution (pH increase causes a reduction of the phase transition temperature [9]).

One of the most frequently used chitosan solvents is the solution of hydrochloric acid (HCl). Addition to the chitosan chloride solution of  $\beta$ -Glycerophosphate disodium salt ( $\beta$ -NaGP) increases the pH value of the solution. The colloidal system created in this manner remains in the form of sol at room temperature, but it undergoes a phase transition into gel after heating to approximately  $37^\circ C$ . The mechanism of forming a gel from solutions of chitosan salts in the presence of  $\beta$ -NaGP is the subject of discussion in literature, e.g. Chenite [9], Xueying Qiu [10], as well as Lavertu [11] and Filion [3]. In papers [3,11], the authors suggest that a reduction of chitosan  $pK_a$  induced by the heat energy causes the release of protons from the chitosan molecule ( $-NH_3^+ \leftrightarrow -NH_2 + H^+$ ). The effect of neutralisation of the positively charged chitosan molecule is the disappearance of repulsion electrostatic forces, the polymer molecules change their properties from hydrophilic to hydrophobic. This promotes the formation of rigid cross-linked system as a result of the domination of attraction forces among the polymer molecules.

The aim of this study was to create hydrogels sensitive to temperature changes from low-concentration solutions of chitosan chloride without and containing  $\beta$ -NaGP and to describe the phase transition by determining the gelation point and activation energy.

## Materials and methods

For the research on chitosan hydrogels three types of chitosan were used. Chitosan from Sigma-Aldrich company from crab shells, product no. 50494, lot no. 0001424218 (further labelled as 'crab'). Chitosan from Sigma-Aldrich company from shrimp shells, product no. 50494, lot no. BCBB5837 (further labelled as 'shrimp'). Chitosan from Fluka company of unspecified origin and labelled by the manufacturer as low-viscous (further labelled as 'fluka'). The basic physicochemical parameters as an average molecular weight (Mw) and the degree of deacetylation (DD) for chitosans are presented in TABLE 1. The degree of deacetylation was determined as a difference  $DD = 1 - DA$ . The degree of acetylation (DA) was determined by titration.

Średnią masę cząsteczkową (Mw) każdego z w/w produktów oznaczono metodą chromatografii żelowej (GPC/SEC) z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) na aparacie firmy KnauerSmartline, wyposażonym w analyticalisocratic Pump1000 i DRI detektor (S-2300/2400, Knauer). Pomiary pH wykonano w termostatowanym naczyniu przy użyciu pH-metru ELMETRON CP-401, wyposażonego w elektrodę do cieczy lepkich ERH-12-6. Jako rozpuszczalnika użyto wodnego roztworu kwasu solnego. Dla każdego typu chitozanu przygotowano dwa roztwory z dodatkiem disodowego  $\beta$ -glicerofosforanu ( $\beta$ -NaGP) oraz bez  $\beta$ -NaGP.

Roztwór chitozanu (2,5% w/v) został przygotowany poprzez rozpuszczenie 0,4 g chitozanu w 16 ml 0,1M roztworu HCl. Po rozpuszczeniu pojemnik z próbką przykrywano (w celu zapobiegania parowaniu) i pozostawiono na 24 h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie próbkę umieszczono w temperaturze 5°C na 2 h. Wykonano po dwie próbki roztworów dla każdego z rodzajów chitozanu. Do jednej z nich dodawano przygotowany wcześniej roztwór  $\beta$ -NaGP (2 g  $\beta$ -NaGP w 2 ml wody destylowanej) drugi roztwór pozostawiono bez  $\beta$ -NaGP.

Pomiary właściwości reologicznych roztworów chitozanowych przeprowadzono w układzie stożek-płytki reometru rotacyjnego Anton Paar Physica MR 301. Zastosowano stożek o średnicy 50 mm i kącie nachylenia 1°. Płytkę układu pomiarowego wyposażona była w układ regulacji temperatury (ogniwo Peltiera) zapewniające dokładną regulację zadanej temperatury pomiaru oraz umożliwiające sterowanie szybkością nagrzewania/chłodzenia badanej próbki.

Właściwości lepkie roztworów chitozanu określono na podstawie krzywych płynięcia. Pomiary wykonano w temperaturze 20°C w zakresie szybkości ścinania od 0,1 s<sup>-1</sup> do 1000 s<sup>-1</sup>. Pomiary właściwości lepkoprężystych niskostężonego roztworu chitozanu dokonano w liniowym zakresie lepkosprężystości przy niskiej amplitudzie odkształceń  $\gamma$  oraz stałej częstotliwości  $\omega$ . Proces żelowania prowadzono w warunkach nieizotermicznych. Roztwory chitozanu umieszczano w temperaturze 5°C (temperatura przechowywania próbki) w układzie pomiarowym reometru. Następnie próbkę ogrzewano ze stałą szybkością 1 K/min – wartość zbliżona do szybkości nagrzewania w organizmie ludzkim. Podczas procesu żelowania wyznaczono właściwości reologiczne medium. Temperaturę przemiany fazowej wyznaczono na podstawie punktu przecięcia krzywych modułów zachowawczego G' i stratności G'' (tan  $\delta$  = 1).

## Wyniki i dyskusja

Na podstawie krzywych płynięcia, opisanych modelem potęgowym Ostwalda – de Waele'a, wyznaczono współczynnik konsystencji K i współczynnik płynięcia n. Współczynniki płynięcia n przyjmowały wartości w zakresie 0,75-0,88 dla próbek z dodatkiem  $\beta$ -NaGP oraz wartości 0,80-0,96 dla próbek bez dodatku  $\beta$ -GPNa. Wszystkie roztwory wykazywały zatem właściwości zbliżone do cieczy newtonowskiej. Występowała natomiast różnica w wartościach współczynnika konsystencji K pomiędzy próbkami typu 'fluka' a pozostałymi. Dla próbek 'crab' oraz 'shrimp' wartość współczynnika konsystencji zawierała się w przedziale 2,1-2,6 [Pa·s<sup>n</sup>]. Przebiegi krzywych płynięcia i lepkości tych dwóch typów próbek były bardzo zbliżone do siebie. Dla próbek typu 'fluka' współczynnik konsystencji wahał się w przedziale 0,28-0,47 [Pa·s<sup>n</sup>]. Wartość lepkości roztworów typu 'fluka' była o rząd wielkości mniejsza w porównaniu do próbek typu 'crab' i 'shrimp'. Można zatem uznać próbki zawierające chitozan 'fluka' jako nisko-lepkie, natomiast próbki typu 'crab' i 'shrimp' określić jako wysoko-lepkie.

**TABELA 1. Masa cząsteczkowa oraz stopień deacetylacji badanych chitozanów.**

**TABLE 1. Molecular weight and deacetylation degree of tested chitosan.**

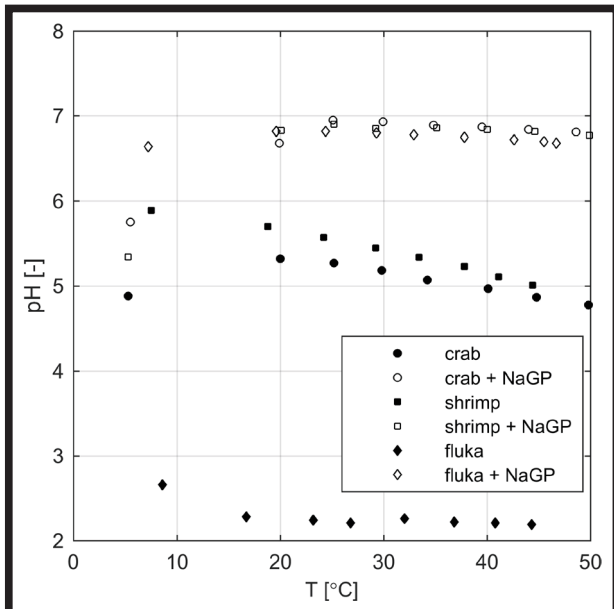
Próbki chitozanu Chitosan samples	Średnia masa cząsteczkowa Average molecular weight Mw [kDa]	Stopień deacetylacji Degree of deacetylation DD [%]
crab	680	81.8
shrimp	862	83.4
fluka	463	83.2

The average molecular weight (Mw) was determined by gel permeation chromatography (GPC/SEC) with the use of the high performance liquid chromatography (HPLC) on a KnauerSmartline company apparatus, equipped with an analytical isocratic Pump1000 and DRI detector (S-2300/2400, Knauer). pH measurements were performed in a thermostatic vessel with a pH-meter ELMETRON CP-401 equipped with an electrode for viscous liquids ERH-12-6. Aqueous solution of hydrochloric acid was used as a solvent. For each type of chitosans two solutions were prepared with and without  $\beta$ -NaGP.

The chitosan solution (2.5% w/v) was prepared by dispersing 0.4 g chitosan in 16 ml 0.1M HCl solution. After dispersion, the container with the sample was covered (in order to prevent vaporisation) and left for 24 h at room temperature. After that time the sample was left at temperature 5°C for 2 h. Two samples were made for each kind of chitosan. A previously prepared solution of  $\beta$ -NaGP (2 g  $\beta$ -NaGP in 2 ml distilled water) was added to one of them, whereas the other solution was left without  $\beta$ -NaGP.

The measurements of rheological properties of the chitosans solutions were conducted in a cone-plate system of a rotational rheometer Anton Paar Physica MR 301. A cone of 50 mm diameter and 1° slope angle was used. The plate of the measuring system was equipped with a temperature regulation system (a Peltier cell) ensuring accurate regulation of the desired measurement temperature and enabling to steer the speed of heating/cooling the tested sample.

Viscous properties of chitosan solutions were determined based on the flow curves. The measurements were performed at 20°C in the shear rate range from 0.1 s<sup>-1</sup> to 1000 s<sup>-1</sup>. The measurements of viscoelastic properties of low concentrated chitosan solution were made in the linear range of viscoelasticity at low amplitude of deformations  $\gamma$  and constant angular frequency  $\omega$ . The gelation process was conducted in non-isothermal conditions. Chitosan solutions were loaded at 5°C (sample storage temperature) in the measuring system of a rheometer. Next the samples were heated with a constant speed of 1 K/min – a value approximate to the heating speed in a human body. During the gelation process the rheological properties of the medium were determined. Based on the intersection point of the storage modulus G' and loss modulus G'' curves, the phase transition temperature was determined (tan  $\delta$  = 1).



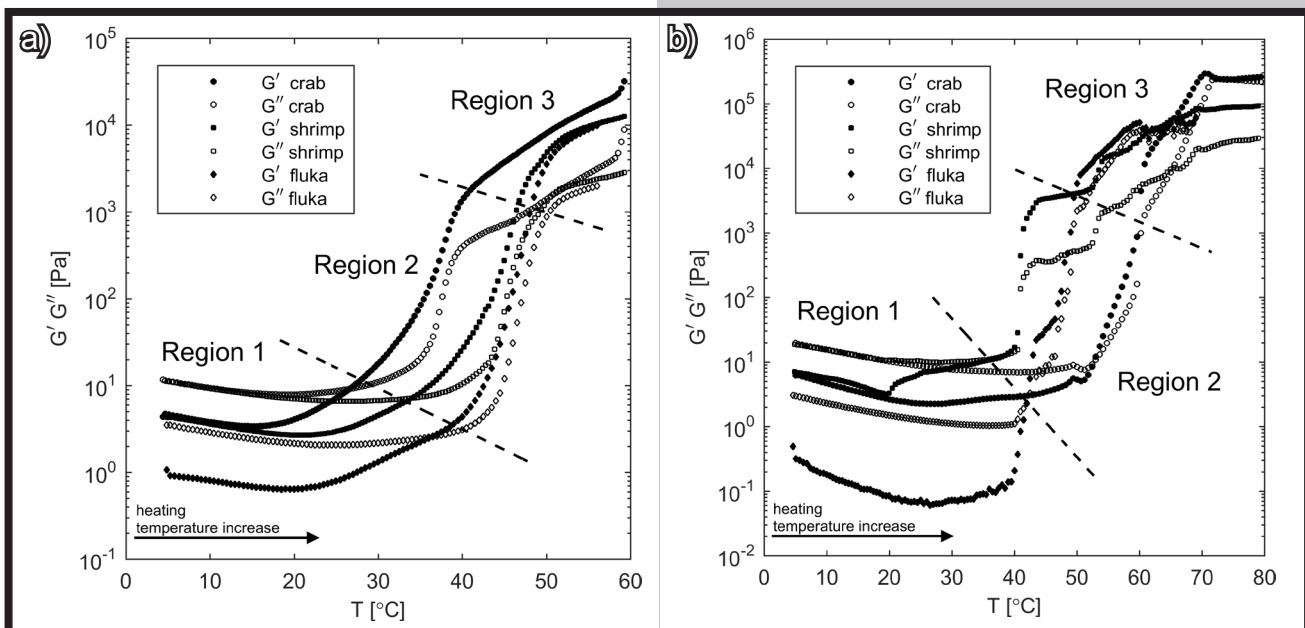
**RYS. 1.** Wpływ temperatury na wartość pH dla różnych roztworów chitozanu.  
**FIG. 1.** Influence of the temperature on the pH value for different chitosan solutions.

Zmiany wartości pH dla różnych temperatur roztworów przedstawiono na RYS. 1. Z przebiegu tych zmian wynika, że istotny wpływ na wartość pH (ilość jonów  $H^+$  przyłączanych do grup  $-NH_2$  chitozanu) ma obecność  $\beta$ -NaGP. Dla próbek zawierających dodatek tej soli wartość pH jest praktycznie stała, niezależna od temperatury, a odczyn roztworu zbliżony do obojętnego ( $pH \sim 7$ ). W przypadku roztworów nie zawierających  $\beta$ -NaGP, wartości pH są niższe. Najniższe pH roztworu uzyskuje się w przypadku chlorku z niskolepkiego chitozanu fluka; jest ono zbliżone do pH rozpuszczalnika chitozanu czyli 0.1 M HCl i wynosi około 2.5, a zatem prawdopodobnie znaczna część grup  $-NH_2$  nie uległa protonacji.

## Results and discussion

Based on the flow curves described by power law model of a Ostwald - de Waele the flow consistency index  $K$  and flow behaviour index  $n$  were determined. Flow behaviour index assume values in the range of 0.75-0.88 for the samples with the addition of  $\beta$ -NaGP and the values of 0.80-0.96 for the samples without  $\beta$ -NaGP. Thus all solutions exhibit nature approximating to properties of a Newtonian fluid. Whereas there is a difference in the values of flow consistency index between 'fluka' sample and the others. For a 'crab' and 'shrimp' samples the value of flow consistency index was in the range 2.1-2.6 [ $Pa \cdot s^n$ ]. The courses of the flow and viscosity curves of these two types of samples were very similar to each other. For 'fluka' samples flow consistency index was within the range 0.28-0.47 [ $Pa \cdot s^n$ ]. Viscosity values of 'fluka' solutions were an order of magnitude smaller compared to the 'crab' and 'shrimp' samples. Therefore samples containing 'fluka' chitosan can be considered as low-viscous, whereas the 'crab' and 'shrimp' samples can be described as high-viscous.

The changes in pH values for different temperatures of solutions are presented in FIG. 1. From FIG. 1 it can be seen that the pH value (the number of  $H^+$  ions connected with  $-NH_2$  chitosan groups) is significantly influenced by the presence of  $\beta$ -NaGP. For samples containing an addition of  $\beta$ -NaGP the pH value is almost constant, regardless of the temperature, and the pH of the solution is close to neutral ( $pH \sim 7$ ). In the case of solutions not containing  $\beta$ -NaGP, the pH values are lower. The lowest pH of the solution is observed for the low-viscous fluka chitosan; its value is approximately equal to the pH of chitosan solvent, i.e. 0.1 M HCl and amounts to 2.5. Thus a significant fraction of  $-NH_2$  groups was probably not ionized. It suggests that this chitosan in the solution forms entangled and rigid coils and access to hydrogen ions is more difficult.



**RYS. 2.** Zmiany modułów zachowawczego  $G'$  i stratności  $G''$  w funkcji przyrostu temperatury: a) próbki z dodatkiem  $\beta$ -NaGP, b) próbki bez dodatku  $\beta$ -NaGP.  
**FIG. 2.** The evolution of storage modulus  $G'$  and loss modulus  $G''$  as a function of temperature increase: a) samples with addition of  $\beta$ -NaGP, b) samples without addition of  $\beta$ -NaGP.

Sugeruje to, że chitozan ten występuje w roztworze w postaci sztywnych, zwiniętych kłębków i dostęp jonów wodoru jest utrudniony. pH roztworów chitozanów o większych masach cząsteczkowych jest wyższe niż pH rozpuszczalnika, co wskazuje, że do części grup  $-NH_2$  zostały przyłączone jony  $H^+$ , przy czym im większa średnia masa cząsteczkowa tym pH wyższe. Wzrost temperatury dla tych roztworów powoduje zmniejszenie stopnia dysocjacji  $pK_a$ , zgodnie z danymi przedstawionymi w literaturze [3,11].

### Wpływ temperatury na właściwości reologiczne

Zmiany modułów zachowawczego  $G'$  i stratności  $G''$  w funkcji przyrostu temperatury pokazano na RYS. 2 odpowiednio dla układów z dodatkiem  $\beta$ -NaGP oraz bez. Na wykresach można zaobserwować trzy charakterystyczne regiony. W regionie 1, próbki chitozanu przejawiają zachowanie typowe dla cieczy lepkosprężystej. W obszarze tym moduł stratności (reprezentujący właściwości lepkie medium) dominuje nad modułem zachowawczym (reprezentującym właściwości sprężyste medium). Jednocześnie wartości obu modułów, a tym samym lepkości zespolonej zmniejszają się wraz ze wzrostem temperatury i potwierdzają generalną zależność spadku lepkości cieczy ze wzrostem temperatury [13]. Zgodnie z zależnością Stokesa–Einsteina, wzrasta współczynnik dyfuzji i następuje intensyfikacja samoistnego ruchu molekuł wewnątrz roztworu. W regionie 2 wartości modułów zachowawczego i stratności gwałtownie wzrastają. Jest to wynikiem tworzenia się struktury usieciowanej (żelu). Obserwuje się również wzrost dominacji modułu zachowawczego nad modułem stratności. Wartość współczynnika tłumienia  $\tan(\delta) = G''/G'$  maleje poniżej jedności. Właściwości sprężyste zaczynają przeważać nad właściwościami lepkiemi. Powstała struktura charakteryzuje się właściwościami ciała stałego. W obszarze końcowym (region 3), proces żelowania przebiega z mniejszą szybkością. Wynika to z dużych wartości lepkości medium, spowalniającej dyfuzję cząstek. Charakter powstałej struktury zmienia się z postaci miękkiej gumy do postaci szklistej.

Przebiegi krzywych na RYS. 2 wskazują również różnicę w kinetyce żelowania roztworów chitozanów z dodatkiem  $\beta$ -NaGP oraz bez udziału tego związku. Pierwszą charakterystyczną różnicą są położenia punktu żelowania czyli temperatury przemiany fazowej, którą wyznacza punkt przecięcia się modułów  $G'$  i  $G''$ . Porównując dwa typy roztworów (z oraz bez  $\beta$ -NaGP) dla poszczególnych próbek chitozanu można zaobserwować niższą temperaturę żelowania dla roztworów zawierających  $\beta$ -NaGP. Jest to związane z wyższą wartością pH tych roztworów, ponieważ dodatek  $\beta$ -NaGP pełni rolę buforu i neutralizuje odczyn próbki (RYS. 1). W początkowej fazie procesu w obu typach roztworów, głównym czynnikiem odpowiedzialnym za hydrofilowość (a tym samym stabilność roztworów) jest obecność dodatnio naładowanych grup  $-NH_3^+$  w łańcuchach chitozanu. Wraz ze wzrostem temperatury (dostarczania energii) grupy aminowe ulegają dejonizacji [3,11], która prowadzi do zmiany charakteru cząsteczek chitozanu z hydrofilowego na hydrofobowy. Obecność cząstek  $\beta$ -NaGP, które w roztworze występują w postaci zdysocjowanej na jony  $Na^+$  i  $\beta-GP^{2-}$ , powoduje szybszą neutralizację protonów  $H^+$  i pozwala siłom hydrofobowym (odpowiedzialnym za wzajemne przyciąganie się łańcuchów polisacharydu – formowaniem się żelu) na osiągnięcie przewagi. Brak dodatku  $\beta$ -NaGP utrudnia powstanie oddziaływań między grupami aminowymi chitozanu i tym samym powoduje podwyższenie temperatury żelowania tego typu układów. Druga zasadnicza różnica w zjawisku żelowania, między oboma typami roztworów, uwidacznia się w dynamice przemian w regionie 2. Można zaobserwować gwałtowniejszą przemianę dla roztworów bez dodatku  $\beta$ -NaGP w porównaniu z roztworami zawierającymi bufor.

The pH of solutions from chitosans with greater molecular weight is higher than the pH of the solvent, which indicates that  $H^+$  ions were linked with a part of  $-NH_2$  groups. The greater the average molecular weight, the higher the pH. An increase in temperature for these solutions causes a reduction in the degree of dissociation  $pK_a$ , in accordance with the data presented in literature [3,11].

### Influence of temperature on rheological properties

The evolution of storage modulus  $G'$  and loss modulus  $G''$  as a function of temperature increase is shown in FIG. 2 for systems with and without the addition of  $\beta$ -NaGP, respectively. On the graphs three characteristic regions can be observed. In region 1, the chitosan samples show a typical behaviour for a viscoelastic liquid. In this area the loss modulus (representing the viscous properties of the medium) dominates over the storage modulus (representing the elastic properties of the medium). At the same time the values of both moduli, and thus the complex viscosity decrease with the increase of temperature and confirm the general dependency of viscosity decrease of liquid with the temperature increase [13]. In accordance with the Stokes-Einstein dependency, the diffusion coefficient increases and next an intensification of self-induced molecule movement inside the solution takes place. In region 2, the values of the storage modulus and the loss modulus rise rapidly. This is a result of the creation of a crosslinked structure (gel). An increase of domination of the storage modulus over the loss modulus was also observed. The value of the damping factor  $\tan(\delta) = G''/G'$  decreases below one. The elastic properties begin to dominate over the viscous properties. The forming structure is characterized by solid-like properties. In the final area (region 3), the gelation process proceeds more slowly. This results from large viscosity values of the medium, slowing down the diffusion of the molecules. The character of the forming structure changes from the form of rubber-like to glass-like form.

The courses of the curves in FIG. 2 also indicate a difference in the gelation kinetics of chitosan solutions with and without  $\beta$ -NaGP. The first characteristic difference is the position of the gelation point, i.e. the phase transition temperature which is determined by the intersection of moduli  $G'$  and  $G''$ . Comparing the two types of solutions (with and without  $\beta$ -NaGP) for each chitosan samples, a lower gelation temperature for solutions containing  $\beta$ -NaGP can be noticed. This is related to a higher pH value of these solutions, since the addition of  $\beta$ -NaGP functions as a buffer and neutralizes the pH of the sample (FIG. 1). In the initial phase of the process in both types of solutions the main factor responsible for the hydrophilic properties (and thus the stability of the solutions) is the presence of positively charged  $-NH_3^+$  groups in chitosan chains. With the increasing temperature (input of energy) the amino groups are deionized [3,11], which leads to a change of character of the chitosan molecules from hydrophilic to hydrophobic. The presence of  $\beta$ -NaGP molecules which exist in the solution in the form dissociated  $Na^+$  and  $\beta-GP^{2-}$  ions causes a faster neutralisation of  $H^+$  protons and allows the hydrophobic forces (responsible for the attraction between the polysaccharide chains – gel formation) to reach an advantage. No addition of  $\beta$ -NaGP makes the interactions among chitosan amino groups difficult to create and thus causes an increase in the gelation temperature of this type of systems. Another basic difference in the gelation phenomenon between the two types of solutions is revealed in the dynamics in region 2. A more rapid modulus increase for solutions without the addition of  $\beta$ -NaGP compared with the solutions containing the buffer can be observed.

### Nieizotermiczna kinetyka żelowania

Analiza zmian wartości modułu zachowawczego  $G'$  oraz zastosowanie modelu kinetyki krystalizacji polimeru, który jest połączeniem równania Arrheniusa i zależności czasowo-temperaturowej pozwalają wyznaczyć energię aktywacji dla procesu żelowania [14-16]. Dla procesu żelowania, zachodzącego przy wzroście temperatury, równanie kinetyki [14] przyjmuje postać:

$$\ln\left(\frac{1}{G'^n} \frac{dG'}{dt}\right) = \ln k_0 + \left(\frac{E_a}{RT}\right) \quad (1)$$

gdzie:

- $G'$  – moduł zachowawczy [Pa]
- $n$  – rząd szybkości reakcji
- $t$  – czas [s]
- $k_0$  – współczynnik częstości Arrheniusa
- $E_a$  – energia aktywacji procesu [J mol<sup>-1</sup>]
- $R$  – stała gazowa [J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>]
- $T$  – temperatura absolutna [K]

Wykładnik  $n$  oznacza wymiar rosnących kryształów  $r$  oraz typ zarodkowania  $s$  ( $n = r + s$ ). Parametr  $r$  przyjmuje wartości 1, 2 lub 3 odpowiednio dla struktur jedno-, dwu- lub trzywymiarowych (pręt, dysk, sfera), natomiast  $s$  przyjmuje wartość 0 dla układów z istniejącymi już jądrami zarodkowymi lub 1 dla układów z rosnącą w czasie ilością jąder zarodkowych [17]. W obliczeniach przyjęto parametr  $n = 2$  w oparciu o badania przedstawione przez autorów [18, 19], dotyczące podobnych układów polimerowych. Wielkość  $dG'/dt$  w równaniu (1) oznacza tzw. szybkość rozwoju struktury. W celu określenia wartości  $dG'/dt$  wykonano regresję wielomianową zależności modułu  $G'$  od czasu  $t$ , a następnie zróżniczkowano ten wielomian. Wykreślając zależność  $\ln(1/G'^n \cdot dG'/dt)$  vs  $1/T$  z nachylenia krzywej wyznaczono wartość energii aktywacji  $E_a$  (RYS. 3).

### Non-isothermal kinetics of gelation

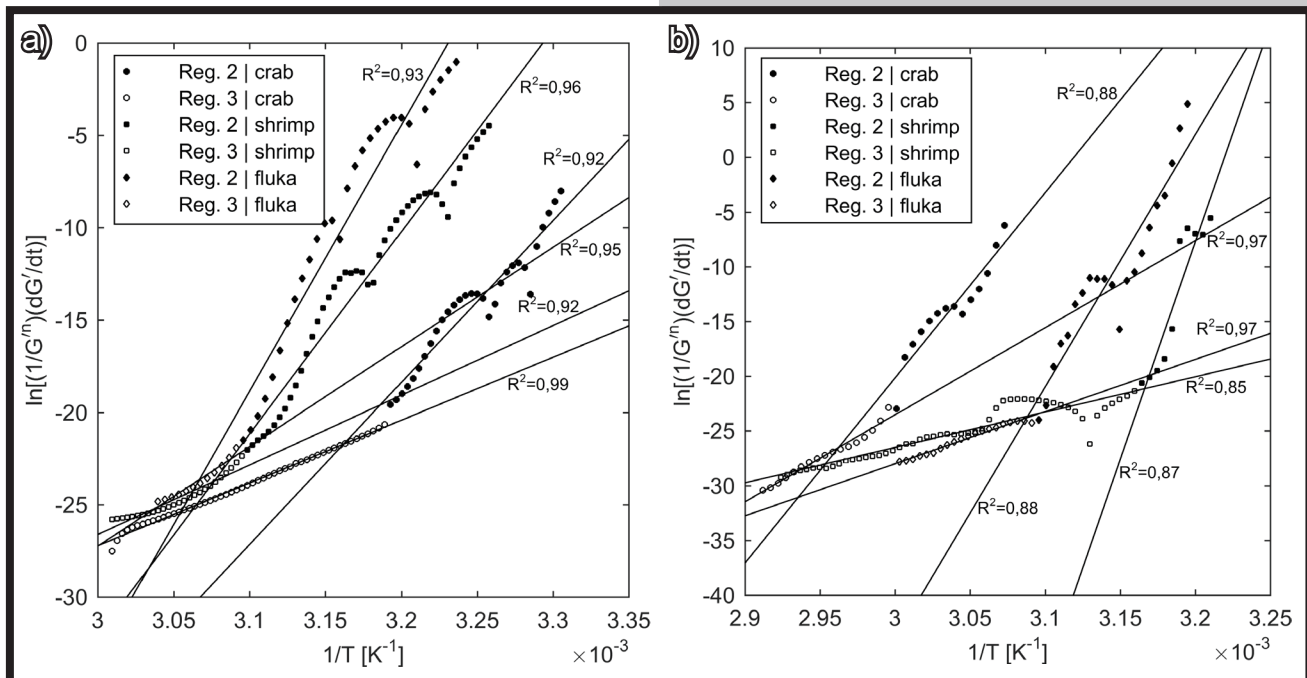
An analysis of the changes in the values of the storage modulus  $G'$  and the use of kinetics model of polymer crystallization which is a combination of the Arrhenius equation and the time-temperature relationship allow to determine the activation energy for the gelation process [14-16]. For the gelation process taking place with a temperature increase, the kinetics equation [14] takes the following form:

$$\ln\left(\frac{1}{G'^n} \frac{dG'}{dt}\right) = \ln k_0 + \left(\frac{E_a}{RT}\right) \quad (1)$$

where:

- $G'$  – storage modulus [Pa]
- $n$  – reaction speed rate
- $t$  – time [s]
- $k_0$  – Arrhenius frequency coefficient
- $E_a$  – process activation energy [J mol<sup>-1</sup>]
- $R$  – gas constant [J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>]
- $T$  – absolute temperature [K]

Exponent  $n$  indicates the dimension of the growing crystals  $r$  and the type of nucleation  $s$  ( $n = r + s$ ). Parameter  $r$  assumes values 1, 2 or 3 respectively for one-, two- or three-dimension structures (rod, disk, sphere), whereas  $s$  assumes value 0 for systems with existing nucleation cores (predetermined nucleation), or 1 for systems with a nucleation cores growing with time [17]. In the calculations parameter  $n = 2$  was adopted on the basis of research presented by authors [18, 19], regarding similar polymer systems. Value  $dG'/dt$  in the equation (1) is the structure development rate. In order to specify the term  $dG'/dt$ , polynomial regression was made from data of modulus  $G'$  as a function of time  $t$ , and next this polynomial was differentiated. The relationship  $\ln(1/G'^n \cdot dG'/dt)$  vs  $1/T$  allows to determine the value of activation energy  $E_a$  from the slope of the plot (FIG. 3).



RYS. 3. Zależność czasowo-temperaturowa na wykresie Arrheniusa pozwalająca wyznaczyć energię aktywacji: a) próbki z dodatkiem  $\beta$ -NaGP, b) próbki bez dodatku  $\beta$ -NaGP.

FIG. 3. The time-temperature relationship on Arrhenius plot enabling to determination of activation energy: a) samples with addition of  $\beta$ -NaGP, b) samples without addition of  $\beta$ -NaGP.

**TABELA 2. Wartości wyznaczonych energii aktywacji, czasy oraz temperatury żelowania.**  
**TABLE 2. Determined values of activation energy, gelation times and temperatures.**

Próbki chitozanu Chitosan samples	Energia aktywacji / Activation Energy $E_a$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]		Czas żelowania Gelation time $t_{gel}$ [s]	Temperatura żelowania Gelation temperature $T_{gel}$ [°C]
	Region 2	Region 3		
crab + $\beta$ -NaGP	729	283	1329	26.6
crab	1406	661	2909	53.0
shrimp + $\beta$ -NaGP	910	313	1790	34.3
shrimp	3302	269	2040	38.5
fluka + $\beta$ -NaGP	1198	448	1920	36.5
fluka	1916	396	2249	42.0

Na podstawie równania (1) wyznaczono energię aktywacji poszczególnych próbek chitozanu dla regionów 2 i 3. Wartości wyznaczonych energii przedstawiono na RYS. 3 oraz w TABELI 2. Dla regionu 2, porównanie próbek roztworów chitozanu tego samego typu w dwóch wariantach (z dodatkiem i bez  $\beta$ -NaGP) wskazuje, że formowanie się struktury jest bardziej korzystne energetycznie dla roztworów z dodatkiem słabej zasady ( $\beta$ -NaGP). Porównanie wartości energii między obszarami 2 i 3 sugeruje, że w regionie 3 rozwój struktury jest energetycznie łatwiejszy. Jednak jak wspomiano powyżej, proces żelowania w tym regionie jest silnie ograniczony przez dyfuzję z powodu wysokich wartości lepkości roztworu. Potwierdza to dużo niższy przyrost  $\Delta G'$  w tym obszarze w porównaniu do przyrostów  $\Delta G'$  jakie zaszły w regionie 2. Wskazuje to również na to, że region 2 jest kluczowym obszarem w procesie żelowania, pochłaniającym najwięcej dostarczonej energii cieplnej.

Rozpatrując korzyści energetyczne, chitozan typu shrimp w roztworze HCl bez  $\beta$ -NaGP indukował największy koszt energetyczny (3302 kJ/mol). Jednak roztwór z tego chitozanu z dodatkiem roztworu słabej zasady wykazywał znacząco niższe zapotrzebowanie energetyczne (910 kJ/mol) dla przemiany fazowej. Roztworem wymagającym najmniej energii aktywacji do sieciowania był chlorek z chitozanu crab. Zarówno w wariancie z dodatkiem  $\beta$ -NaGP, jak i bez, wartości energii  $E_a$  wyniosły odpowiednio 729 kJ/mol oraz 1406 kJ/mol. Największej ilości dostarczonej energii cieplnej wymagał niskolepki chitozan fluka. Jest to prawdopodobnie spowodowane tym, że występuje w roztworze w postaci sztywnych zwiniętych kłębków, z większością grup hydrofobowych na zewnątrz. Powyższe sugestie wymagają potwierdzenia metodami reologii optycznej np. badaniem zmian rozproszenia światła przez cząstki polimeru podczas deformacji mechanicznej (small-angle light scattering – SALS) lub metodami strukturalnymi (Fourier transform infrared spectroscopy – FTIR, rentgenowskiej spektrometrii fotoelektronów – XPS itp.).

## Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że układy koloidalne chlorku chitozanu niezależnie od zawartości  $\beta$ -NaGP wykazują przemianę zol-żel pod wpływem wzrostu temperatury niezależnie od pochodzenia chitozanu i jego masy cząsteczkowej.

Punkt żelowania – temperatura tej przemiany zależy od wartości pH roztworu (stopnia dysocjacji pKa [3,9,11]) oraz średniej masy cząsteczkowej polimeru [12].

Based on the equation (1) activation energy of specified chitosan samples for regions 2 and 3 was determined. The determined values of energy are presented in FIG. 3 and in TABLE 2. For region 2, a comparison of chitosan solutions samples of the same type in two versions (with and without the addition of  $\beta$ -NaGP) indicates that the formation of the structure is more energetically advantageous for solutions with the addition of a weak alkali ( $\beta$ -NaGP). A comparison of the energy values between areas 2 and 3 suggests that in region 3 the development of the structure is energetically easier. However, as it was mentioned above, the gelation process in this region is highly restricted by diffusion due to high viscosity values of the solution. This is confirmed by a smaller  $\Delta G'$  increase in this area compared with the  $\Delta G'$  increase which took place in region 2. This also indicates that region 2 is the key area in the gelation process, absorbing the most input heat energy.

Considering the energetic benefits, the shrimp chitosan in a solution without  $\beta$ -NaGP induced the highest energetic cost (3302 kJ/mole). However, a solution of this chitosan with the addition of a weak alkali showed a significantly lower energetic need (910 kJ/mole) for the phase transition. The solutions requiring the least activation energy for crosslinking were the crab chitosan solutions, both in the version with the addition of  $\beta$ -NaGP and without it. The energy values  $E_a$  were 729 kJ/mole and 1406 kJ/mole, respectively. The sample which required the largest amount of input heat energy was the low viscous fluka chitosan. This is probably related with the entangled and rigid form of this chitosan and dominance of hydrophobic groups outside the chain. The above suggestions need to be confirmed with optical rheology methods, e.g. light scattering experiments in polymer molecules during the mechanical deformation (small-angle light scattering – SALS) or with spectroscopy methods (Fourier transform infrared spectroscopy – FTIR, X-ray photoelectron spectroscopy – XPS, etc.).

## Conclusions

Based on the conducted research it was stated that colloidal systems of chitosan chloride, regardless of the  $\beta$ -NaGP addition, origins and molecular weight, revealed a sol-gel transition under the effect of a temperature increase.

Gelation point – the temperature of sol-gel transition depends on the pH value of the solution (degree of dissociation pKa [3,9,11]) and the average molecular weight of the polymer [12].

Przemiana fazowa zol-żel chlorku chitozanu podczas ogrzewania ze stałą szybkością narastania temperatury dokonuje się w trzech charakterystycznych obszarach: (1) roztwory przejawiają zachowania cieczy lepkosprężystej, (2) proces szybkiego sieciowania w pobliżu punktu żelowania – tworzenie się struktury miękkiej gumy, (3) proces wolnego żelowania przy wysokich temperaturach – formowanie się struktury szklistej.

Z punktu widzenia zastosowań medycznych, układy z dodatkiem słabej zasady ( $\beta$ -NaGP) są bardziej pożądane. Temperatury przemiany fazowych tych układów są zbliżone do temperatury fizjologicznej człowieka ( $\sim 37^\circ\text{C}$ ) w przeciwieństwie do układów bez dodatku  $\beta$ -NaGP, gdzie punkt przemiany fazowej znacznie przekracza tę temperaturę.

Na podstawie modelu kinetycznego wyznaczono energię aktywacji procesu żelowania i stwierdzono, że roztwory chlorku chitozanu z  $\beta$ -NaGP do przejścia zolu w żel wymagają znacznie niższych energii niż analogiczne układy bez  $\beta$ -NaG. Najkorzystniejszym energetycznie układem był roztwór chitozanu krabowego z dodatkiem  $\beta$ -NaGP.

## Podziękowania

Praca wykonana w ramach Grantu NCN UMO-2014/15/B/ST8/02512 pt. „Badanie kinetyki przemiany fazowej układów chitozanowych wrażliwych na wzrost temperatury”.

The processes of sol-gel phase transition of chitosans chloride solutions under the effect of constant heating rate revealed in three characteristic regions: (1) the solutions exhibit the behaviours of a viscoelastic liquid, (2) the process of fast crosslinking near to the gelation point – creation of a rubber-like structure, (3) the process of slow gelation at high temperatures – formation of a glass-like structure.

From the viewpoint of medical use, the systems with the addition of a weak alkali ( $\beta$ -NaGP) are more desirable. The phase transition temperatures of these systems are near to the human body temperature ( $\sim 37^\circ\text{C}$ ) as opposed to systems without the addition of  $\beta$ -NaGP where the phase transition point drastically exceeds that temperature.

Based on the kinetics model the activation energy of the gelation process was determined. It was stated that phase transition processes of chitosan chloride solutions with  $\beta$ -NaGP require far lower energy than analogous systems without  $\beta$ -NaG. The most energetically beneficial system was the crab chitosan solution with the addition of  $\beta$ -NaGP.

## Acknowledgements

The work was conducted within Grant NCN UMO-2014/15/B/ST8/02512 entitled 'Research on the kinetics of phase transition of chitosan systems sensitive to a temperature increase'.

## Piśmiennictwo

- [1] Mochalova A. E., Budruev A. V., Oleinik A. V., Smirnova L. A.: Thermo and pH-sensitive hydrogels on chitosan base, obtained with use of diazide of terephthalic acid. *Perspektivnye Materialy* 5 (2009) 61-65.
- Мочалова А.Е., Бударев А.В., Олейник А.В., Смирнова Л.А.: Термо- и pH- чувствительные гидрогели на основе хитозана полученные с использованием диазида терефталевой кислоты. *Перспективные материалы* 5 (2009) 61-65.
- [2] Ravichandran R., Sundarajan S., Venugopal J.R., Mukherjee S., Ramakrishna S.: *Advances in Polymeric Systems for Tissue Engineering and Biomedical Applications*. *Macromolecular Bioscience* 12 (2012) 286-311.
- [3] Lavertu M., Filion D., Buschmann M.D.: Ionization and Solubility of Chitosan Solutions Related to Thermosensitive Chitosan/Glycerol-Phosphate Systems. *Biomacromolecules* 8 (2007) 3224-3234.
- [4] Skwarczyńska A.: *Kompozytowe termowrażliwe żele chitozanowe do zastosowań biomedycznych*, (rozprawa doktorska) Politechnika Łódzka, Łódź 2014.
- [5] Park J. W., Choi K.-H., Park K. K.: Acid-Base Equilibria and Related Properties of Chitosan. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 4 (1983) 68-71.
- [6] Vachoud L., Zydowicz N., Domard A.: Formation and characterisation of a physical chitin gel. *Carbohydrate Research* 302 (1997) 169-177.
- [7] Hamdine M., Heuzey M.-C., Begin A.: Viscoelastic properties of phosphoric and oxalic acid-based chitosan hydrogels. *Rheologica Acta* 37 (2005) 1-17.
- [8] Iversen C., Kjoniksen A. L., Nystrom B., Nakken T., Palmgren O., Tande T.: Viscosity of Dilute Aqueous Solutions of Hydrophobically Modified Chitosan and Its Unmodified Analogue at Different Conditions of Salt and Surfactant Concentrations. *Langmuir* 13 (1997) 4948-4952.
- [9] Chenite A., Gori S., Shive M., Desrosiers E., Buschmann M.D.: Monolithic gelation of chitosan solutions via enzymatic hydrolysis of urea. *Carbohydr Polym* 64 (2006) 419-424.

## References

- [10] Xueying Q., Yuhong Y., Liping W., Shanling L., Zhengzhong Sh., Xin Ch., 2011. Synergistic interactions during thermosensitive chitosan- $\beta$ -glycerophosphate hydrogel formation. *RSC Advances* 1 (2011) 282-289.
- [11] Lavertu M., Filion D., Buschmann M.D., 2008. Heat-Induced Transfer of Protons from Chitosan to Glycerol Phosphate Produces Chitosan Precipitation and Gelation. *Biomacromolecules* 9 (2008) 640-650.
- [12] Cho J., Heuzey M.-C., Begin A., Carreau P. J.: Viscoelastic properties of chitosan solutions: Effect of concentration and ionic strength. *Journal of Food Engineering* 74 (2006) 500-515.
- [13] Li L., Thangamathesvaran P. M., Yue C. Y., Tam K. C., Hu X., Lam Y. C.: Gel Network Structure of Methylcellulose in Water. *Langmuir* 17 (2001) 8062-8068.
- [14] Lopes da Silva J.A., Goncalves M.P., Rao M. A.: Kinetics and thermal behaviour of the structure formation process in HMP/sucrose gelation. *International Journal of Biological Macromolecules* 17 (1995) 25-32.
- [15] Fu J.-T., Rao M. A.: Rheology and structure development during gelation of low-methoxyl pectin gels: The effect of sucrose. *Food Hydrocolloids*, 15 (2001) 93-100.
- [16] Ross-Murphy S. B.: The estimation of junction zone size from gel time measurements. *Carbohydrate Polymers* 14 (1991) 281-294.
- [17] McIver R. G., Axford D. W. E., Colwell K. H., Elton G. A. H.: Kinetic study of the retrogradation of gelatinized starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 19 (1968) 560-563.
- [18] Cho J., Heuzey M.-C., Begin A., Carreau P. J.: Chitosan and glycerophosphate concentration dependence of solution behaviour and gel point using small amplitude oscillatory rheometry. *Food Hydrocolloids* 20 (2006) 936-945.
- [19] Cho J., Heuzey M.-C., Begin A., Carreau P. J.: Physical Gelation of Chitosan in the Presence of  $\beta$ -Glycerophosphate - The Effect of Temperature. *Biomacromolecules* 6 (2005) 3267-3275.