Deacetilacija kitozana i karakterizacija produkta deacetilacije

Perak, Stjepan

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:576336

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Preddiplomski studij kemije

Stjepan Perak

DEACETILACIJA KITOZANA I KARAKTERIZACIJA PRODUKATA DEACETILACIJE

Završni rad

Mentor: doc. Dr. sc. Aleksandar Sečenji

Osijek, 2018.

SADRŽAJ

1. UVOD 6

2. OPĆI DIO 7

2.1. OPĆENITO O KITOZANU 7

2.1.1. Kemijska struktura 7

2.1.2. Fizikalno-kemijska svojstva 9

2.1.2.1. Stupanj deacetilacije 9

2.1.2.2. Prosječna molekularna masa 9

2.1.3. Postupak dobivanja kitozana 10

2.2. PRIMJENA KITOZANA U MEDICINI I FARMACIJI 12

2.2.1. Priprava tkiva metodom tkivnog inženjeringa 12

2.2.1.1. Uloga kitozana u tkivnom inženjeringu kostiju 13

2.2.2. Prirodni polimeri kao nosači aktivne tvari lijekova 14

2.2.2.1. Kitozanske nanočestice kao nosači aktivne tvari lijekova 15

2.2.2.1.1. Uloga kitozana u učinkovitosti PLGA nanočestice 16

2.3. METODE KARAKTERIZACIJE KITOZANA 17

2.3.1. Metode određivanja stupnja deacetilacije 17

2.3.1.1. Kiselo-bazna titracija 17

2.3.1.2. Potenciometrijska titracija 18

2.3.1.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FT-IR) 18

2.3.2. Metode određivanja molekularne mase polimera 19

2.3.2.1. Određivanje raspodjele molekularne mase pomoću statičkog raspršenja svjetlosti 19

2.3.2.2. Određivanje prosječne molekularne mase pomoću viskoznosti otopine polimera 20

3. EKSPERIMENTALNI DIO 22

3.1. MATERIJALI 22

3.2. REAKCIJA DEACETILACIJE KITOZANA 22

3.2.1. Uvjeti izvođenja reakcije deacetilacije kitozana 22

3.2.2. Određivanje stupnja deacetilacije kitozana 23

3.2.3. Određivanje molekularne mase produkata deacetilacije kitozana 23

4. REZULTATI I RASPRAVA 25

4.1. ODREĐIVANJE MOLEKULARNE MASE PRODUKATA DEACETILACIJE KITOZANA 25

4.2. ODREĐIVANJE STUPNJA DEACETILACIJE KITOZANA 27

4.2.1. Određivanje stupnja deacetilacije pri 25°C 27

4.2.2. Određivanje stupnja deacetilacije pri 60°C 28

5. ZAKLJUČAK 29

6. POPIS LITERATURE 30

Sažetak

Kitozan je prirodni polimer koji zahvaljujući svojim kemijskim i biološkim karakteristikama pronalazi ulogu u gotovo svim područjima ljudske djelatnosti, od medicine i farmacije do očuvanja okoliša. Kitozan je kopolimer dobro topljiv u vodi, izgrađen od dvije vrste ponavljajućih monomernih jedinica: *N-acetil-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoza i 2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoza.* Kemijskim putem nastaje N-deacetilacijom hitina, dok ga se u prirodi može pronaći kod određenih tipova gljivica. Nadalje, kitozan karakterizira visok stupanj netoksičnosti, biokompatibilnosti i biorazgradivosti te upravo zahvaljujući tim osobinama pronašao je svoju ulogu u očuvanju okoliša; vrlo je koristan kelirajući agens teških metala otpadnih voda i lebdećih čestica. Kitozan se može pripraviti iz egzoskeleta člankonožaca; prvo se izolira hitin, a nakon toga se u procesu deacetilacije dobiva kitozan, koji je primjenjiv kao polazna sirovina za kemijsku sintezu određenih produkata korisnih u medicini, farmaciji i zaštiti okoliša. Molekularna masa, odnosno njezina distribucija unutar polimera znatno utječe na fizikalna i kemijska svojstva polimera kao što su na primjer reološka i mehanička svojstva kitozana. Molekularna masa i njezina distribucija unutar polimera također uvelike utječe na mogućnost stvaranja gel formacije, modifikaciju osmotskog tlaka, povišenje viskoznosti i stvaranje vlakana, a navedena svojstva su od iznimne važnosti prilikom korištenja kitozana kao polazne sirovine za proizvodnju različitih korisnih produkata u industriji hrane, medicini i farmaciji. U ovom završnom rada utvrđeno je na koji način temperatura i vrijeme trajanja reakcije deacetilacije kitozana pod umjerenim okolnostima utječu na molekularnu masu i stupanj deacetilacije (DD) deacetiliranog kitozana. Za određivanje molekularne mase kitozana korištena je metoda statičkog raspršenja svjetlosti pomoću Malvern Zetasizer Nano S instrumenta, dok je za određivanje stupnja deacetilacije (DD) kitozana korištena FT-IR spektroskopska metoda. Povišenjem temperature i povećanjem vremena trajanja reakcije deacetilacije kitozana dolazi do povećanja stupnja deacetilacije (DD) kitozana. Nadalje, povišenjem temperature i povećanjem vremena trajanja reakcije deacetilacije kitozana dolazi do smanjenja molekularne mase kitozana odnosno hidrolize polimernog lanca. Pomoću rezultata dobivenih u ovom radu može se pripraviti kitozan sa željnom molarnom masom i stupnjem deacetilacije što uveliko doprinosi upotrebljivosti i eksploataciji kitozana na različitim znanstvenim i industrijskim poljima.

Ključne riječi: kitozan, deacetilacija, stupanj deacetilacije, degradacija polimera, industrijska primjena

Abstract

Chitosan is a natural polymer which, due to its chemical and biological characteristics, has a role in almost all areas of human activity, from medicine and pharmacy to environment protection. It is a water-soluble copolymer, composed of two types of repetitive monomeric units: N-acetyl-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose and 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose. It can be produced by N-deacetylation of the chitin using chemical processes, and it can be found in nature with certain types of fungi. Furthermore, chitosan is characterized by a low level of toxicity and prominent level of biocompatibility and biodegradability. Due to these properties, chitosan has found its role in environment protection; it is a very useful chelating agent for heavy metals in wastewaters and particulate matter (PM). Chitosan can be produced from the exoskeleton of the arthropod; first, the chitin is isolated, and then in the process of deacetylation is performed to obtain chitosan. It can be then used as a starting material in chemical synthesis of certain products used in medicine, pharmaceutical industry of drugs and environment protection. The molecular weight and its distribution affect physical and chemical properties of polysaccharides such as the rheological, mechanical properties and pore size of membranes or microcapsules made of chitosan. Therefore, molecular weight determination is very important for elucidating the characteristics of the chitosan itself and the products made from it. Gel forming, osmotic pressure modification, viscosity enhancing, or fiber formation also depend on molecular weight and its distribution which have been used in food industrial, pharmaceutical, and medical applications. In this bachelor thesis it is investigated how does reaction temperature and duration time of deacetylation reaction under the mild conditions effect the degree of deacetylation (DD) and molecular weight of deacetylated chitosan. To determine molecular weight of deacetylated chitosan, static light scattering (SLS) method is used by Malvern Zetasizer Nano S instrument while the degree of deacetylation was determined by infrared spectroscopy (FT-IR). By increasing the reaction temperature and time of deacetylation reaction, the degree of deacetylation (DD) have increased. Furthermore, by increasing reaction temperature and time duration of deacetylation reaction, decrease of molecular weight or hydrolysis of polymer chain is also noticed. By the results obtained in this thesis we can prepare chitosan with desired molecular weight and degree of deacetylation what makes chitosan more exploitable and applicable in variety of scientific and industrial fields.

Key words: chitosan, deacetylation, degree of deacetylation, polymer degradation, industrial application

1. UVOD

Prirodni polimeri ili biopolimeri predstavljaju polimere čije porijeklo u većini slučajeva dolazi od strane nekog živog organizma. Kao i svi polimeri općenito, prirodni polimeri građeni su od određenog broja ponavljajućih manjih molekula odnosno monomernih jedinica koje su unutar strukture polimera povezane određenim tipovima kovalentnih veza. Jedan polimer se može sastojati od svega nekoliko pa sve do više stotina monomernih jedinica. Na makromolekulskoj razini polimeri se mogu različito oblikovati te biti linearni, granati, umreženi, mrežasti te zahvaljujući svojem obliku postizati različita svojstva.

Prirodne polimere prema broju monomernih jedinica i strukturnom obliku možemo razvrstati u tri kategorije, a to su polinukleotidi, koji predstavljaju dugačke polimere građene od više monomernih nukleotidnih jedinica, primjer polinukleotida su RNA i DNA molekula; zatim polipeptidi koji su građeni od manjeg broja aminokiselinskih ostataka međusobno povezanih peptidnim vezama; te polisaharidi koji nam predstavljaju polimerne ugljikohidratne molekule građene od dugačkih linearnih lanaca monosaharidnih monomernih jedinica međusobno povezanih glikozidnim vezama. Neki od primjera polisaharda su škrob, glikogen, celuloza i hitin[1].

U ovom završnom radu ćemo izvesti deacetilaciju kitozana, a nakon deacetilacije kitozana ćemo izvršiti karakterizaciju produkta deacetilacije kitozana određivanjem stupnja deacetilacije i molekularne mase kitozana. Upravo se kitozan zbog svoje specifične građe te izrazite biokompatibilnosti smatra jednim od najkorisnijih polimera današnjice po pitanju primjenjivosti u različitim područjima ljudske djelatnosti.

Cilj ovog završnog rada je uvidjeti promjenu stupnja deacetilacije i molekularne mase kitozana u odnosu na promjenu temperature i vremena trajanja reakcije deacetilacije kitozana.

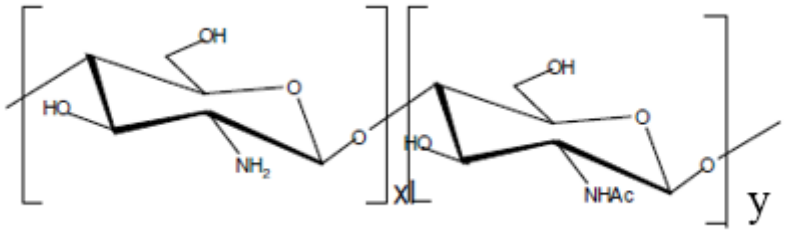
2. OPĆI DIO

2.1. OPĆENITO O KITOZANU

Drugi najrasprostranjeniji i najprisutniji prirodni polimer na svijetu poslije celuloze je hitin koji se najčešće izolira iz mekušaca kao što su lignje te egzoskeleta člankonožaca kao što su rakovi, jastozi, škampi te raznovrsnih insekata. Također, hitin je jedan od najvećih zagađivača morskih površina priobalnih područja iz razloga jer masovna eksploatacija hitina bez obzira na njegovu iznimnu dostupnost još uvijek nije započeta [2]. Jedan od najvažnijih derivata hitina je kitozan koji je dobiven reakcijom deacetilacije hitina. Prethodno spomenutu reakciju prvi je opisao francuski kemičar Charles Rouget 1859. godine. Iako je kitozan prvi puta opisan u drugoj polovici devetnaestog stoljeća ozbiljnija istraživanja započeta su tek prije dvadesetak godina [3].

2.1.1. KEMIJSKA STRUKTURA

Kitozan je linearni kopolimer, dobro topljiv u vodi, izgrađen od dvije vrste ponavljajućih monomernih podjedinica, a one su *N-acetil-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoza* (acetilirana podjedinica) *i 2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoza* (deacetilirana podjedinica) koje su međusobno povezane α-(1→4) glikozidnim vezama (*Slika 1.)*[2].

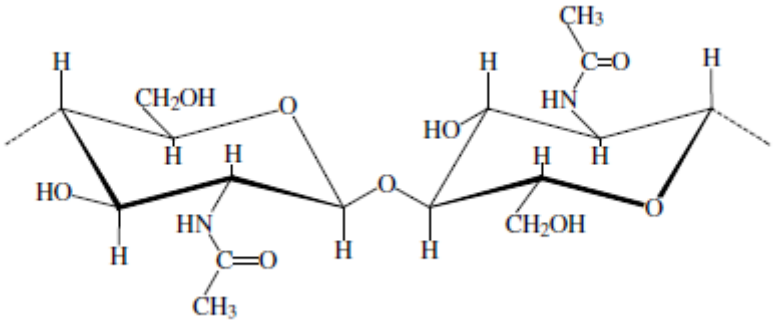


Slika 1. Kemijska struktura djelomično deacitiliranog kitozana.

Kitozan se kemijskim putem dobiva reakcijom N-deacetilacije hitina uz prisutnost lužine dok se u prirodi pojavljuje samo kod određenih tipova gljivica iz razreda gljivičastih plijesni.

Specifičnost kitozana odlikuje se u njegovim kemijskim i biološkim karakteristikama jer za razliku od hitina, kitozan je netoksičan, biokompatibilan i biorazgradiv[4] prirodni polimer te kao takav ima široku mogućnost primjene sve od uloge kelirajućeg agensa u pročišćavanja otpadnih voda od teških metala do tkivnog inženjeringa priprave umjetnih tkiva i organa, farmaceutske, kozmetičke, tekstilne i prehrambene industrije.

Hitin, prirodni homopolimer izgrađuju *2-acetamido-2-deoksi-β-D-glukozne* monomerne jedinice koje su međusobno povezane β-(1→4) glikozidnim vezama (*Slika 2.)* [2]. Hitin po svojim kemijskim karakteristikama podsjeća na još jedan prirodni polimer, celulozu budući da je slabo topljiv u vodi i većini organskih otapala te je u kemijskim reakcijama ne reaktivan.



Slika 2. Kemijska struktura hitina.

Prijelaz između hitina u kitozan nastaje nakon što je deacetilirano, odnosno uklonjeno više od pola acetilnih skupina s monomernih jedinica hitina. Nadalje, hitin i kitozan su dva prirodna polimera koji su komercijalno vrlo atraktivni ne samo iz razloga jer su lako dostupni te nakon reakcije N-deacetilacije hitina i nastanka kitozana i biološki kompatibilni, nego također i zbog toga jer sadrže visoki postotak dušika (6,89%) za razliku od na primjer sintetički dobivene celuloze koja sadrži vrlo mali postotak dušika (1,25%) što između ostalog hitin čini vrlo korisnim kelirajućim agensom u različitim kemijskim reakcijama[5].

2.1.2. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA

Kitozan kao prirodni polimer koji pokazuje polimorfizam posjeduje različita fizikalno-kemijska svojstva, a neka od njih su: stupanj deacetilacije, prosječna molekularna masa, raspodjela molekularnih masa, viskoznost, polikationsko svojstvo i topljivost.

2.1.2.1. STUPANJ DEACETILACIJE

Stupanj deacetilacije (DD) definira se kao postotak primarnih amino (-NH_2) skupina u strukturi polimera. Stupanj deacetilacije je jedan od najvažnijih faktora koji utječe na fizikalno-kemijska svojstva, biološka svojstva, antibakterijsko djelovanje i samu primjenu kitozana. Ovisno o zadanim uvjetima reakcije deacetilacije kitozana dobivaju se različiti stupnjevi deacetilacije kitozana koji mogu iznositi od 56% pa sve do 99%. Nadalje, dobivanje kitozana stupnja deacetilacije od 100% je moguće no uz drastične uvjete u reakciji kao što su visoka temperatura pri kojoj se izvodi reakcija ili dugo vrijeme trajanja reakcije. Za postizanje dobre topljivosti u slabo kiselim otopinama, stupanj deacetiliacije treba iznositi minimalno 85 %. Stupanj deacetilacije se određuje direktno iz sadržaja amino skupina u kitozanu ili indirektno iz sadržaja acetilnih skupina u kitozanu (stupanj N-acetilacije). Neke od metoda za određivanje stupnja deacetilacije su: različite vrste titracija (kiselo-bazna, potenciometrijska), UV spektroskopija i FTIR metoda[15] .

2.1.2.2. PROSJEČNA MOLEKULARNA MASA

Prosječna molekularna masa ovisi o načinu i polaznoj sirovini za pripravu kitozana iz hitina. Vrijednost molekularne mase utječe na mikrobiološko svojstvo kitozana. Molekularna masa prirodnog kitozana je veća od one komercijalnog kitozana [15]. Stupanj deacetilacije tipičnog komercijalnog hitozana je između 70 i 95 %, a molekularna masa između 10 i 1 000 kDa. Kitozan je pahuljastog izgleda, prljavo bijele boje i bez mirisa. Molekularna masa, odnosno njezina distribucija unutar polimera znatno utječe na fizikalna i kemijska svojstva polimera kao što su na primjer reološka i mehanička svojstva kitozana. Molekularna masa i njezina distribucija unutar polimera također uvelike utječe na mogućnost stvaranja gel formacije, modifikaciju osmotskog tlaka, povišenje viskoznosti i stvaranje vlakana, a navedena svojstva su od iznimne važnosti prilikom korištenja kitozana kao polazne sirovine za proizvodnju različitih korisnih produkata u industriji hrane, medicini i farmaciji[16].

2.1.3. POSTUPAK DOBIVANJA KITOZANA

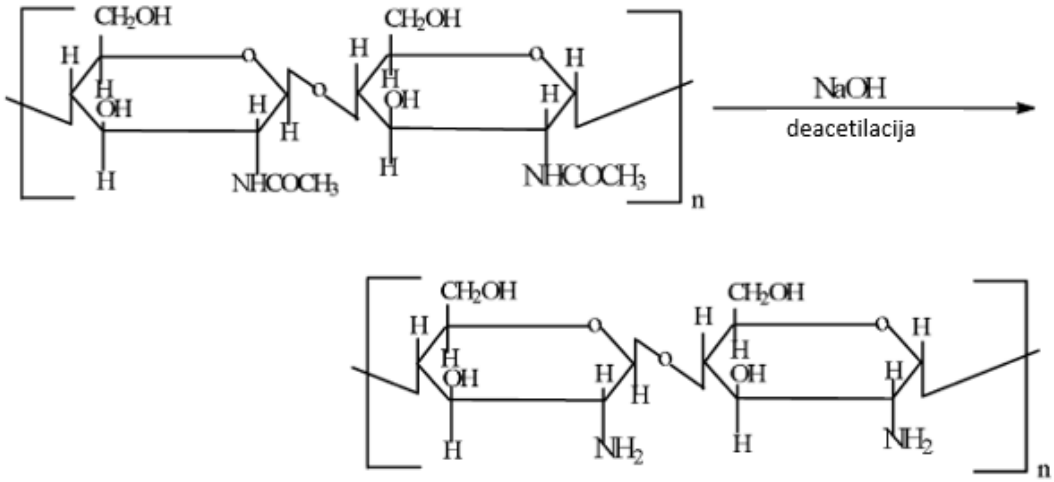
U slijedećem odlomku opisan je postupak sinteze kitozana iz egzoskeleta to jest oklopa raka. Postupak započinje tako da se prvo izolira hitin, a nakon toga u procesu deacetilacije se dobiva kitozan. Priprava započinje tako što se oklop raka ispere kako bi došlo do otapanja određenih topljivih organskih spojeva, proteina i ostalih nečistoća s površine oklopa.

Nakon što se oklop osušio, samelje se u prah u mlinu namijenjenom za mljevenje oklopa ljuštura. Nadalje, sama izolacija kitozana započinje postupkom deprotonacije. Dobiveni prah deprotonira se dodatkom 3% otopine natrijeve lužine jedan sat uz konstantno miješanje pri 60° Celzijevih. Nakon kuhanja dobivena smjesa se ostavi pola sata kako bi se ohladila na sobnu temperaturu. Nakon hlađenja dobivena smjesa se filtrira vakuum filtracijom uz konstantno ispiranje vodom pola sata, nakon pola sata dobivena smjesa stavlja se na sušenje u sušionik Nadalje, postupak se nastavlja demineralizacijom dobivenog uzorka s klorovodičnom kiselinom sat vremena, nakon čega slijedi vakuum filtracija uz završni korak ispiranja dobivenog uzorka vodom pola sata i naposljetku sušenja u sušioniku.

Završni korak priprave hitina je postupak obezbojenja. Na prethodno dobiveni uzorak djeluje se acetonom deset minuta nakon čega slijedi sušenje na sobnoj temperaturi dva sata. Nakon sušenja slijedi izbjeljivanje s 0,315% otopinom natrijeva hipoklorita pet minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga se dobiveni hitin ispere vodom i suši vakuumom dva do tri sata.

Nakon što se prethodno opisanim putem uspješno izdvojio hitin iz oklopa raka, uklanjanjem acetilnih skupina hitina to jest deacetilacijom *(Slika 3.)* dobije se kitozan. Deacetilacija se u većini slučajeva izvodi dodatkom otopine natrijeva ili kalijeva hidroksida pri 90° C uz zagrijavanje dva sata. Mijenjanjem uvjeta pri kojima se izvodi reakcija deacetilacije kao što su koncentracije NaOH, temperatura pri kojoj se izvodi reakcija i vrijeme trajanja reakcije mogu se dobiti različiti stupnjevi deacetilacije te molekularna masa kitozana. Kombinacijom različitih uvjeta reakcije u većini slučajeva se pokušava dobiti kitozan visokog stupnja deacetilacije i velike molekularne mase kako bi bio što bolje iskoristiv u daljnjim primjenama. Kako bi se dobio u potpunosti deacetilirani kitozan ili kitozan visokog stupnja deacetilacije reakcija se izvodi u vrlo drastičnim uvjetima koji podrazumijevaju visoku temperaturu, dugo trajanje reakcije ili veliku koncentraciju NaOH. Također, kako bi se postigao još viši stupnja deacetilacije kitozana i smanjenja degradacije polimera odnosno smanjenje gubitka molekularne mase, reakcija se također može izvoditi u uvjetima visokog tlaka i uz konstantno uvođenje inertnog dušika nad reakciju [13]. Deacetilacija hitina se ne može izvršiti

kiselim reagensima jer dolazi do hidrolize polisaharida te je zbog toga nužno provesti deacetilaciju prethodno spomenutim lužnatim otopinama.



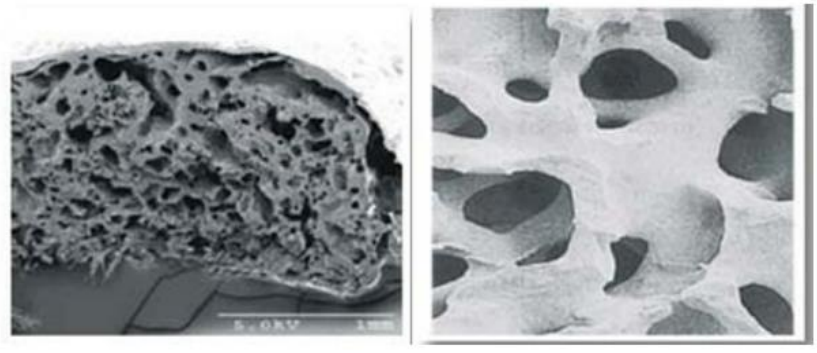
Slika 3. Kemijska reakcija deacetilacije hitina u kitozan natrijevom lužinom.

2.2. PRIMJENA KITOZANA U MEDICINI I FARMACIJI

Kitozan, kao prirodni polimer koji u ljudskom organizmu ne izaziva toksikološke učinke, pronašao je svoju ulogu u pripravi različitih korisnih pripravaka kao što su kompozitni kalupi u tkivnom inženjerstvu te nosači aktivnih tvari lijekova.

2.2.1. PRIPRAVA TKIVA METODOM TKIVNOG INŽENJERINGA

Regenerativna medicina je grana medicine koja se bavi proučavanjem i primjenom principa regeneracije i rasta oštećenih tkiva. Tkivni inženjering je metoda poticanja rasta tkiva korištenjem matičnih stanica, kompozitnih kalupa (eng. scaffold) *(Slika 4.)* i čimbenika rasta za regeneraciju tkiva. Prethodno spomenutom metodom može se potaknuti regeneracija širokog spektra ortopedskih i mekih tkiva nakon ozljede, kao što su hrskavice, kosti, tetive, ligamenti i periferni živci. Navedena se metoda koristi u okviru regenerativne medicine koja predstavlja interdisciplinarno područje u kojem se koriste najsuvremenija dostignuća iz područja molekularne i stanične biologije, kemije, kliničke medicine, inženjeringa i znanosti o kemiji materijala[6]. Budući da je kitozan biorazgradiv, netoksičan i može se pronaći u više različitih oblika postojanja kao što su prašak, hidrogel i folija, kao prirodni polimer dokazane biokompatibilnosti uvelike se koristi kao jedna od polaznih sirovina priprave kompozitnih kalupa nužnih za regeneracije tkiva putem već prethodno spomenute metode. Metodom tkivnog inženjeringa kosti, hrskavice, živčana vlakna samo su neka od uspješno regeneriranih tkiva ljudskog tijela[3].

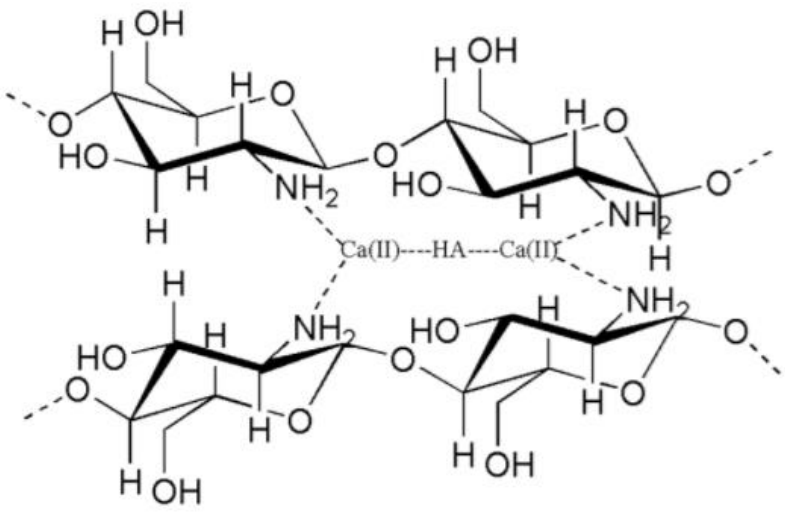


Slika 4. Primjer kompozitnog kalupa (eng. scaffold) za metodu tkivnog inženjeringa

2.2.1.1. ULOGA KITOZANA U TKIVNOM INŽENJERINGU KOSTIJU

Kitozan kao polazna sirovina u tkivnom inženjeringu kostiju često se koristi jer je dokazano kako upravo kitozan svojim kemijskim i biološkim karakteristikama uvelike pridonosi rastu i obnovi osteoblasta. Upravo su osteoblasti odnosno koštane stanice one koje stvaraju koštani matriks koji je kasnije glavni i odgovoran za stvaranje, održavanje i regeneraciju koštanog tkiva[7].

Tkivno inženjerstvo kostiju zahtjeva kompozitne kalupe koji osiguravaju privremenu mehaničku podršku tijekom rasta nove kosti i kasnije se degradiraju brzinom koja je slična brzini regeneracije nove kosti. Kompozitni kalupi bazirani na kitozanu imaju dominantnu ulogu u tkivnom inženjeringu koštanog tkiva posljednjih nekoliko godina. Kitozan i njegovi derivati su vrlo pogodni za izradu kompozitnih kalupa jer se očekuje da se razgrađuju usporedno sa formiranjem novih tkiva i to bez upalnih reakcija, a produkti degradacije kitozana, voda i ugljikov(IV) oksid, nisu štetni za ljudski organizam. Kompozitni kalupi kitozana i hidroksiapatita (HAp) su predstavljeni kao potencijalni implantni materijali sa dobrim osteokonduktivnim i osteoinduktivniim osobinama. Hidroksiapatit je najzastupljenija neorganska komponenta prirodne kosti i kao sintetski materijal koristi se u ortopediji i stomatologiji. Hidroksiapatit odlikuju biokompatibilnost, bioaktivnost (npr. sposobnost formiranja direktne kemijske veze sa okolnim tkivom), osteokoduktivnost, netoksičnost i neizazivanje upalne reakcije[8].



Slika 5. Kemijska interakciju između hidroksiapatita (HAp) i kitozana.

Mehanička svojstva kompozitnog kalupa kitozana i hidroksiapatita igraju značajnu ulogu u uspješnosti regeneracije oštećenog tkiva metodom tkivnog inženjeringa. Stvaranje kemijske interakcije između -NH_2 skupine i primarne i sekundarne -OH skupine kitozana sa Ca^{2+} koordinirajućim ionom hidroksiapatita *(Slika 5.)* pozitivno utječe na mehaničku čvrstoću odnosno izdržljivost kitozan-hidoksiapatitnog kompozitnog kalupa.

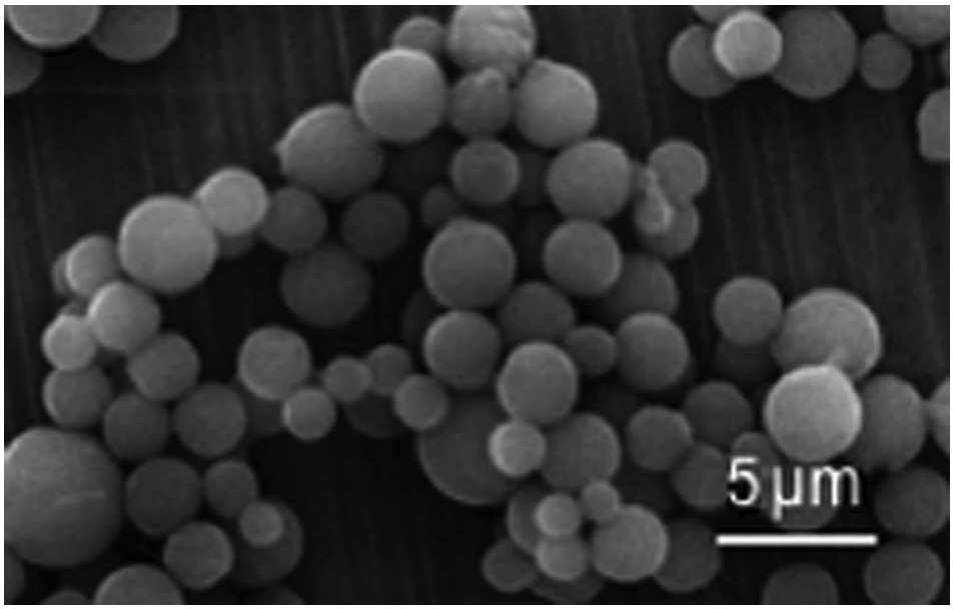
2.2.2. PRIRODNI POLIMERI KAO NOSAČI AKTIVNE TVARI LIJEKOVA

Kako bi polimerni materijal kao nosač aktivne tvari lijeka postigao određenu funkciju poželjna je njegova kombinacija s aktivnom tvari na jedan od slijedeća tri načina: a) odjeljak u kojem se nalazi aktivna tvar lijeka treba biti odvojen polimernom membranom od okoline, primjeri ovog tipa kombinacije polimernog materijala i aktivne tvari lijeka su klasične tablete, dražeje, transdermalni sustavi, filmovi, osmotske pumpe; b) u spremišnom sustavu aktivna tvar treba biti uklopljena u polimerni materijal, na primjer matrični sustav gdje je aktivna tvar raspoređena po cijelom volumenu polimernoga materijala; c) aktivna tvar kemijski treba biti vezana na polimerni nosač u kompleks koji se razgrađuje u organizmu te oslobađa lijek odnosno aktivnu tvar lijeka na željenom mjestu[9].

Kontrola otpuštanja aktivne tvari lijekova, uključuje dobru inkorporaciju lijeka unutar pomoćne tvari, ciljano otpuštanje lijeka u određenom vremenskom periodu te prijenos pripravka do ciljanog mjesta u organizmu. Mehanizmi otpuštanja lijeka su najčešće difuzija kroz matricu nosača, membranska difuzija, biodegradacija te osmoza. Na otpuštanje lijeka utječu svojstva same aktivne tvari, pomoćne tvari, tvrdoća ljekovitoga pripravka te otapanje, odnosno njegova dezintegracija obično praćena definiranom kinetikom[9]. Kontrola otpuštanja aktivne tvari lijeka kad se polimer nalazi kao nosač aktivne tvari lijeka između ostaloga je pod utjecajem kemijskoga sastava, molekulske mase polimera, viskoznosti i koncentracije polimera.

2.2.2.1. KITOZANSKE NANOČESTICE KAO NOSAČI AKTIVNE TVARI LIJEKOVA

Kitozanske nanočestice *(Slika 6.)* su dobri nosači aktivnih tvari lijekova iz razloga jer su biokompatibilne i biorazgradive te se vrlo lako mogu modificirati ovisno o vrsti aktivne tvari lijeka. Kao relativno novo otkriveni nosači, kitozanske nanočestice koriste se za prijenos aktivnih tvari različitih lijekova kao što su na primjer protuupalni, antitumorski, antialergijski i hormonalni lijekovi. Mnogim lijekovima glavni problemi u interakciji s organizmom živog bića predstavlja nestabilnost, netopljivost, niska selektivnost i visoka toksičnost. Upravo dobar nosač aktivne tvari nekog odabranog lijeka je taj koji svojim biološkim i kemijskim svojstvima bi mogao nadvladati prethodno navedene probleme te povećati topljivost, stabilnost i učinkovitost lijeka.



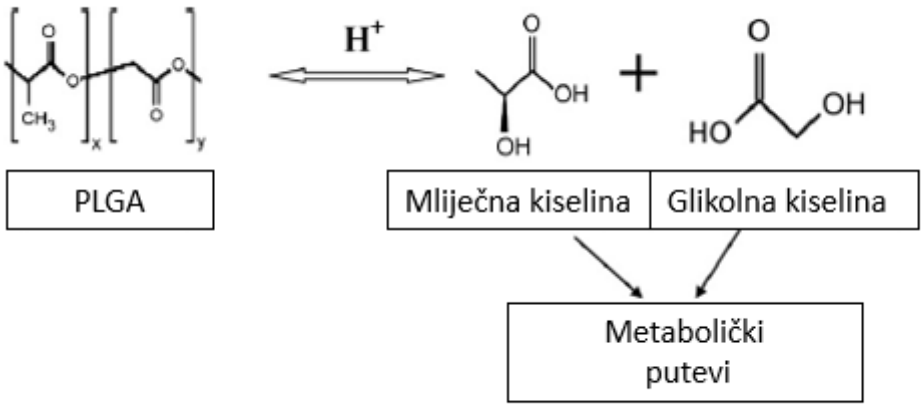
Slika 6. Mikroskopski prikaz kitozanske mikrosfere nanočestice kao nositelja aktivne tvari određenog lijeka.

Budući da su kitozanske nanočestice izrazito male i kompaktne one imaju mogućnost prolaska kroz određene membranske sustave što im omogućava dostavu aktivnih tvari lijekova na točno određeno i za to potrebno mjesto. Aktivne supstance lijeka na za to predviđeno mjesto otpuštaju se prilikom degradacije i korozije kitozanske nanočestice. Degradacija kitozana u većini slučajeva odvija se pod utjecajem enzima lizozima koji je još poznat i pod nazivom 'antibiotik tijela' jer sprječava razne bakterijske infekcije. Produkti degradacije kitozana, voda i

ugljikov(IV) oksid, toksikološki bezopasni za ljudski organizam završavaju u debelom crijevu te u krvotoku odakle dalje mogu biti iskorišteni u nekim osnovnim metaboličkim reakcijama ili mogu biti odstranjeni od strane bubrega[10]. Molekularna masa i stupanj deacetilacije kitozana, kao kriteriji odabira vrste kitozana prilikom priprave kitozanskih nanočestica, su čimbenici koji uvelike utječu na brzinu otpuštanja aktivne tvari lijeka s kitozanske nanočestice.

2.2.2.1.1. ULOGA KITOZANA U UČINKOVITOSTI PLGA NANOČESTICE

PLGA, to jest poli(laktid-ko-glikolid) (eng. poly-D-L-lactide-co-glycolide) je jedna od najuspješnijih i najbiorazgradivijih nanočestica koja služi za dostavu aktivnih tvari lijekova iz razloga jer PLGA podliježe reakciji hidrolize u organizmu živog bića te na taj način se razlaže na vrlo korisne produkte metaboličkih puteva, mliječnu i glikolnu kiselinu (*Slika 7.*).



Slika 7. Hidroliza PLGA u kiseloj sredini. Hidrolizom PLGA nastaju mliječna kiselina i glikolna kiselina kasnije iskorišteni u ciklusu limunske kiseline.

Monomeri PLGA nanočestice zbog svoje kisele prirode ne pogoduju uvijek aktivnim tvarima lijekova i biomolekulama[11]. Provedena su mnoga istraživanja kako bi se prethodni problem pokušao nadvladati i utvrđeno je kako PLGA u smjesi sa kitozanom nadilazi prethodno navedeni problem[12].

2.3. METODE KARAKTERIZACIJE KITOZANA

Za određivanje stupnja deacetilacije i prosječne molekularne mase kitozana mogu se koristiti različite metode, a u slijedeća dva odlomka bit će nabrojane i ukratko opisane neke od najučestalije odabiranih metoda.

2.3.1. METODE ODREĐIVANJA STUPNJA DEACETILACIJE

Smatra se kako je ^{1}H NMR spektroskopija najtočnija i najpouzdanija metoda pomoću koje se može odrediti stupanj deacetilacije kitozana te služi kao referentna metoda za određivanje stupnja deacetilacije pomoću raznih titracijskih i drugih spektroskopijskih metoda. Budući da uređaj za ^{1}H NMR spektroskopiju možemo pronaći samo u visokoopremljenim laboratorijama u većini slučajeva za određivanje stupnja deacetilacije se koriste primitivnije metode koje se svojim rezultatima mogu približiti ^{1}H NMR spektroskopiji.

2.3.1.1. KISELO-BAZNA TITRACIJA

Otopi se 0.5g kitozana u 30 mL 0.1 M HCl na sobnoj temperaturi uz dodavanje dvije kapi metiloranža. Za titraciju se koristi 0.1 M NaOH gdje u završnoj točki titracije dolazi do promjene boje iz ružičaste u narančastu. Kako bi se izračunao udio vode u uzorku, 0.5 g kitozana se zagrije na 105° C dok se ne postigne konstanta masa. Postotak slobodnih NH_2 grupa računa se prema slijedećoj jednadžbi:

$$NH_2\% = [(C_1V_1 - C_2V_2) \times 0.016]/[G\ (100 - W)] \times 100$$

$$\text{Slobodne } NH_2 \text{ skupine, \%} = NH_2\% \,/\, 9.94\% \times 100\%$$

Teoretski udio NH_2 skupina u kitozanu iznosi (16/161) × 100% = 9.94%. C_1 : koncentracija HCl (M); C_2: koncentracija NaOH (M); V_1: volumen dodanog HCl (mL); V_2: volumen dodanog NaOH titracijom (mL); G: masa uzorka (g); W: udio vode u uzorku (%); 0.016: se odnosina sadržaj NH_2 (g) u 1 mL 1 M HCl [13].

2.3.1.2. POTENCIOMETRIJSKA TITRACIJA

Otopi se 0.5 g kitozana u 20 mL 0.3 N klorovodične kiseline. Nakon dodavanja 400 mL destilirane vode, otopina se titrira s 1 N NaOH otopinom. Nakon titracije pomoću grafa (pH vs. NaOH) i očitanih volumena NaOH u svakoj točki pregiba (infleksije) dobiva se postotak slobodnih NH_2 skupina odnosno stupanj deacetilacije prema slijedećoj jednadžbi:

$$NH_2\% = 16.1 \times (y - x)/M$$

gdje M predstavlja molarnu masu korištenog kitozana, x je prva točka pregiba na grafu (pH vs. NaOH), a y je druga točka pregiba[14].

2.3.1.3. INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA S FOURIEROVOM TRANSFORMACIJOM (FT-IR)

Infracrvena spektroskopija je jedna od najčešće korištenih spektroskopskih metoda. Metoda je vrlo brza, osjetljiva te jednostavna za korištenje budući da pruža različite tehnike za uzorkovanje plinova, tekućina te krutina. Odlike IR spektra (broj apsorpcijskih vrpca, njihovi intenziteti te njihov oblik) direktno su povezane s molekularnom strukturom spoja. U ovom završnom radu korištena je upravo FT-IR metoda za određivanje stupnja deacetilacije polaznog i deacetiliranog kitozana. Za utvrđivanje stupnja deacetilacije mogu se koristiti dvije vrpce karakteristične za kitozan[18]. Jedna vrpca koja pripada C=O skupini, koja je dio N-acetilne skupine i njenoj normalnoj vibraciji koja se pojavljuje na 1667 1/cm i služi kao indikatorska (Iv) vrpca za promjenu broja acetiliranih aminskih skupina u kitozanu. Druga vrpca se koristi kao referentna (Rv) vrpca čiji se intenzitet ne mijenja ovisno o stupnju deacetilacije i koja je karakteristična za simetrična i asimetrična rastezanja CH u prstenu i u CH_2OH i CH_3 skupinama, a pojavljuje se u kompleksnom dijelu spektra oko 2877 1/cm. Intenzitet dviju vrpci (I_{Iv} i I_{RV}) utvrđuje se metodom bazne linije. Ako se za utvrđivanje stupnja deacetilacije snime razlikovne spektri u njima se vidi samo promjena u odnosu na polazni kitozan, u tom slučaju stupanj daljnje deacetilacije možemo računati prema slijedećoj formuli:

$$\text{Stupanj deacetilacije (\%)} = (I_{Iv}/I_{Rv}) \times 100 .$$

2.3.2. METODE ODREĐIVANJA MOLEKULARNE MASE POLIMERA

Molekularnu masu kitozana možemo odrediti na više načina. Neki od tih načina su: pomoću kapilarnog viskozimetra te pomoću statičkog raspršenja svjetlosti, a upravo ta metoda je korištena u ovom završnom radu.

2.3.2.1. ODREĐIVANJE RASPODJELE MOLARNE MASE POLIMERA POMOĆU STATIČKOG RASPRŠENJA SVJETLOSTI

Rayleighova jednadžba opisuje intenzitet svjetla raspršenog na česticama u otopini:

$$\frac{KC}{R_\theta} = \left(\frac{1}{M} + 2A_2C\right)\frac{1}{P(\theta)} \tag{1}$$

gdje je K optička konstanta, C je koncentracija čestica, R_θ je omjer intenziteta Rayleighovog raspršenja i ulaznog intenziteta svjetlosti određen pri kutu θ, M je prosječna molekularna masa čestice (statičkog klupka polimera), A_2 je drugi virijalni koeficijent, 1 / P (θ) je izraz ovisan o kutu raspršenja svjetlosti. Za male čestice u Rayleighovom području jednadžba 1 može se reducirati u linearan oblik:

$$\frac{KC}{R_\theta} = \frac{1}{M} + 2A_2C \tag{2}$$

Ovaj oblik Rayleighove jednadžbe onda se može koristiti za generiranje Debyeova grafa, koji je linearni prikaz KC / R_θ nasuprot konentracije polimera, gdje je presretanje jednako inverznoj vrijednosti molekularne mase, a nagib je dvostruka vrijednost drugog virijalnog koeficijenta.

Rayleighov omjer (R_θ) u jednadžbi 1 je omjer intenziteta Rayleighovog raspršenja i ulaznog intenziteta svjetlosti određen pri kutu θ. Budući da je teško mjeriti intenzitet incidentne svjetlosti koja stupa u interakcija s molekulom, često se koristi pristup mjerenja intenziteta analita u odnosu na referentni materijal s dobro poznatim Rayleigh-ovim omjerom. Kao referentni materijal često se koristi toluen ili voda. Izraz koji se koristi za izračunavanje Rayleighova omjera uzorka iz vrijednosti toluenskog standarda opisuje jednadžba 3:

$$R_\theta = \frac{I_A \tilde{n}_o^2}{I_T \tilde{n}_T^2} R_T \quad (3)$$

gdje je I_A ostatak intenzitet raspršivanja analita (= intenzitet uzorka – intenzitet otapala), I_T je intenzitet raspršenje toluena, $\tilde{n}_o$ je refraktivni index otapala, $\tilde{n}_T$ je refrakcija toluena, a R_T je poznati Rayleighov omjer toluena.

2.3.2.2. ODREĐIVANJE PROSJEČNE MOLEKULARNE MASE POMOĆU VISKOZNOSTI OTOPINE POLIMERA

Metoda određivanja prosječne molekularne mase polimera mjerenjem viskoznosti otopine polimera jedna je od najučestalijih i najjednostavnijih korištenih metoda za određivanje prosječne molekularne mase polimera. Viskoznost ili koeficijent unutarnjeg trenja je svojstvo tekućina i plinova da pružaju otpor međusobnom kretanju njihovih slojeva.

Polimeri, bilo da je riječ o sintetskim ili prirodnim polimerima sastoje se od molekula različitih veličina. Budući da se polimeri sastoje od molekula različitih veličina koje su unutar polimera različito raspoređene, polimere može okarakterizirati kao polidisperzne sustave. Podaci o tipu i širini raspodjele molekularne mase daju nam uvid u polidisperznost određenog polimera. U većini slučajeva mjeri se prosječna molekularna masa odnosno relativna molekularna masa polimera iz razloga jer je to podatak do mojeg je lakše doći te je većeg praktičnog značenja.

Viskoznost otopine polimera različitih koncentracija provodi se mjerenjem brzine protjecanja otopine kroz kapilaru viskozimetra. Brzina protjecanja otopine kroz kapilaru opisuje se Hagen-Poiseuilleovim zakonom koji glasi:

$$v = \frac{\pi r^4 pt}{8l\eta}$$

gdje je: v= volumen otopine koji u vremenu *t* proteče kroz kapilaru, l= dužina kapilare, r= promjer kapilare, p= hidrostatski tlak i η= dinamička viskoznost.

Prilikom mjerenja viskoznosti uspoređuju se vremena protjecanja otopine, *t* i čistog otapala t_0. Omjer protjecanja otopine i otapala proporcionalan je njihovi viskoznostima, a prethodno definirani odnos definiran je relativnom viskoznošću, η_{rel}. Povećanje viskoznosti

otopine u odnosu na otapalo proporcionalno je volumenu molekula u otopini odnosno duljini lanca i konformaciji molekula u otopini, a naziva se specifična viskoznost, η_{sp}. Omjer specifične viskoznosti i koncentracije naziva se reducirana viskoznost, η_{red}, a uvedena je kako bi se smanjio utjecaj koncentracije. Njene vrijednosti za vrlo razrijeđene polimerne otopine mogu se aproksimirati pravcem za vrijednost koncentracije, c= 0 g/cm^3 kao što je i prikazano na grafu 1. Ekstrapolacijom pravaca na koncentraciju nula dobiva se vrijednost granične viskoznosti, $[\eta]$ ili η_{int}, intrinzične viskoznosti. Intrinzična viskoznost povezana je s viskoznim prosjekom molekularne mase, $\bar{M}_v$ Mark-Houwinkovom relacijom:

$$\eta_{int} = \mathrm{k}\,\bar{M}_v^{\alpha}$$

gdje su *k* i α konstantne ovisne o sistemu polimer-otapalo pri određenoj temperaturi, a određuje se kalibracijom pomoću uzorka poznate molekulske mase[17].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Za izvođenje reakcije deacetilacije kitozana korištene su slijedeće kemikalije:

▪ Kitozan u praškastom obliku nepoznatog stupnja deacetilacije

▪ Natrijev hidroksid, NaOH (T.T.T. d.o.o., Hrvatska)

▪ Octena kiselina

▪ destilirana voda

3.2. REAKCIJA DEACETILACIJE KITOZANA

Pojam deacetilacija opisuje reakciju kojom se odvodi acetilna skupina nekom određenom spoju. U ovom završnom radu izvedena je deacetilacija kitozana gdje je u određenim reakcijskim uvjetima došlo do uklanjanja preostalih acetilnih skupina na kitozanu. Produkti reakcije deacetilacije kitozana podvrgnuti su karakterizaciji prilikom čega je ispitivan stupanj deacetilacije kitozana (DD) i prosječna molekularna masa kitozana nakon deacetilacije. Stupanj deacetilacije kitozana nam predstavlja postotak slobodnih NH_2 skupina u strukturi kitozana.

3.2.1. UVJETI IZVOĐENJA REAKCIJE DEACETILACIJE KITOZANA

Reakcija deacetilacija je izvedena tako što je pomiješano 250 mL 25% otopine natrijeva hiroksida i 25 g kitozana u tikvici sa okruglim dnom. Reakcija je trajala ukupno 48 sati uz neprestano korištenje povratnog hladila. Nadalje, izvedene su dvije reakcije, jedna pri sobnoj temperaturi, a druga pri temperaturi od 60° C Celzijevih. Odabrane su dvije različite temperature kako bi pri karakterizaciji produkata deacetilacije kitozana uvidjeli kako temperatura utječe na stupanj deacetilacije i degradaciju polimera odnosno na njegovu molekularnu masu.

Tijekom izvođenja reakcije pri temperaturi od 60° C prikupljena su ukupno četiri različita uzorka u različitim vremenskim intervalima. Prvi uzorak je prikupljen nakon 3 h izvođenja reakcije, slijedeći nakon 18 h, zatim nakon 24 h i naposljetku nakon 48 h. Tijekom

izvođenja reakcije pri sobnoj temperaturi prikupljena su ukupno dva uzorka u različitim vremenskim intervalima. Prvi uzorak je prikupljen nakon 24 h, a drugi nakon 48 h odnosno na samom kraju reakcije. Različiti vremenski intervali za prikupljanje uzoraka su odabrani iz razloga kako bi pri karakterizaciji produkata deacetilacije kitozana uvidjeli kako vrijeme trajanja reakcije deacetilacije kitozana utječe na stupanj deacetilacije i degradaciju polimera odnosno na njegovu molekularnu masu.

3.2.2. ODREĐIVANJE STUPNJA DEACETILACIJE KITOZANA

IR spektri polaznog i deacitiliranog kitozana su snimljeni na Shimadzu FT-IR 8400S spektrometru u području 4000 – 400 cm^{-1}, na dodatku za mjerenje reflektanskog spektra SRM-8000A. Uzorak je pripravljen tako da je u kapsulu nanesena potrebna količina deacitiliranog kitozana u praškastom obliku. Kao bazni intenzitet snimili smo spektar polaznog kitozana te smo na taj način dobili razlikovne spektre koji puno osjetljivije i bolje pokazuju kemijsku promjenu deacetiliranih uzoraka. IR spektri su izuzetno osjetljivi na ostatke vode u uzorcima. Kako bi odstranili najveći dio vode adsorbirane na kitozan, uzorke smo smjestili u vakuum eksikator na sobnoj temperaturi pri tlaku od 1×10^{-1} Pa gdje su odstojali 24 h.

3.2.3. ODREĐIVANJE MOLEKULARNE MASE PRODUKATA DEACETILACIJE KITOZANA

Za određivanje molekularne mase produkata deacetilacije kitozana koristili smo metodu mjerenja statičkog raspršivanja svjetlosti pomoću instrumenta Malvern Zetasizer Nano S.

Za mjerenja navedenim uređajem bilo je potrebno pripremiti seriju otopina kitozana različitih masenih koncentracija, γ_1=0,01 mg/mL, γ_2=0,08 mg/mL, γ_3=0,05 mg/mL, γ_4=0,03 mg/mL i γ_5=0,001 mg/mL. Za pripremu otopina navedenih koncentracija kao otapalo korištena je otopina pripravljena od 10% octene kiseline i otopine 0,1M NaCl. Otopine pojedinih koncentracija pripravljene su u tikvici od 30mL pa je tako za pripravu otopine koncentracije γ_1=0,01 mg/mL na analitičkoj vagi odvagano 0,3 g tvorničkog kitozana nepoznatog stupnja deacetilacije. Svaka slijedeća otopina pripremana je razrjeđenjem iz otopine masene

koncentracije γ_1=0,01 mg/mL. Za određivanje prosječne molekularne mase deacetiliranog kitozana korišteno je 8 mL od svake koncentracije otopine.

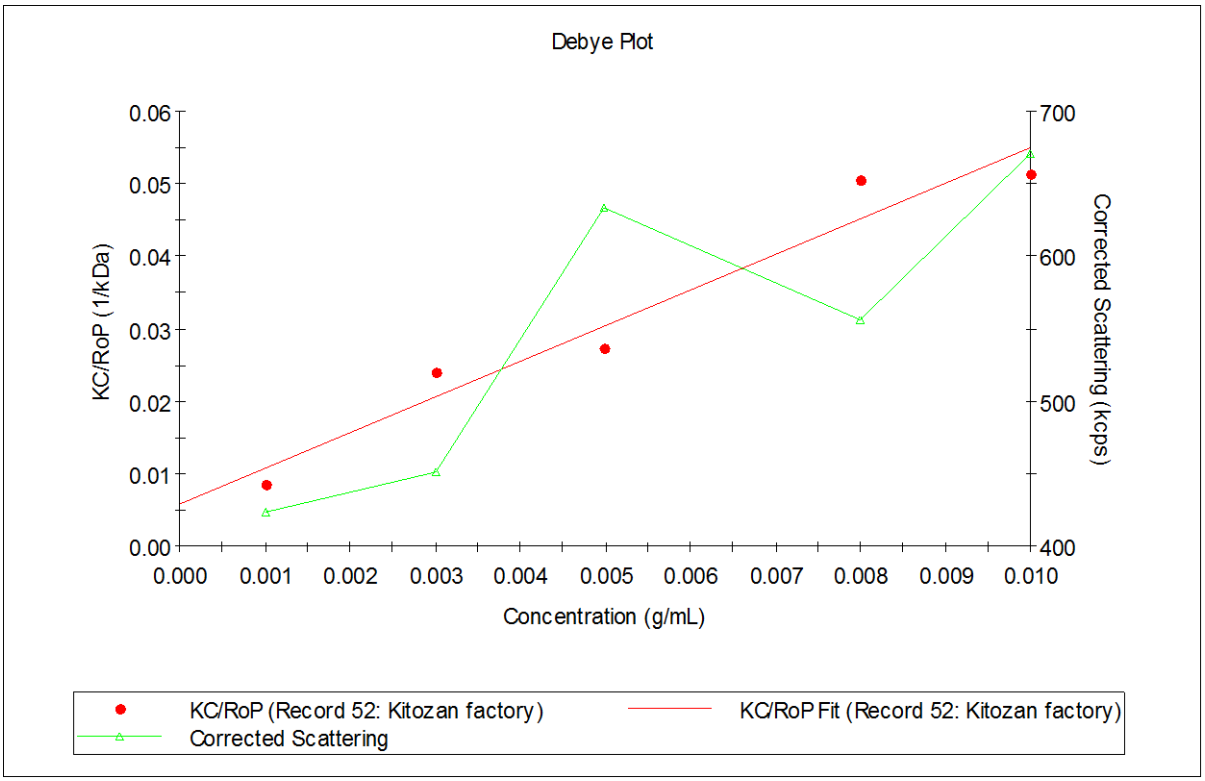
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. ODREĐIVANJE MOLEKULARNE MASE PRODUKATA DEACETILACIJE KITOZANA

U sljedećoj tablici navedeni su podatci dobiveni mjerenjem statičkog raspršenja svjetlosti serije otopina polaznog kitozana ispod kojeg je prikazan Debye graf za određivanje molekularne mase polaznog kitozana:

Tablica 1. Podaci dobiveni mjerenjem statičkog raspršenja svjetlosti serije otopina polaznog kitozana.

Conc. g/mL	Corrected Scattering kcps	KC/RoP 1/kDa
0,00100	423,7	0,00858
0,00300	451,0	0,0240
0,00500	633,6	0,0275
0,00800	556,6	0,0506
0,0100	671,4	0,0516



Graf 1. Debey graf za određivanje molekularne mase polaznog kitozana.

Iz Debayevog grafa određena je molekularna masa M=170 ±71,1 kDa uz korelacijski koeficijent R^2 =0951, što odgovara prihvatljivoj kvaliteti određivanja molekularne mase. Vrijednost drugog virijalnog koeficijenta je A_2=0,00247±0,00032 ml mol/g^2.

Podatci određenih molekularnih masa deacetiliranih produkata mogu se pronaći u slijedećoj tablici:

Tablica 2. Podatci eksperimentalno određenih molekularnih masa deacetiliranih produkata kitozana.

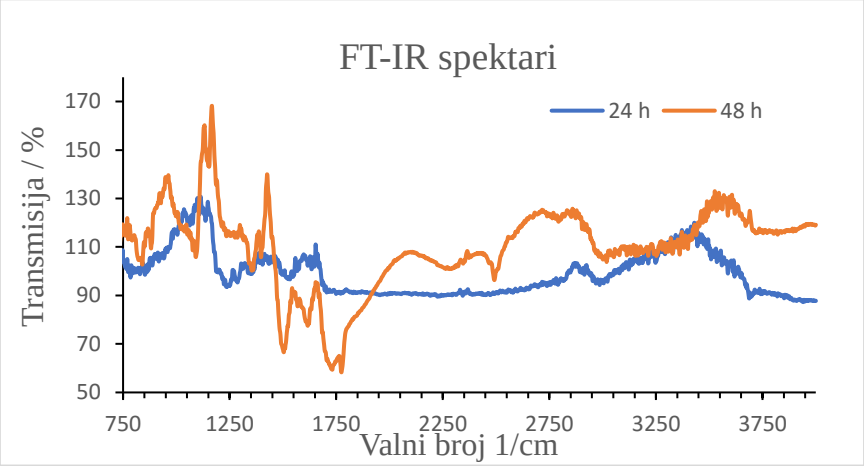
Broj uzorka	**Temperatura deacetilacije** [**°C**]	**Vrijeme deacetilacije** [**h**]	**Molekularna masa** [**kDa**]	**Drugi virijalni koeficijent** $[\mathbf{mL\ mol}/g^2]$
1	0	0	170 ±71,1	0,00247
2	25	24	120± 68,9	0,00436
3	25	48	69,6±14,2	0,00035
4	60	3	160±82,7	0,00220
5	60	24	82,7±42,3	0,07310
6	60	48	60,2±31,2	0,00373

Eksperimentalno dobivene vrijednosti molekularne mase deacetiliranog kitozana prikazane u tablici gore ukazuju na to da molekularna masa deacetiliranog kitozana pri sobnoj temperaturi od 25°C s vremenom opada, odnosno dolazi do degradacije polimera. Također, iz dobivenih vrijednosti možemo uvidjeti kako pri temperaturi od 60°C molekularna masa kitozana s vremenom isto tako opada.

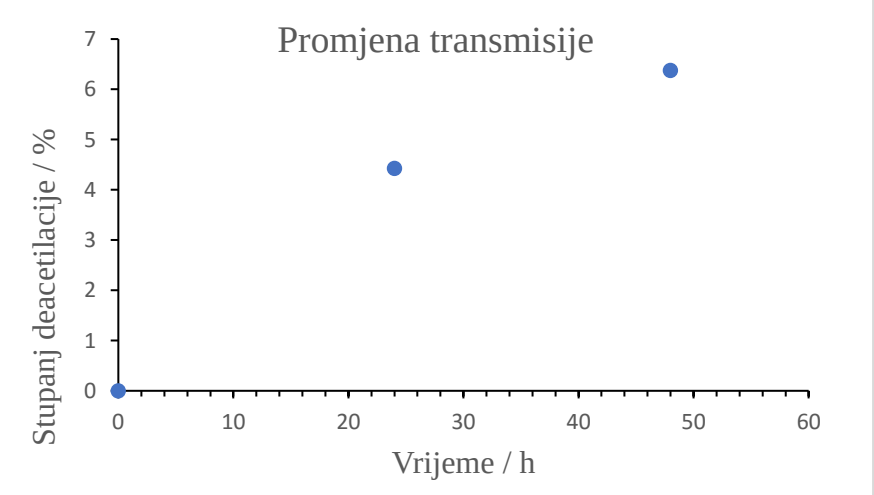
4.2. ODREĐIVANJE STUPNJA DEACETILACIJE KITOZANA

4.2.1. ODREĐIVANJE STUPNJA DEACETILACIJE PRI 25°C

Graf broj 2 prikazuje snimljeni FT-IR spektar kitozana deacetiliranog pri 25°C. Za pripravu grafa korišteni su podaci snimljeni za uzorke kitozana prikupljene nakon 24 h i 48 h deacetilacije. Nadalje, graf broj 3 prikazuje promjenu transmisije FT-IR spektra deacetiliranog kitozana. Promjena transmisije nam ukazuje na porast stupnja deacetilacije kitozana. Iz grafa broj 2 možemo uvidjeti da s povećanjem vremena trajanja reakcije deacetilacije kitozana dolazi do rasta postotka uklonjenih acetilnih skupina s polimera iz čega možemo zaključiti da dolazi do povećanja stupnja deacetilacije (DD) kitozana.



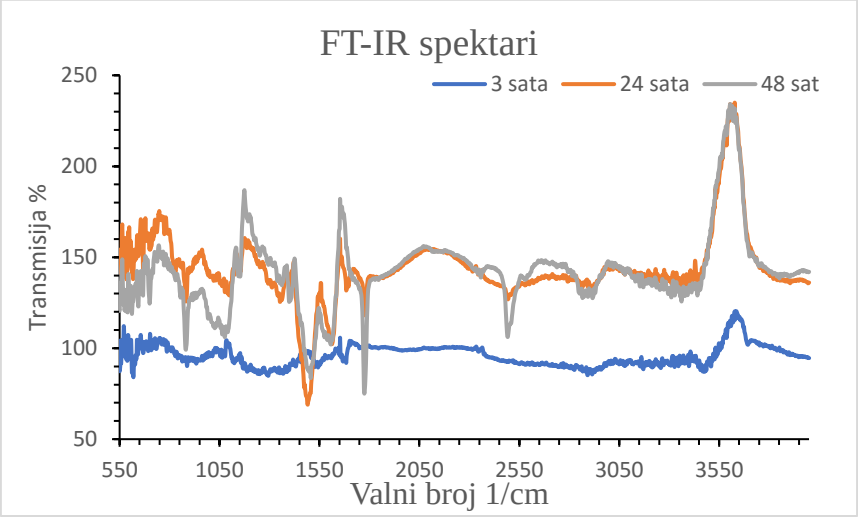
Graf 2. Prikaz FT-IR spektra deacetiliranog kitozana pri 25°C.



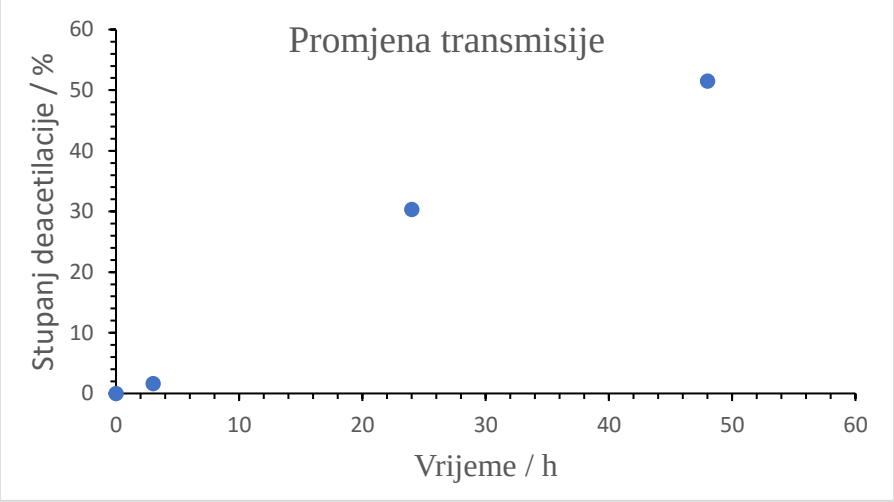
Graf 3. Promjena transmisije FT-IR spektra deacetiliranog kitozana pri 25°C.

4.2.2. ODREĐIVANJE STUPNJA DEACETILACIJE PRI 60°C

Graf broj 4 prikazuje snimljeni FT-IR spektar kitozana deacetiliranog pri 60°C. Za pripravu grafa korišteni su podaci snimljeni za uzorke kitozana prikupljene nakon 3 h, 24 h i 48 h deacetilacije. Nadalje, graf broj 4 nam prikazuje promjenu transmisije FT-IR spektra deacetiliranog kitozana. Promjena transmisije nam ukazuje na porast stupnja deacetilacije kitozana. Iz grafa broj 5 možemo uvidjeti da s povećanjem vremena trajanja reakcije deacetilacije kitozana dolazi do rasta postotka uklonjenih acetilnih skupina s polimera, a time isto kao i pri deacetilaciji kitozana 25°C zaključujemo da dolazi do povećanja stupnja deacetilacije (DD) kitozana.



Graf 4. Prikaz FT-IR spektra deacetiliranog kitozana pri 60°C.



Graf 5. Promjena transmisije FT-IR spektra deacetiliranog kitozana pri 60°.

5. ZAKLJUČAK

Eksperimentalnim dijelom ovog završnog rada utvrđeno je na koji način temperatura i vrijeme trajanja reakcije deacetilacije kitozana utječu na molarnu masu i stupanj deacetilacije (DD) deacetiliranog kitozana. Prema specifikacijama proizvođača molarna masa tvorničkog kitozana je od 100-300 kDa, a eksperimentalno određena molarna masa metodom statičkog raspršenja svjetlosti je 172 kDa što se dobro podudara sa tvornički dobivenim podatkom.

Metodom statičkog raspršivanja svjetlosti određene su molekularne mase deacetiliranih produkata kitozana. Dobivene vrijednosti molekularne mase deacetiliranog kitozana prethodno spomenutom metodom ukazuju na to da molekularna masa deacetiliranog kitozana pri sobnoj temperaturi od 25° C s vremenom opada, odnosno dolazi do degradacije polimera. Također, iz dobivenih vrijednosti možemo uvidjeti kako pri temperaturi od 60° C molekularna masa kitozana s vremenom isto tako opada. Također, dobivene vrijednosti ukazuju na to da je molekularna masa kitozana puno manja pri temperaturi od 60° C nego pri temperaturi od 25° C iz čega možemo zaključiti kako temperatura uvelike utječe na degradaciju polimera te da s povišenjem temperature i povećanjem vremena trajanja reakcije deacetilacije dolazi do smanjenja molekularne mase kitozana. Mjerenjem FT-IR spektra deacetiliranog kitozana iz dobivenih vrijednosti možemo uvidjeti porast stupnja deacetilacije kitozana. S povećanjem vremena trajanja reakcije deacetilacije kitozana dolazi do porasta postotka uklonjenih acetilnih skupina s kitozana iz čega možemo zaključiti da dolazi do povećanja stupnja deacetilacije (DD) kitozana. Također, iz pripremljenih grafova možemo iščitati kako je pri temperaturi od 60° C puno viši stupanj deacetilacije kitozana nego pri temperaturi od 25° C, a razlog tome je što reakciji deacetilacije kitozana pogoduju ekstremniji uvjeti u reakciji u vidu duljeg vremena trajanja reakcije i visoke temperature pri kojoj se reakcija izvodi.

U konačnici zaključujemo kako povišenjem temperature i povećanjem vremena trajanja reakcije deacetilacije kitozana dolazi do povećanja stupnja deacetilacije (DD) kitozana što ga čini primjenjivijim u raznolikim produktima različitih industrija. Nadalje, povišenjem temperature i povećanjem vremena trajanja reakcije deacetilacije kitozana dolazi do smanjenja molekularne mase kitozana odnosno njegove degradacije. Prevelika degradacija polimera otežava njegovu primjenu u industriji što zasigurno ostavlja prostora znanstvenoj zajednici da se istraži na koje sve načine se može smanjiti degradacija kitozana tijekom reakcije deacetilacije kako bi se on učinio što primjenjivijim u sintezi različitih produkata korisnih za cjelokupnu civilizaciju.

6. POPIS LITERATURE

[1] Charles E. Carraher, Jr., Introduction to Polymer Chemistry. 3rd, CRC Press, 2012.

[2] Kumar Dutta, P.; Dutta, J.; Tripathi V. S., Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*, Vol. 63, str. 20-31., 2007.

[3] Dash, M.; Chiellini, C; Ottenbriteb, R.M.; Chiellini E., Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, Vol. 36, str. 981.–1014., 2011.

[4] Ravi Kumar Majeti N.V., A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, Vol. 46., str. 1.-27., 2000.

[5] Muzzarelli, R.A.A., Natural Chelating Polymers. *Pergamon Press*, New York, 1973., str. 83.

[6] http://medicinar.mef.hr/assets/arhiva/regenerativna-medicina1.pdf (pristup: ožujak, 2018.)

[7] Harrison, L. G., The shaping of life: The generation of biological pattern. *Cambridge University Press*, 2011.

[8] Murugan R., Ramakrishna S., Biomaterials, Vol. 25, 17, str. 3829–35, 2004.

[9] Pustak, A., Svojstva i primjena polimera u oblikovanju lijekova. *Medicinski Vjesnik*, Vol.42 (3-4), str. 213.-229., 2010.

[10] Yang, Y.M.; Hu, W.; Wang, X.D., The controlling biodegradation of chitosan fibers by N-acetylation in vitro and in vivo. *J Mater Sci: Mater Med*., Vol. 18(11), str. 2117.–2121., 2007.

[11] P. Ding; K.L. Huang; G.Y. Li; W.W. Zeng. *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 146, str. 58.–64., 2003.

[12] K.G. Carrasquillo, et al., Non-aqueous encapsulation of excipient-stabilized spray-freeze dried BSA into poly(lactide-co-glycolide) microspheres results in release of native protein, *J. Control.* Vol. 76 (3), str.199.–208., 2001.

[13] Yuan, Y.; Chesnutt, B.M.; Haggard, W.; Baumgardner, J.D., Deacetylation of Chitosan: Material Characterization and in vitro Evaluation via Albumin Adsorption and Pre-Osteoblastic Cell Cultures. *Materials*, Vol. 4, 1399-1416, 2011.

[14] Broussignac, P. Un polymere natural pecu cannu dans l' industrie e chitosane. *Chim. Ind.-Genie Chim*. 1970, 99, 1241-1247.

[15] B. Čalija, J. Milić, D. Krajišnik, A. Račić, Karakteristike i primena hitozana u farmaceutskim/biomedicinskim preparatima, *Arh. Farm.* 63, 2013, 347-364.

[16] Min Larag, T.; Rong Huei, C., Molecular Weight Determination of 83% Degree of Decetylation Chitosan with Non-Gaussian and Wide Range Distribution by High-Performance

Size Exclusion Chromatography and Capillary Viscometry. *Materials*, Vol. 6, 1580-1602, 2012.

[17] https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/Skripta_vjezbe_dio_Hrnjak-Murgic.pdf (pristup: 21. lipanj, 2018.)

[18] M.L. Duarte, M.C. Ferreira, M.R. Marvao, Joa RAn optimised method to determine the degree of acetylation of chitinand chitosan by FTIR spectroscopyocha, International Journal of Biological Macromolecules 31 (2002) 1/8