

Dorota BINIAŚ¹, Anna BIERNAT²

¹ University of Bielsko-Biala, Department of Materials Engineering, Willowa 2, 43-309 Bielsko-Biala, Poland

² Graduate of the University of Bielsko-Biala, Poland

ORCID / e-mail:

¹ 0000-0002-2548-1774 / dbinias@ath.bielsko.pl

Formowanie materiałów chitynowych przy zastosowaniu elektroprzędzenia

Słowa kluczowe:

włókna, sfery, chityna, kwas fosforowy, FTIR

Formation chitin materials with the use of electrospinning

Keywords:

fibres, spheres, chitin, phosphoric acid, FTIR

Abstract

As part of the research, chitin materials were obtained using the electrospinning method. For this purpose, chitin solutions were prepared in phosphoric acid and lithium chloride in an amide solvent. The coagulation of chitin materials was performed in alkaline water baths and in distilled water. As a result of the method, microspheres and microfibers of chitin were obtained. The morphological structure of the obtained materials was analyzed using a scanning electron microscope (SEM) and an optical microscope. The obtained microspheres were characterized by a similar diameter value, amounting to 195 μm . In contrast, chitin microfibers from 90 to 150 μm . The obtained materials were subjected to mid-infrared and Raman spectrophotometric tests in order to determine the influence of the solvents used on the chemical structure of native and regenerated chitin. Infrared spectroscopy studies confirmed no changes in the chemical structure of regenerated chitin. Raman spectroscopy studies confirmed no degradation of regenerated chitin. In the spectra obtained, differences were observed in the form of changes in the shape of the bands for oscillators be associated in intermolecular interactions, which is caused by changes in the supermolecular structure.

1. WSTĘP

Chityna, obok celulozy, jest drugim najczęściej występującym polisacharydem. Wykazuje działanie homeostatyczne, przyspiesza gojenie się ran, redukuje blizny, zapobiega stanom zapalnym, wzmacnia odporność organizmu bez powodowania reakcji ubocznych [Rinaudo 2006]. Chityna posiada uporządkowaną strukturę krystaliczną, która jest stabilizowana przez oddziaływania wodorowe, powstające pomiędzy grupami C-O...NH w sąsiednich łańcuchach makrocząsteczek. Chityna występuje w trzech odmianach polimorficznych – w zależności od jej pochodzenia wyróżniamy odmiany: α , β , γ . Poszczególne formy chityny różnią się między sobą sposobem wzajemnego ułożenia łańcuchów i rozmiarem komórek elementarnych [Blackwell 1969, Saito i in. 2000, Bogdanova i in. 2016, Suenaga i in. 2017].

Od wielu lat prowadzone są badania związane z modyfikacją chityny w celu poprawy jej rozpuszczalności, które pozwolą na opracowanie prostego procesu technologicznego przetwarzania chityny natywnej. Ze względu na zwartą strukturę, dużą ilość oddziaływań wodorowych, chityna jest nierozpuszczalna w popularnych rozpuszczalnikach organicznych, stąd poszukiwanie nowych możliwości, które ułatwią jej przetwarzanie. W ostatnich latach obserwuje się zintensyfikowanie prac nad zastosowaniem cieczy jonowych do rozpuszczania chityny [Prasad i in. 2009, Jaworska i Gorak 2016, Singh 2019], bądź też mieszaniny chlorku litu w dimetyloacetamidzie [Biqiong i in. 2004, de Vasconcelos i in. 2011]. Stosowane rozpuszczalniki mogą rozpuszczać pewne frakcje cząsteczkowe chityny, a inne mogą prowadzić do degradacji łańcucha polimerowego. Prowadzono również prace nad zastosowaniem kwasu fosforowego do rozpuszczania polisacharydów [Vincendon 1997, Boerstael i in. 2001, Wu i in. 2016].

Strukturę nadcząsteczkową chityny natywnej oraz po modyfikacjach można analizować przy zastosowaniu metod spektroskopowych [Cárdenas i in. 2004, Kumirska i in. 2010, Binias i in. 2016].

Materiały uzyskane metodą elektroprzędzenia cechuje duży stosunek powierzchni na jednostkę masy materiału i wysoka porowatość. Właściwości te sprzyjają zastosowaniu formowanych materiałów, w tym chitynowych, w medycynie jako opatrunki, przyspieszające gojenie się ran, skafoldy w inżynierii tkankowej, ale także jako materiały służące do kontrolowanego dostarczania leków [Min i in. 2004, Ding i in. 2014].

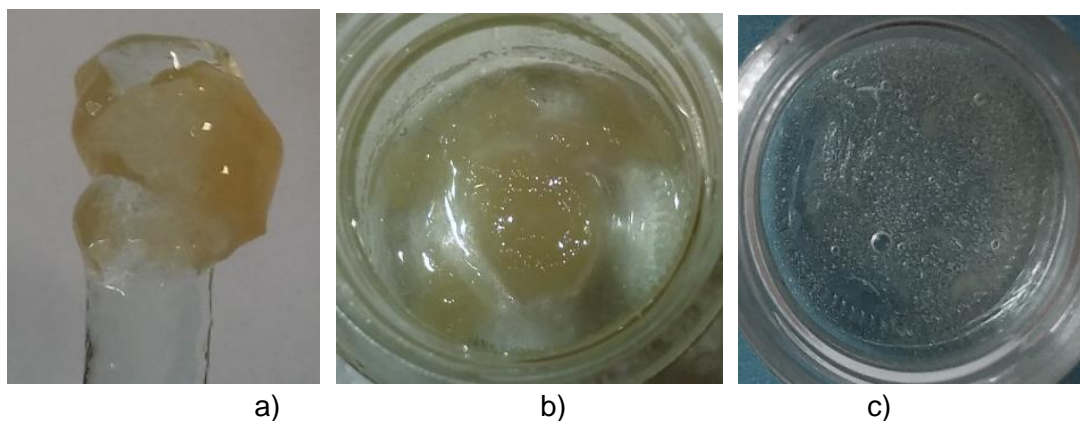
2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

2.1. Materiały i formowanie włókien

Zastosowane do badań materiały to: chityna krewetkowa ($C_8H_{13}O_5N$)_n z firmy Sigma-Aldrich, 85% kwas fosforowy(V) (H_3PO_4) z firmy Chempur, wodorotlenek potasu (KOH), chlorek litu (LiCl), N,N-dimetyloacetamid (DMAc) z firmy Avantor Performance Materials Poland S.A.

W przeprowadzonych badaniach zastosowano roztwór chityny w H_3PO_4 o stężeniach 3% i 5%. Dodatkowo do porównania wykonano elektroprzędzenie 2% roztworu chityny w mieszaninie LiCl/DMAc (chlorek litu/dimetyloacetamid). Układ tych rozpuszczalników jest wzorcowym układem stosowanym do oznaczania masy cząsteczkowej chityny.

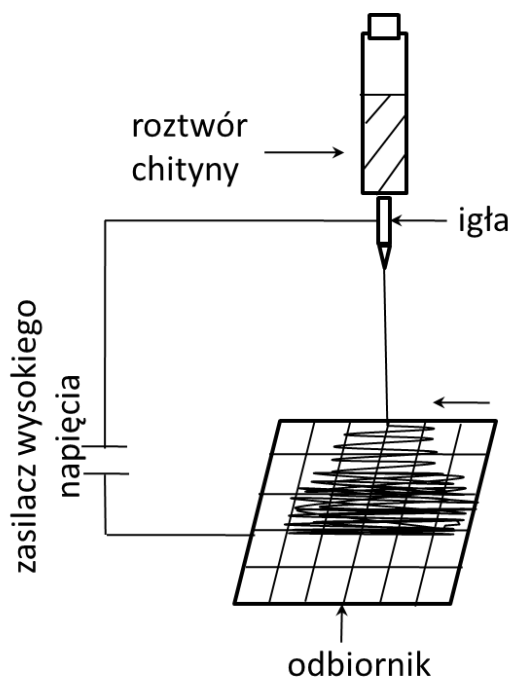
Przygotowywanie roztworów chityny w kwasie fosforowym jest procesem długotrwałym – klarowny roztwór uzyskiwano po upływie 5 godzin. Na fotografiach (Rys. 1) zilustrowano poszczególne etapy przygotowywania roztworów chityny.



Rys. 1. Etapy przygotowywania roztworów chityny: a) próbka chityny po bezpośrednim zalaniu kwasem fosforowym; b) roztwór po 2 godzinach; c) roztwór po 5 godzinach użyty do formowania materiałów chitynowych.

Fig. 1. Stages of preparation of chitin solutions: a) sample of chitin after direct pouring with phosphoric acid; b) solution after 2 hours; c) solution after 5 hours used to form chitin materials.

Formowanie materiałów chitynowych przeprowadzono na klasycznym zestawie do otrzymywania mikro- i nanowłókien w polu elektrycznym – schemat zastosowanej aparatury przedstawia Rys. 2. Zastosowane parametry procesu formowania: 2%, 3%, 5% roztwór chityny, średnica kapilary 0,7 mm, napięcie 35 kV, wypływ 3 cm³/godz., odległość wylotu kapilary od lustra kąpeli koagulacyjnej 5 cm. Powstałe mikrosfery i mikrowłókna odbierano do kąpeli koagulacyjnej, którą był wodny roztwór wodorotlenku potasu zastosowany w celu neutralizacji kwasu fosforowego. Po procesie formowania otrzymane materiały chitynowe płukano kilkakrotnie wodą destylowaną i oddzielano na drodze dekantacji.



Rys. 2. Schemat zastosowanej aparatury do elektroprzędzenia.

Fig. 2. Scheme of the equipment used for electrospinning.

2.2. Metodologia badań

Badania topografii powierzchni otrzymanych materiałów chitynowych przeprowadzono za pomocą mikroskopu optycznego (PZMO, Warszawa) wyposażonego w kamerę CCD ARTCAM (Olympus).

Morfologia włókien i sfer została zbadana za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Zastosowano skaningowy mikroskop elektronowy JEOL JSM 5500 LV (Tokyo, Japan). Mikroskop pracował w trybie elektronów wstecznie rozproszonych przy napięciu przyspieszającym 10 kV. Obserwacje włókien przeprowadzono przy różnych powiększeniach od 1000 razy.

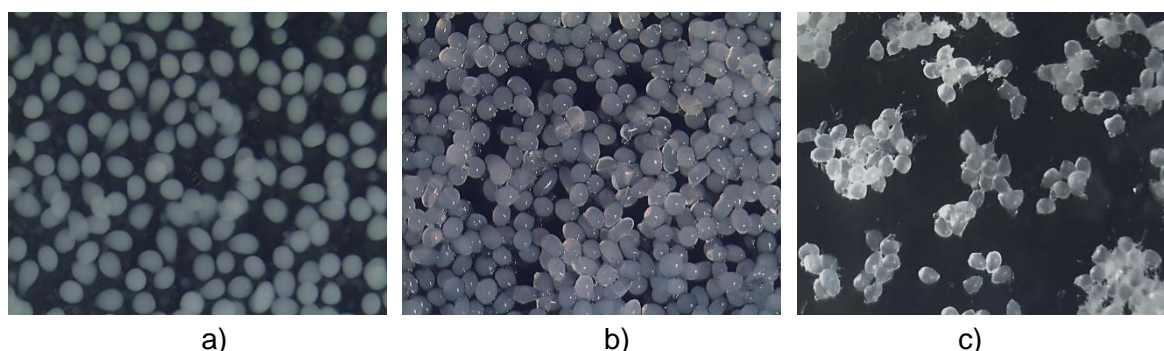
Dla otrzymanych mikrowłókien i sfer chitynowych wyznaczono średnice za pomocą oprogramowania MOTIC Images Plus 2.0.

Do badań spektroskopii w średniej podczerwieni wykorzystano spektrometr NICOLET 6700 FT-IR (Thermo Electron Corp., Madison, WI, USA). Zastosowano następujące parametry pomiarowe: zakres spektralny 4000–400 cm^{-1} , rozdzielczość 4 cm^{-1} , liczba skanów 64, źródło światła IR, detektor DTGS. Wykorzystano technikę pastylkowania – otrzymane materiały ucierano z NaCl w tyglu agatowym, a następnie prasowano pod ciśnieniem 200 MPa w celu uzyskania pastylki. Tłem do badań była pastylka wykonana z czystego NaCl. Analizę otrzymanych widm przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Omnic (v. 9.0, Thermo Electron Corp., Madison, WI, USA).

Do badań spektroskopii Ramana zastosowano spektrofotometr Magna 860 (Thermo Electron Corp., Madison, WI, USA) wyposażony w przystawkę ramanowską Micro Stage. Zastosowano następujące parametry pomiarowe: zakres spektralny 4000–400 cm^{-1} , rozdzielczość 8 cm^{-1} , liczba skanów 2000, źródło światła – laser NdYag 1064 nm, detektor InGaAs.

3. WYNIKI I DISKUSJA

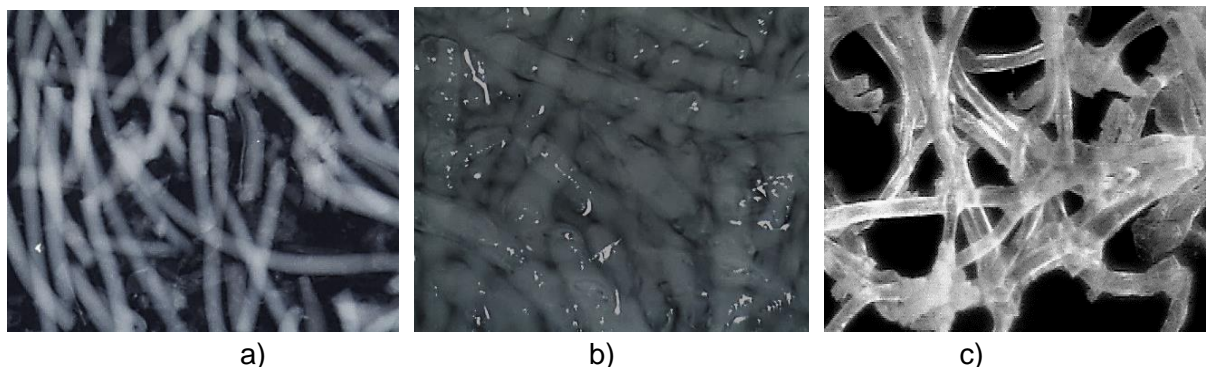
Na fotografiach (Rys. 3) zamieszczono przykładowe mikrosfery chitynowe otrzymane w procesie elektroprzędzenia 3% roztworu chityny w kwasie fosforowym uzyskane za pomocą mikroskopu optycznego. Powstałe mikrosfery odbierano do kąpieli koagulacyjnej, którą był wodny roztwór KOH zastosowany w celu neutralizacji kwasu fosforowego.



Rys. 3. Fotografie mikrosfer chitynowych (powiększenie 50x): a) bezpośrednio po otrzymaniu i płukaniu w wodzie; b) po 24 h suszenia w temperaturze pokojowej; c) po 48 h suszenia w temperaturze pokojowej.

Fig. 3. Photographs of chitin microspheres (magnification 50x): a) immediately after receipt and rinsing in water; b) after 24 hours drying at room temperature; c) after 48 hours drying at room temperature.

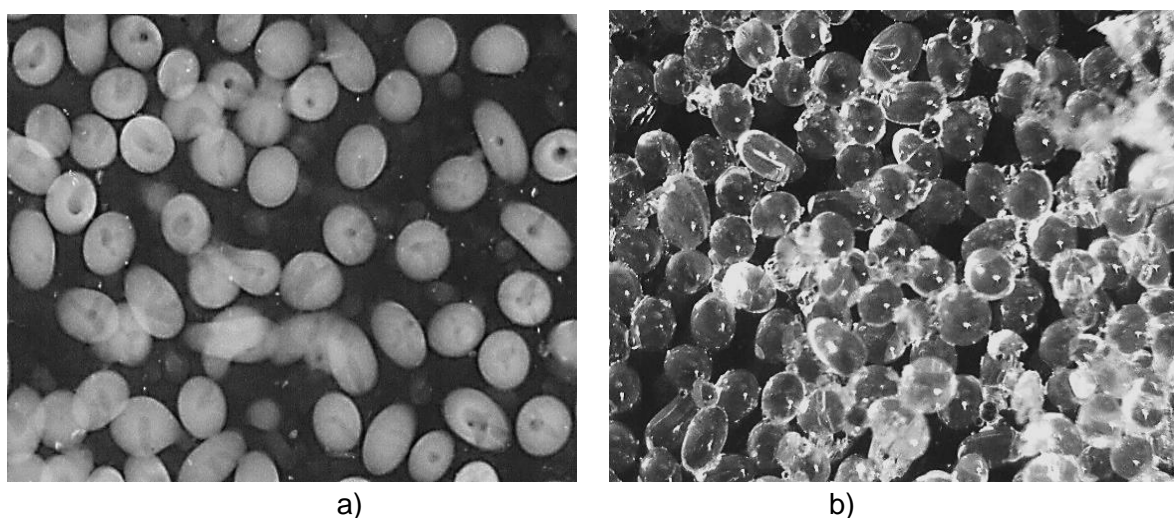
Na kolejnych fotografiach (Rys. 4) zamieszczono przykładowe mikrowłókna chitynowe otrzymane w procesie elektroprzędzenia 5% roztworu chityny w kwasie fosforowym uzyskane za pomocą mikroskopu optycznego. Powstałe mikrowłókna odbierano do mieszającej się, podgrzewanej do 40°C kąpieli koagulacyjnej, którą był wodny roztwór KOH zastosowany w celu neutralizacji kwasu fosforowego.



Rys. 4. Fotografie mikrowłókien chitynowych (powiększenie 100x): a) bezpośrednio po otrzymaniu po płukaniu w wodzie; b) po 24 h suszenia w temperaturze pokojowej; c) po 48 h suszenia w temperaturze pokojowej.

Fig. 4. Photographs of chitin microfibrils (magnification 100x): a) immediately after receipt and rinsing in water; b) after 24 hours drying at room temperature; c) after 48 hours drying at room temperature.

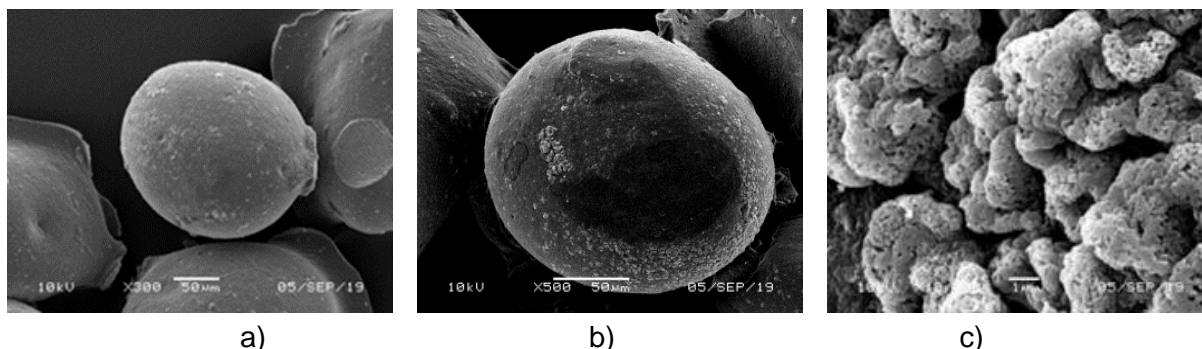
Zamieszczono także fotografie (Rys. 5) przykładowych mikrosfer chitynowych otrzymanych w procesie elektroprzędzenia 2% roztworu chityny w mieszaninie LiCl/DMAc.



Rys. 5. Fotografie mikrosfer chitynowych (powiększenie 100x): a) bezpośrednio po otrzymaniu i płukaniu w wodzie; b) po 24 h suszenia w temperaturze pokojowej.

Fig. 5. Photographs of chitin microspheres (magnification 100x): a) immediately after receipt and rinsing in water; b) after 24 hours drying at room temperature.

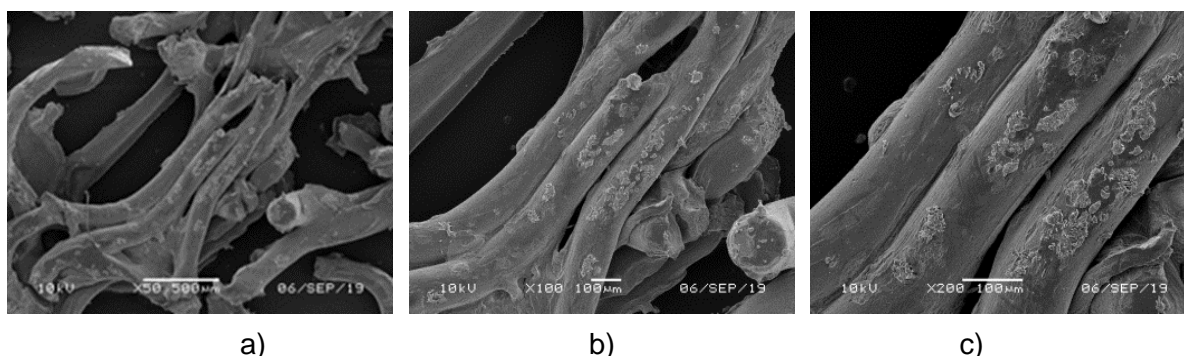
Analizę morfologii powierzchni włókien prowadzono za pomocą mikroskopu SEM. Zestawiono wybrane mikrofotografie SEM (Rys. 6), przedstawiające budowę powierzchni mikrosfer chitynowych otrzymanych w procesie elektroprzędzenia 3% roztworu chityny w kwasie fosforowym.



Rys. 6. Mikrofotografie SEM mikrosfer chitynowych: a) powiększenie 300x; b) powiększenie 500x; c) powiększenie 10 000x.

Fig. 6. SEM microphotographs of chitin microspheres: a) magnification 300x; b) magnification 500x; c) magnification 10.000x

Budowę powierzchni mikrowłókien chitynowych otrzymanych w procesie elektroprzędzenia 5% roztworu chityny w kwasie fosforowym przedstawiono na kolejnych wybranych mikrofotografiach (Rys. 7). Powstałe mikrowłókna odbierano do mieszającej się, podgrzewanej do 40°C kąpieli koagulacyjnej, którą był wodny roztwór KOH zastosowany w celu neutralizacji kwasu fosforowego.

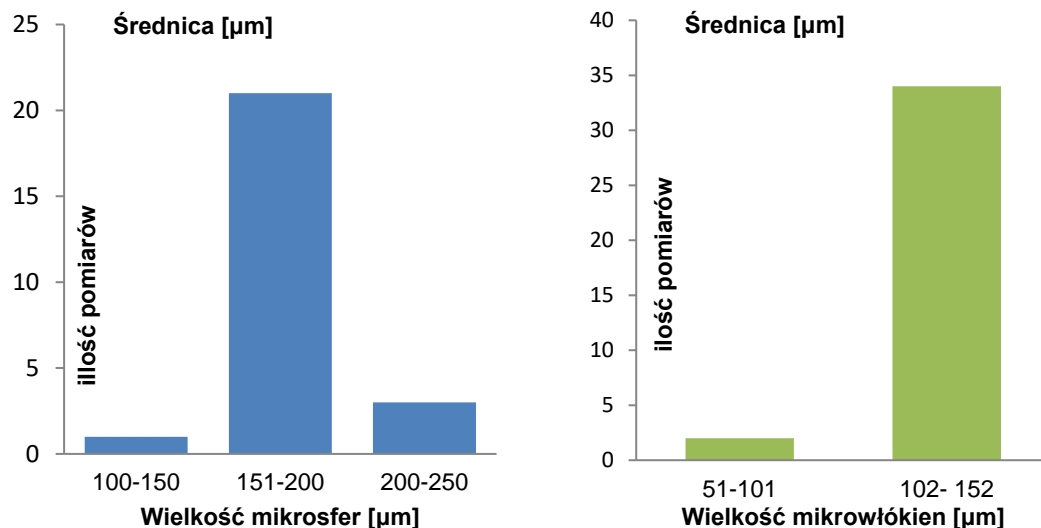


Rys. 7. Mikrofotografie SEM mikrowłókien chitynowych: a) powiększenie 50x; b) powiększenie 100x; c) powiększenie 200x.

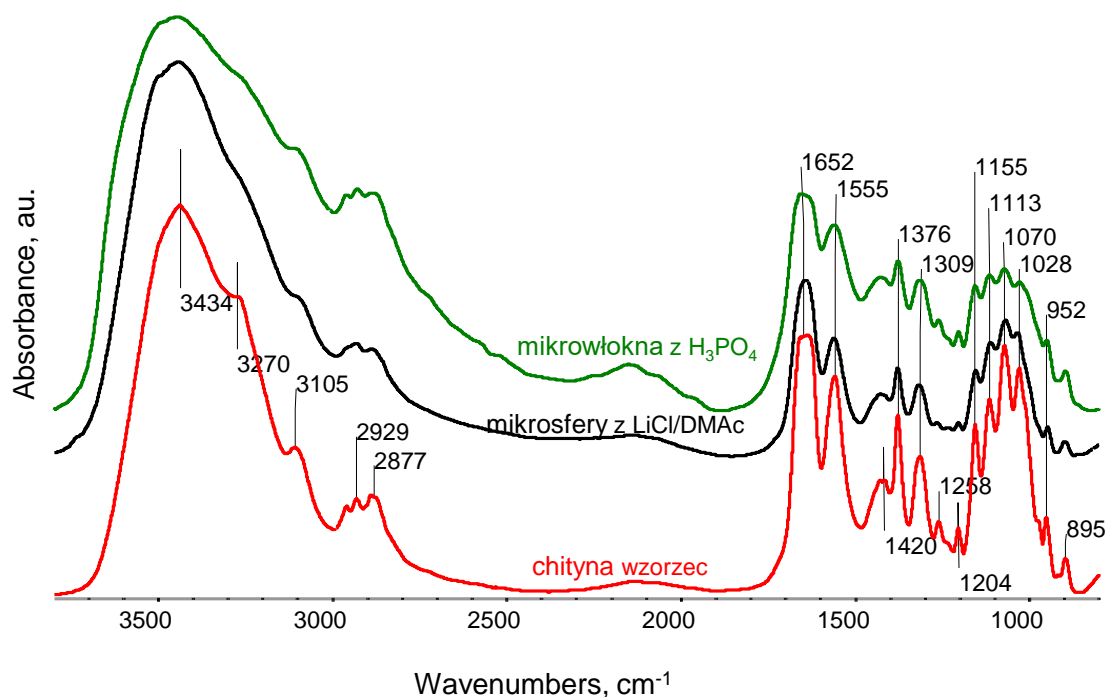
Fig. 7. SEM microphotographs of chitin microfibres: a) magnification 50x; b) magnification 100x; c) magnification 200x.

Otrzymano mikrosfery chitynowe, charakteryzujące się średnicami od 142 do 208 μm , a wartość średnia wynosiła 195 μm (Rys. 8). Mikrowłókna chitynowe charakteryzowały się średnicami od 93 do 152 μm , a wartość średnia wynosiła 121 μm (Rys. 8).

Analiza uzyskanych widm FTIR wskazuje (Rys. 9), że proces rozpuszczania chityny i jej ponowna koagulacja nie powoduje istotnych zmian w budowie chemicznej. W widmach z zakresu średniej podczerwieni zachowane są wszystkie pasma oscylatorów – pasmo amidu I przy położeniu maksimum 1652 cm^{-1} , pasmo amidu II przy położeniu maksimum 1555 cm^{-1} pochodzi od wiązań -N-H i -C-H. Pasma przy położeniu maksimum 1155 cm^{-1} pochodzi od wiązania glikozydowego, występującego w ugrupowaniu C-O-C. Pasma przy położeniu maksimum 952 cm^{-1} pochodzi od grupy -CH₂ makrocząsteczki chityny, a pasmo przy położeniu maksimum 895 cm^{-1} pochodzi od ugrupowania -CH w pierścieniu polisacharydowym. Pasma przy położeniu maksimum 3400 cm^{-1} w chitynie wzorcowej jest wyraźne, a w chitynach po regeneracji jest rozmyte, co może wynikać z nieregularnego ułożenia łańcuchów makrocząsteczki chityny po procesie regeneracji w wodorotlenku.



Rys. 8. Rozkład średnic mikrosfer i mikrowłókien chitynowych.
Fig. 8. Diameter distribution of microspheres and microfibers of chitin.

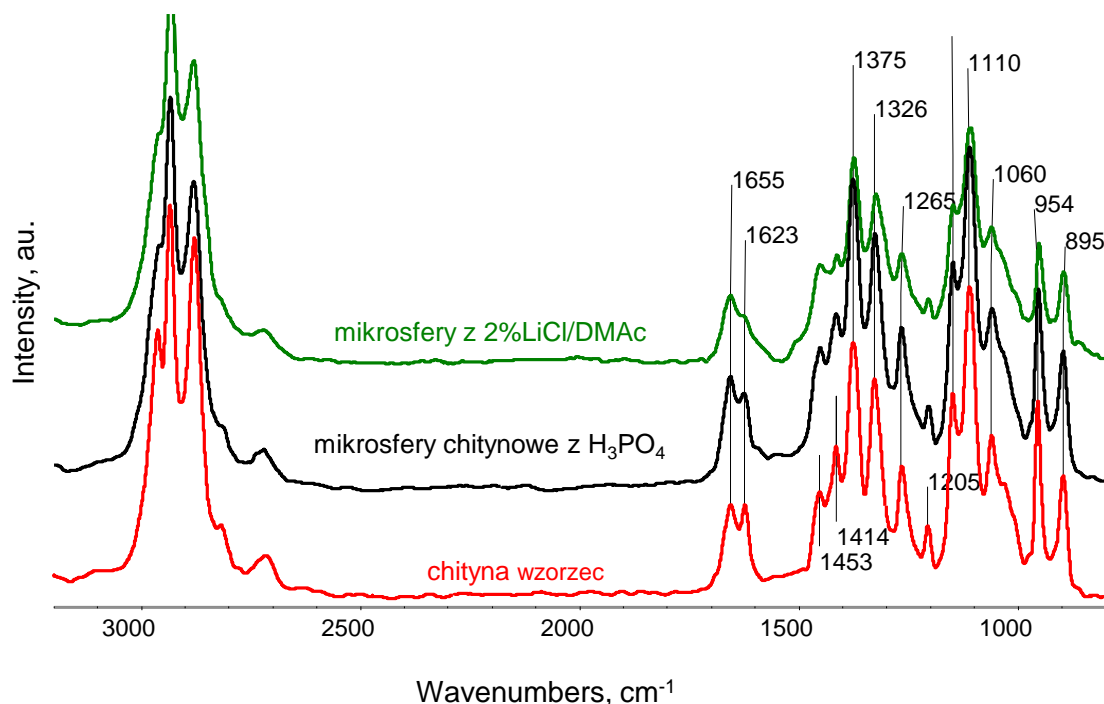


Rys. 9. Widma FTIR uzyskane dla wzorca chityny oraz mikrosfer chitynowych w różnych rozpuszczalnikach w zakresie 3700–800 cm^{-1} .
Fig. 9. FTIR spectra of chitin standard and chitin microspheres in various solvents in the range of 3700–800 cm^{-1} .

Widma ramanowskie potwierdzają wcześniejsze wnioski, wynikające z badań spektroskopii w średniej podczerwieni. Na zestawieniu widm (Rys. 10) wyraźnie widać zachowanie głównych grup funkcyjnych po przeprowadzonym procesie rozpuszczenia i regeneracji w obu rozpuszczalnikach w porównaniu do wzorca chityny. Wszystkie pasma zachowały swoje położenie oraz proporcje. Efekt ten potwierdza brak degradacji chityny przy zastosowanych rozpuszczalnikach.

W widmach Ramana pojawia się pasmo amidu I przy położeniu maksimum 1655 cm^{-1} i 1622 cm^{-1} , które pochodzi od wiązania C=O. Dla pasma amid I w widmie wzorca chityny

obserwuje się największą jego intensywność, która spada dla chityn po regeneracji, co może świadczyć o rozluźnieniu oddziaływań międzycząsteczkowych po obróbce. Pasma przy położeniu maksimum 1400–1460 cm^{-1} pochodzą od wiązań C-H. Wyraźne pasmo przy położeniu maksimum 1148 cm^{-1} pochodzi od wiązania glikozydowego C-O-C, natomiast pasmo przy położeniu maksimum 950 cm^{-1} pochodzi od wiązań CH_2 , występujących w łańcuchu makrocząsteczki, zaś pasmo przy położeniu maksimum 895 cm^{-1} pochodzi od wiązań C-H, występujących w pierścieniu glikozydowym.



Rys. 10. Zestawienie widm Ramana uzyskanych dla wzorca chityny oraz mikrosfer chitynowych w różnych rozpuszczalnikach w zakresie 3200–800 cm^{-1} .

Fig. 10. Raman spectra of chitin standard and chitin microspheres in various solvents in the range of 3200–800 cm^{-1} .

4. WNIOSKI

1. Zastosowane rozpuszczalniki chityny pozwoliły na otrzymanie homogenicznych roztworów, które wykorzystano w procesie elektroprzędzenia.
2. W wyniku elektroprzędzenia otrzymywano materiały chitynowe w postaci mikrosfer i mikrowłókien o różnej wielkości.
3. Mikrowłókna otrzymano podczas wprowadzania strugi polimeru do ciepłej kąpeli koagulacyjnej.
4. Badania spektrofotometryczne wykazały zachowanie struktury chemicznej chityny regenerowanej.
5. Badania spektroskopii Ramana potwierdziły brak istotnej degradacji tworzywa.
6. Zaobserwowano różnice w widmach spowodowane zmianami w strukturze nadcząsteczkowej w postaci zmiany kształtu pasm dla oscylatorów, które biorą udział w oddziaływaniach międzycząsteczkowych.

LITERATURA

- Biniaś D., Biniaś W., Janicki J. 2016. Application of Raman spectroscopy for evaluation of chemical changes in dibutylchitin fibres. *Fibres and Textiles in Eastern Europe*, 24, 27–38.
- Biqiong C., Kang S., Kebing Z. 2004. Rheological properties of chitin/lithium chloride, N,N-dimethylacetamide solutions. *Carbohydrate Polymers*, 58, 65–69.
- Blackwell J. 1969. Structure of β -chitin or parallel chain systems of poly- β -(1-t4)-N-acetyl-d-glucosamin. *Biopolymers*, 7, 281–298.
- Boerstael H., Maatman H., Westering J.B., Koenders B.M. 2001. Liquid crystalline solutions of cellulose in phosphoric acid. *Polymer*, 42(17), 7371–7379.
- Bogdanova O.I., Polyakov D.K., Streltsov D.R., Bakirov A.V., Blackwell J., Chvalun S.N. 2016. Structure of β -chitin from *Berryteuthis magister* and its transformation during whisker preparation and polymerization filling. *Carbohydrate Polymers*, 137, 678–684.
- Cárdenas G., Cabrera G., Taboada E., Miranda S.P. 2004. Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and ^{13}C cross polarization/mass angle spinning NMR. *Journal of Applied Polymer Science*, 93(4), 1876–1885.
- de Vasconcelos C.L., Bezerril P.M., Pereira M.R., Ginani M.F., Fonseca J.L.C. 2011. Viscosity–temperature behavior of chitin solutions using lithium chloride/DMA as solvent. *Carbohydrate Research*, 346(5), 614–618.
- Ding F., Deng H., Du Y., Shi X., Wang Q. 2014. Emerging chitin and chitosan nanofibrous materials for biomedical applications. *Nanoscale*, 6(16), 9477–9493.
- Jaworska M., Gorak A. 2016. Modification of chitin particles with chloride ionic liquids. *Materials Letters*, 164, 341–343.
- Kumirska J., Czerwicka M., Kaczyński Z., Bychowska A., Brzozowski K., Thöming J., Stepnowski P. 2010. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Marine Drugs*, 8(5), 1567–1636.
- Min B-M., Lee S.W., Lim J.N., You Y., Lee T.S., Kang P.H., Park W.H. 2004. Chitin and chitosan nanofibers: electrospinning of chitin and deacetylation of chitin nanofibers. *Polymer*, 45(21), 7137–7142.
- Prasad K., Murakami M., Kaneko Y., Takada A., Nakamura Y., Kadokawa J. 2009. Weak gel of chitin with ionic liquid, 1-allyl-3-methylimidazolium bromide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(3), 221–225.
- Rinaudo M. 2006. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603–632.
- Saito Y., Okano T., Gaill F., Chanzy H., Putaux J.L. 2000. Structural data on the intra-crystalline swelling of β -chitin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 28(1), 81–88.
- Singh S.K. 2019. Solubility of lignin and chitin in ionic liquids and their biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132(1), 265–277.
- Suenaga S., Totani K., Nomura Y., Yamashita K., Shimada I., Fukunaga H., Takahashi N., Osada M. 2017. Effect of acidity on the physicochemical properties of α - and β -chitin nanofibers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 358–366.
- Vincendon M. 1997. Regenerated chitin from phosphoric acid solutions. *Carbohydrate Polymers*, 32, 233–237.
- Wu T., Wang G., Gao C., Chen Z., Feng L., Wang P., Zeng X., Wu Z. 2016. Phosphoric acid-based preparing of chitin nanofibers and nanospheres. *Cellulose*, 23, 477–491.