

# Polimerni filmovi na bazi biopolimera kitozana

---

**Kusanović, Duje**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:209746>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

**Duje Kusanović**

**ZAVRŠNI RAD**

Zagreb, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidat     **Duje Kusanović**    

Predao je izraden završni rad dana:     17. rujna 2021.    

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Zlata Hrnjak-Murgić, Fakultet kemijskog inženjerstva  
i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Doc. dr. sc. Zvonimir Katančić, Fakultet kemijskog inženjerstva i  
tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki, Fakultet kemijskog  
inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Prof. dr. sc. Elvira Vidović, Fakultet kemijskog inženjerstva i  
tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, zamjena

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred  
povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana:     22. rujna 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

**Duje Kusanović**

**POLIMERNI FILMOVI NA BAZI BIOPOLIMERA KITOZANA**

**ZAVRŠNI RAD**

Mentorica: prof. dr. sc. Zlata Hrnjak-Murgić

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Zlata Hrnjak-Murgić

doc. dr. sc. Zvonimir Katančić

prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki

Zagreb, rujan 2021.

*Ovaj rad izrađen je na Zavodu za polimerno inženjerstvo i organsku kemijsku tehnologiju na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.*

*Zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Zlati Hrnjak-Murčić na strpljenju, pomoći i stručnim savjetima tijekom izrade završnog rada te posebno doc. dr. sc. Zvonimiru Katančiću na pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela.*

*Posebno zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na beskrajnoj podršci koja me prati kroz život.*

## SAŽETAK

Biopolimeri se u svakodnevnom životu sve češće koriste kao zamjena za sintetske polimere zbog svoje sposobnosti biorazgradnje i tako značajno utječu na smanjenje onečišćenja okoliša i emisije CO<sub>2</sub>. Jedan od široko primjenjivanih biopolimera je kitozan. Kitozan se zbog svojih iznimno dobrih svojstava poput biorazgradljivosti, biokompatibilnosti i antimikrobnog djelovanja koristi u prehrambenoj industriji, biomedicini te industriji premaza. U ovom radu provedeno je ispitivanje filmova čistog kitozana (Cs) te kitozana uz dodatak titanijevog dioksida (Cs-TiO<sub>2</sub>) s ciljem povećanog učinka antimikrobnog djelovanja te smanjenja adsorpcije organskih tvari.

Uzorci kitozanskih filmova pripremljeni su otapanjem kitozana velikih molekulskih masa (100.000 - 300.000 Da) u 1%-tnoj otopini octene kiseline, a nanokompozitni filmovi su pripremljeni uz dodatak 5 mas. % nanočestica titanijevog dioksida (TiO<sub>2</sub>) u otopinu kitozana.

Karakterizacija kitozanskih filmova provedena je određivanjem antimikrobnog djelovanja na tri bakterijske kulture: *Escherichia coli* (3001), *Pseudomonas aeruginosa* (3011) i *Bacillus subtilis* (3020), određivanjem kontaktnog kuta pomoću goniometra te određivanjem mehaničkih svojstava na kidalici testom naprezanje - istezanje. Morfologija kitozanskih filmova karakterizirana je pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM) u svrhu određivanja dispergiranja nanočestica u kitozanskoj matrici.

Analiza rezultata karakterizacije pokazuje da uzorci kitozana te nanokompozita kitozana ne posjeduju antimikrobno djelovanje ni za jednu od tri ispitivane bakterijske kulture. Dodatkom nanočestica TiO<sub>2</sub> u kitozan došlo je do promjene mehaničkih svojstava te do smanjenja hidrofobnosti.

**Ključne riječi:** biopolimeri, biorazgradljivost, kitozan, nanokompoziti, antimikrobno djelovanje

## Polymer films based on biopolymer chitosan

### SUMMARY

Biopolymers are increasingly used in everyday life as a substitute for synthetic polymers due to their biodegradability as they have a significant impact on reduction of environment pollution and CO<sub>2</sub> emissions. One of the widely used biopolymers is chitosan. Due to its extremely good properties such as biodegradability, biocompatibility and antimicrobial activity, chitosan is used in the food industry, biomedicine, and the coating industry. In this work, the films of pure chitosan (Cs) and chitosan with the addition of titanium dioxide (Cs-TiO<sub>2</sub>) were studied with the aim of increasing the effect of antimicrobial activity and reducing the adsorption of organic matter.

Samples of chitosan films were prepared by dissolving high molecular weight chitosan (100.000 - 300.000 Da) in 1% acetic acid solution, and nanocomposite films were prepared with the addition of 5 wt. % titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles in chitosan solution.

Characterization of chitosan films was performed by determining the antimicrobial activity on three bacterial cultures: *Escherichia coli* (3001), *Pseudomonas aeruginosa* (3011) and *Bacillus subtilis* (3020). Then, the contact angle was determined using a goniometer and the mechanical properties were determined by testing machine performing a stress - strain measurements. The morphology of chitosan films was characterized by scanning electron microscope (SEM) to determine the dispersion of nanoparticles in the chitosan matrix.

Analysis of the results shows that the samples of chitosan and nanocomposites of chitosan do not have antimicrobial activity for any of the three tested bacterial cultures. The addition of TiO<sub>2</sub> nanoparticles to chitosan resulted in a change in mechanical properties and a decrease in hydrophobicity.

**Keywords:** biopolymers, biodegradability, chitosan, nanocomposites, antimicrobial activity

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
<b>2.1. POLIMERNI MATERIJALI</b> .....	2
2.1.1. Svojstva polimernih materijala.....	3
2.1.2. Proizvodi i njihova primjena .....	6
<b>2.2. BIOPOLIMERI</b> .....	8
2.2.1. Izvori biopolimera.....	8
2.2.2. Biorazgradljivost.....	10
2.2.3. Antimikrobno djelovanje .....	11
2.2.4. Nastajanje biofilma .....	12
<b>2.3. KITOZAN</b> .....	13
<b>2.4. MODIFIKACIJA POLIMERA</b> .....	20
2.4.1. Fizička modifikacija.....	21
<b>2.5. TEHNIKE KARAKTERIZACIJE</b> .....	22
2.5.1. Karakterizacija površine.....	23
2.5.2. Mehanička svojstva.....	24
2.5.3. SEM mikroskopija .....	25
<b>3. METODIKA</b> .....	27
<b>3.1. MATERIJALI I KEMIKALIJE</b> .....	27
<b>3.2. PRIPRAVA UZORAKA</b> .....	27
<b>3.3. METODE KARAKTERIZACIJE</b> .....	28
3.3.1. Određivanje antimikrobnih svojstava.....	28
3.3.2. Određivanje kontaktnog kuta.....	29
3.3.3. Određivanje mehaničkih svojstava .....	29
3.3.4. SEM mikroskopija .....	30
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	31
<b>4.1. ANALIZA REZULTATA ANTIMIKROBNOG DJELOVANJA</b> .....	31
<b>4.2. ANALIZA REZULTATA KONTAKTNOG KUTA</b> .....	33
<b>4.3. ANALIZA REZULTATA MEHANIČKIH SVOJSTAVA</b> .....	35
<b>4.4. ANALIZA REZULTATA SEM ANALIZE</b> .....	37
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	39
<b>6. LITERATURA</b> .....	40
<b>7. ŽIVOTOPIS</b> .....	42



## 1. UVOD

Polimeri su organski materijali koji se sastoje od mnogo ponavljajućih strukturnih jedinica, mera, odnosno jednostavnijih niskomolekularnih spojeva monomera, koji se u procesu polimerizacije povezuju u makromolekulu, odnosno polimerni lanac. Prema porijeklu dijele se na prirodne i sintetske polimere. Prirodni polimeri nastaju u prirodi u biljkama i živim organizmima dok se sintetski dobivaju u industriji polimerizacijom monomera, derivata dobivenih iz nafte. Primjena polimera i polimernih materijala jako je raširena zbog njihovih povoljnih svojstava, dostupnosti, niskih cijena te mogućnosti recikliranja, no velik nedostatak je činjenica da je sirovina za njihovu proizvodnju nafta, koja je neobnovljivi izvor sirovine. Također, većina sintetskih polimera nije biorazgradljiva što znači da onečišćuju okoliš. U svrhu rješavanja ovih problema znanstvena istraživanja fokusiraju se na biopolimere kao potencijalnu zamjenu. Biopolimeri su polimeri koji nastaju u prirodi ili iz prirodnih sirovina te oni koji nastaju iz derivata nafte koji se mogu biorazgraditi. Biorazgradljivi polimeri razlažu se pod utjecajem mikroorganizama i njihovog enzimskog djelovanja na ugljikov dioksid, vodu, biomasu i dijelom metan u relativno kratkom vremenu. Prednosti uporabe takvih polimera su smanjenje emisije stakleničkih plinova u atmosferu i smanjenje onečišćenja okoliša. Sirovine koje se koriste u njihovoj proizvodnji su iz obnovljivih izvora te njihova otpadna biomasa može također poslužiti kao sirovina i uza sve to imaju slična svojstva sintetskim.

Jedan od najraširenijih biopolimera u prirodi je hitin. Hitin je sastavni dio egzoskeletona rakova, škampa, jastoga i školjaka, a nalazi se također i u gljivama. Pošto je tvrd i teško topljiv, njegova obrada i primjena je otežana i zbog toga se modifikacijom prevodi u kitozan. Kitozan se ističe svojstvima biorazgradljivosti, biokompatibilnosti, nije toksičan te ima svojstvo antimikrobnog djelovanja, odnosno usporavanja rasta mikroorganizama zbog čega ima raširenu primjenu u medicini u obliku medicinskih zavoja. Također, koristi se u obliku premaza za brodove gdje zbog povoljnog svojstva antibioobraštanja (eng. antifouling) služi kao zaštita od obraštanja brodova algama. Zbog dobrog svojstva adsorpcije koristi se za izdvajanje metalnih iona pri pročišćavanju otpadnih voda, a može se upotrebljavati kao ambalaža za pakiranje hrane.

U ovom radu provedeno je ispitivanje kitozanskih filmova uz dodatak titanijevog dioksida ( $\text{TiO}_2$ ) s kojim su pripremljeni polimerni nanokompozitni filmovi s ciljem povećanog učinka antimikrobnog djelovanja te smanjenja adsorpcije organskih tvari i nastajanja biofilma.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. POLIMERNI MATERIJALI

Polimerni materijali su prirodni i sintetski materijali dobiveni preradom polimera uz dodatak različitih aditiva. Upotrebljavaju se u raznim aspektima svakodnevnog života zbog odličnih svojstava, niske cijene, dostupnosti i mogućnosti recikliranja. Polazne sirovine za pripremu takvih materijala, nažalost, dolaze iz nafte koja se smatra neobnovljivim izvorom sirovina. Osim toga, većina sintetskih polimernih materijala nije biorazgradljiva pa predstavljaju velik izvor onečišćenja u okolišu. U biorazgradljive polimere svrstavaju se svi polimeri koji se u prirodi u relativno kratkom vremenu razgrade uz pomoć mikroorganizama na ugljikov dioksid, vodu, biomasu i dijelom metan.<sup>1</sup> Polimerni materijali se dijele na poliplaste, koje se dalje dijele na plastomere (termoplaste) i duromere (termosete) te gume odnosno elastomere (prirodne i sintetske). U poliplaste se ubrajaju oni polimeri kod kojih se javlja plastična (trajna) deformacija uslijed naprezanja. Plastomeri su topljivi i mogu se višestruko taliti bez promjene svojeg sastava i strukture što znači da se mogu i preoblikovati dok se duromeri ne mogu otapati ili taliti nakon sinteze bez promjene vlastitog kemijskog sastava i strukture. Elastomeri su umreženi plastomeri, a odlikuju se velikom otpornošću prema deformaciji pri čemu ne dolazi do pucanja već nakon prestanka opterećenja, materijal se vraća u svoj početni oblik (elastična deformacija). Polimerne mješavine su mješavine dvaju ili više polimera, a proizvode se u svrhu poboljšavanja svojstava svake od komponenti, tj. u svrhu dobivanja novih materijala. Polimerne mješavine dijele se na: potpuno mješljive, djelomično mješljive i nemješljive.<sup>2</sup> Polimerni (nano)kompoziti su materijali, koji se sastoje od polimerne matrice u kojoj su raspršena punila ili ojačavala mikro- ili nanometarskih dimenzija. Oni se ubrajaju u nove, hibridne materijale u kojima aktivna tvar nanometarskih dimenzija pridonosi poboljšanju ili stvaranju u potpunosti novih svojstava, koja ne posjeduju klasični kompoziti.<sup>3</sup>

### 2.1.1. Svojstva polimernih materijala

Polimerne materijale razlikujemo i koristimo prema njihovim svojstvima. Svojstva polimernih materijala ovise o kemijskom sastavu te strukturi polimernih molekula, odnosno lanaca koji izgrađuju taj materijal. Određivanjem svojstava polimernog materijala možemo ga okarakterizirati i na osnovi toga odrediti njegovu kvalitetu te područje primjene. Karakterizacija polimernog materijala provodi se identifikacijom kemijskog sastava, strukture polimernog lanca, određivanjem veličine i raspodjele molekulskih masa polimera, određivanjem amorfne, odnosno kristalne strukture te morfologije (ukoliko je riječ o višefaznim sustavima). Svojstva koja određujemo kod polimera su: kemijska, fizička, mehanička, optička, električna i druga.

**Kemijska svojstva** odraz su promjene kemijskog sastava i strukture materijala budući da u određenim uvjetima dolazi do kidanja primarnih kemijskih veza u molekulama. Neka od najvažnijih kemijskih svojstava polimera su postojanost (stabilnost), topljivost, gorivost te barijerna svojstva poput permeabilnosti.

Postojanost predstavlja otpornost materijala na određene uvjete primjene; temperature, tlaka, pH ili utjecaj elektromagnetskog zračenja. Posljedica niske postojanosti materijala je njegovo starenje, tj. degradacija materijala budući da se degradiraju / razgrađuju polimerne molekule. Dakle, dolazi do promjene kemijskog sastava, strukture, a time i do promjene svojstava.

Otapanje polimera se javlja u slučaju kad su nadjačane kohezivne sile između makromolekula polimera, odnosno kad su jače sile između makromolekula i otapala. Do otapanja može doći kod linearnih polimera dok kod umreženih polimera dolazi do pojave bubrenja materijala. Bubrenje je pojava kada dolazi do prodiranja molekula otapala među polimerne molekule čime nastaje nabubreni gel. Otapanje i bubrenje polimernih materijala tijekom njihove primjene je nepoželjno.

Gorivost je svojstvo polimera, koje se pokazuje prilikom izlaganja polimera velikoj toplini pri čemu dolazi do degradacije (raspada) polimera, nastajanja topline i plinovitih produkata. Gorenje polimera je egzotermna reakcija, koja pokazuje da su polimeri jako energetski bogati materijali.

Permeabilnost (propusnost) je svojstvo materijala da propušta plinove i pare ovisno o veličini pora u svojoj strukturi i značajno je za polimerne filmove, premaze i polimere koji se upotrebljavaju kao ambalažni materijali za pakiranje hrane.

**Fizička, odnosno fizikalna svojstva** polimera podrazumijevaju fizikalne promjene materijala. Tijekom tih promjena dolazi do cijepanja sekundarnih (kohezijskih) veza u polimeru bez kidanja primarnih kemijskih veza. Sekundarne veze se razlikuju od primarnih jer su puno slabije, a među njih svrstavamo van der Waalsove, polarne, vodikove veze i dr. Van der Waalsove sile su privlačne sile, koje se javljaju između dviju molekula polimera uslijed interakcije električnih dipola. Vodikove veze su veze koje se baziraju na interakciji između atoma vodika jedne molekule i jako elektronegativnih atoma (N, O, F) druge molekule polimera i jače su od van der Waalsovih sila. Kidanje sekundarnih veza u polimerima uzrokuje promjenu stanja materijala, ali ne i kemijskog sastava. Stoga, svojstva koja pritom određujemo, a koja karakterizaciju polimerni materijal su: temperatura taljenja, temperatura točke mekšanja, gustoća i viskoznost materijala. Temperatura taljenja je temperatura pri kojoj dolazi do promjene agregatnog stanja polimernog materijala koji prelazi u taljevinu. Taljenje je fazni prijelaz u kojem kruti polimer prelazi u polimernu taljevinu. Točka ili temperatura mekšanja je temperatura na kojoj dolazi do značajnog popuštanja sekundarnih veza u polimernom materijalu i važan je pokazatelj za određivanje granične temperature primjene. Svako opterećenje iznad te temperature dovodi do deformacije materijala.

Gustoća materijala je značajno svojstvo u primjeni jer su materijali niske gustoće lagani, a materijali visoke gustoće teški. To svojstvo je od iznimne važnosti kod transporta proizvoda te kod rukovanja proizvodima u primjeni.

Viskoznost se definira kao mjera unutarnjeg otpora molekula protjecanju taljevine ili otopine. Viskoznost je posljedica veličine i raspodjele molekulskih masa, a važna je za preradu polimera. Ukoliko određena taljevina ima nisku vrijednost viskoznosti može se zaključiti da je riječ o polimeru visokih molekulskih masa. Takav polimer sporije teče, teško ispunjava kalup tijekom prerade i teže se homogenizira s aditivima. Obrnuto vrijedi za polimere visokih vrijednosti viskoznosti.<sup>2</sup>

**Mehanička svojstva** predstavljaju ponašanje (odziv) materijala pri primjeni vanjskih sila. Mehanička svojstva koja se ističu pri opisivanju polimernih materijala su: čvrstoća, tvrdoća, istezanje i žilavost. Čvrstoća je mjera jakosti nekog materijala, a određuje se silom koja je

potrebna da uzrokuje pucanje materijala. Tvrdoća je otpornost materijala prema prodiranju nekog drugog, znatno tvrđeg tijela. Istezanje je deformacije materijala do koje dolazi tijekom djelovanja tlačne ili vlačne sile na materijal, tj. tijekom djelovanja naprezanja. Žilavost predstavlja otpornost materijala na lom, tj. žilavost je sposobnost materijala da apsorbira energiju i plastično se deformira bez loma.<sup>4</sup>

Među **električnim svojstvima** polimernih materijala ističe se električna vodljivost koja opisuje sposobnost materijala da provodi električnu struju. Većina polimernih materijala ima nisku električnu vodljivost pa se zato koriste kao električni izolatori.<sup>5</sup>

**Optička svojstva** imaju uglavnom dekorativnu, ali i primjensku ulogu. Među njima se izdvaja transparentnost (propusnost svjetlosti). Kod polimernih materijala poželjne su transparentnost i nepropusnost svjetla.<sup>2</sup>

Od ostalih svojstava polimernih materijala ističu se **biološka svojstva**. Biološka svojstva odnose se na promjene uzrokovane kemijskim procesima vezanim uz biljke ili žive organizme. Važnija biološka svojstva polimernih materijala su antimikrobno djelovanje i svojstvo antibioobraštanja (eng. antifouling). Antimikrobno djelovanje je sposobnost polimernog materijala da onemogućuje rast i razmnožavanje mikroorganizama na vlastitoj površini. To je svojstvo materijala da inhibira (usporava) ili u potpunosti zaustavi širenje mikroorganizama, a mogu ga posjedovati materijali prirodnog, polusintetskog i sintetskog porijekla. Iznimno je važno svojstvo za uporabu materijala u medicini (npr. u medicinskim zavojima za sprječavanje infekcije) i u prehrambenoj industriji gdje se polimeri koriste kao ambalaža za sprječavanje kvarenja hrane i zbog toga se u novije vrijeme intenzivno istražuje.<sup>6</sup>

Antibioobraštanje je svojstvo koje sprječava vezanje i rast mikroorganizama na površini određenog materijala, kad je materijal u dodiru s mikroorganizmima i vlagom ili vodenim medijem. Posljedica interakcije polimerne površine i mikroorganizama je njihova adsorpcija na površinu materijala i nastajanje biofilma te rast algi. Važno je opisati svojstvo antibioobraštanja kad se materijali upotrebljavaju kao premazi jer sprječavaju obraštanje plovila i brodova.

Samoizlječenje materijala odnosi se na sposobnost materijala da automatski popravlja fizička oštećenja koja se na njima javljaju. Samoizlječenje materijala može biti potaknuto na dva načina: interakcijama molekula unutar polimera (npr. dinamičke kemijske veze ili kovalentne veze) ili putem vanjskih podražaja (toplina, vlaga, određeni reagensi). Materijali koji posjeduju svojstvo samoizlječenja upotrebljavaju se najčešće u funkcionalnim premazima jer

im produžuju životni vijek. Kao primjer se može navesti antikorozivni funkcionalni premaz u kojemu se samoizlječenjem popravljaju mikropukotine što doprinosi učinkovitosti inhibicije korozije.<sup>7</sup>

### **2.1.2. Proizvodi i njihova primjena**

Svakodnevni život je u modernim vremenima nezamisliv bez polimernih materijala. Oni nalaze primjenu u izradi odjeće i obuće, u medicini i kao građevinski materijali te se mogu upotrebljavati u obliku različitih spremnika, ambalaže, autoguma, vlakna, premaza (boje, lakovi) i filmova. Različiti spremnici koji se koriste u kućanstvu su dobiveni iz plastomera, odnosno plastike poput polipropilena (PP) zbog jednostavnog oblikovanja i niskih cijena. Polimeri koji posjeduju dobra barijerna i/ ili antibakterijska svojstva koriste se za ambalažu jer usporavaju kvarenje hrane onemogućavanjem rasta mikroorganizama.

U građevini se polimerni materijali najčešće upotrebljavaju kao tepisi (najlon, linoleum), za izradu kanalizacijskih cijevi (polietilen visoke gustoće, poli(vinil-klorid)) te za izolaciju. Za termoizolaciju fasada upotrebljava se stiropor (ekspandirani polistiren), a polimeri i gume se također mogu upotrebljavati i za hidroizolaciju jer su općenito nepropusni za vodu i vlagu. Za izradu odjeće i obuće upotrebljavaju se polimeri prerađeni u vlakna, a mogu biti prirodni poput celuloze, svile ili gume te sintetski kao najlon, poliester, poliamid i dr. U medicini polimeri se koriste za izradu umjetnih kukova, vena, zubi i zubnih plombi, a primjenjuju se i u kontaktnim lećama, naočalama te kao nosioci lijekova.

**Guma** je jedan od široko primjenjivanih polimernih materijala, a proizvodi se od prirodnog ili sintetskog kaučuka uz dodatak aditiva i umreživača, procesom vulkanizacije. Vulkanizacija je kemijska reakcija kojom se linearne polimerne molekule kaučuka poprečno povezuju stvarajući makromolekulske umrežene strukture uz pomoć sredstva za vulkanizaciju koje je najčešće sumpor. Guma se zbog male električne provodnosti često koristi za izolaciju žica u elektronicima. Otpornost na abraziju je svojstvo zbog kojeg guma nalazi primjenu u gumama za automobile te u izradi pokretnih traka. Guma se primjenjuje i u obliku gumenih brtvi zbog svoje otpornosti na vodu sprječavajući neželjeno curenje.

**Vlakna** mogu biti prirodna koja nastaju u biosintezi u biljkama ili sintetska dobivena industrijskim procesima u kojima dolazi do izravnivanja makromolekula polimera, koje se onda ispredaju u vlakna. Od prirodnih vlakana se izdvajaju celuloza, vuna i svila dok su

najpoznatija sintetska vlakna izrađena od poliestera i poliamida. Postupak dobivanja vlakana se dijeli u dvije faze: faza polimerizacije polimera te faza ispredanja polimera u vlakna iz otopine ili iz taljevine. Vlakna se mogu dobiti samo od polimera čije su molekule linearne i mogu poprimiti pravilnu kristalnu strukturu.

Polimerni filmovi se definiraju kao tanki kontinuirani materijali debljine oko 200  $\mu\text{m}$ . Mogu se upotrebljavati samostalno, kao završni sloj koji služi poboljšavanju svojstava materijala kojega štite ili se dodatnim postupcima prevode u različite oblike. Jedan od oblika su folije koje se koriste se najčešće za ambalažu, kao zaštitne folije (mjehurasta PVC folija) zatim u kućanstvu, za ukrašavanje te za oslikavanje vozila.

**Premazi** su tanke prevlake, odnosno filmovi koji se upotrebljavaju kao završni slojevi na nekoj podlozi ili materijalu. Među površinske premaze ubrajaju se lakovi i boje. Njihova uloga je zaštita od abrazije, habanja, korozije i starenja materijala te dekorativna (za modificiranje izgleda materijala). Sastav premaza čine: otapalo, vezivo (polimeri / smole), pigmenti, aditivi i punila. Upravo svojstva veziva, odnosno polimera određuju primjenu i kvalitetu premaza. Premazi najčešće dolaze u obliku otopina ili disperzija, ali mogu doći i u obliku prašaka ili paste. Suhi premazi dobivaju se nanošenjem na podlogu kada tvari koje čine vezivo poprimaju konačni oblik čime se stvara film odnosno prevlaka, a taj proces se naziva sušenje. Postoje dvije vrste sušenja: fizikalno i kemijsko. Fizikalno sušenje se odvija hlađenjem otapala i hlađenjem nanese taljevine. Takvi premazi su najčešće jednokomponentni. Kod kemijskog sušenja dolazi do kondenzacijske polimerizacije, pri čemu nastaje polimer, tj. vezivo, i na taj način premaz se suši. Polimeri koji se koriste za pripremu premaza nazivaju se smole, odnosno to su duromeri i oni su dvokomponentni.<sup>1</sup> Funkcionalni premazi su brojni i svaki ima posebna svojstva ovisno o primjeni, no svi imaju zaštitnu ulogu. Upotrebljavaju se kao antikorozivni premazi, optički premazi, antibakterijski premazi, za dostavu lijekova, separaciju kemikalija, kao samopodmazivajući premazi i dr. Jedno od najvažnijih svojstava koje funkcionalni premazi moraju posjedovati je svojstvo adhezije odnosno prianjanja na materijal. Važno svojstvo kod premaza je i svojstvo bioadhezije odnosno prianjanje biološkog tkiva na premaz. Premazi sa dobrom bioadhezijom dozvoljavaju adheziju većeg broja stanica ili tkiva što je dobro za razmnožavanje i diferencijaciju stanica.<sup>7</sup>

## **2.2. BIOPOLIMERI**

Biopolimeri su svi biorazgradljivi polimeri što uključuje polimere koji nastaju u prirodi ili iz prirodnih izvora te petrokemijske, koji su nastali iz nafte. Da bi novi proizvodi od biopolimera mogli doći u uporabu, mora se razmotriti cjeloživotni ciklus (LCA, eng. Life cycle analysis) materijala i proizvoda od biopolimera. To uključuje promatranje utjecaja poljoprivrede na okoliš (npr. kod uzgoja kukuruza za dobivanje biopolimera), korištenja voda, eutrofikacije odnosno onečišćenja mora, gubitka staništa životinjskih vrsta i krčenja šuma. Također, mora se razmotriti i socijalni učinak, primjerice cijene i opskrba hranom u slučaju kad se hrana koristi za proizvodnju biopolimernih materijala.

Biopolimeri kao i svi materijali imaju svoje prednosti i nedostatke kod upotrebe. Neke od prednosti biopolimera kao materijala su: sirovine koje se upotrebljavaju za njihovu proizvodnju su iz obnovljivih izvora, biorazgradljivost uslijed koje dobivamo otpadnu biomasu koja može poslužiti kao sirovina, nema emisije ugljikovog dioksida i uza sve to imaju svojstva slična sintetskim polimerima. Nedostatci biopolimera uključuju cijenu proizvodnje, emisiju metana tijekom procesa biorazgradnje i činjenicu da se biorazgradnja mora odvijati pri kontroliranim uvjetima jer se inače ne razgrađuju. Također, usprkos sličnosti ipak imaju lošija svojstva od sintetskih polimera te njihov utjecaj na zdravlje ljudi nije poznat u potpunosti npr. mogu zaostati mikroorganizmi poput gljivica i bakterija ili može doći do razgradnje biopolimera prilikom upotrebe u određenim uvjetima.<sup>1</sup>

### **2.2.1. Izvori biopolimera**

Biopolimeri se dijele na biopolimere prirodnog porijekla i sintetizirane polimere petrokemijskog porijekla. Biopolimeri prirodnog porijekla dalje se dalje dijele na polimere biosnove koji nastaju biosintezom u prirodi i polimere bioizvora čiji monomeri nastaju iz obnovljivih izvora kao što su kukuruz ili šećerna trska. Sintetizirani polimeri nastaju sintezom monomera dobivenog iz nafte koja je neobnovljiv izvor sirovina.

Polimeri biosnove mogu se dalje podijeliti na polisaharide i proteine. Polisaharidi su polimeri čije su najčešće monomerne jedinice šećeri i amini, a nastaju biosintezom u biljkama koje se uzgajaju na plantažama iz kojih se izdvaja sirovina, prirodni polimer. Druga vrsta



polimera biosnove nastaje u živim organizmima, a takvi su proteini, peptidi, DNA i RNA. Njihove monomerne jedinice su amino- i nukleinske kiseline.

Za razliku od sintetskih polimera ova vrsta prirodnih polimera ima u potpunosti definiranu strukturu i veličinu molekule, točno definiranog kemijskog sastava i strukture. Neki od najpoznatijih polimera biosnove su: polisaharidi, polipeptidi i poliproteini, prirodna guma te prirodne smole. Polisaharidi su složeni ugljikohidrati izgrađeni od većeg broja jedinica monosaharida, a u živim organizmima služe kao gradivni materijal ili rezervna energija. Najpoznatiji polisaharidi koji nastaju u biljkama su škrob, celuloza i hitin, a od onih koji nastaju u živim organizmima izdvajaju se DNA i RNA. DNA i RNA su nukleinske kiseline, tj. polimeri nukleotida u kojem se kodira redosljed aminokiselina u proteinima rabeći genetski kod. Polipeptidi su polimeri nižih molekulskih masa koji se sastoje od monomernih jedinica, a to su aminokiseline povezane peptidnim vezama. Proteini su makromolekule koji se nalaze u svim živim organizmima, a sastoje se od jednog ili više polipeptida koji formiraju određenu strukturu koja im određuje biološku funkciju. Biološke funkcije proteina su: gradivna (mišići), mehanička, enzimska, imunološka ili mogu služiti kao receptori. Najpoznatiji proteini koji se koriste kao materijali su svila, koža (kolagen), vuna (keratin) i kazein (iz mlijeka).

Polimeri bioizvora su zapravo sintetizirani polimeri čije monomerne jedinice nastaju biosintezom iz obnovljivih izvora sirovina. Sirovine koje se najčešće koriste za njihovu sintezu su šećeri, škrob i biomasa. Najpoznatiji i danas najznačajniji polimeri biosnove su polilaktidna kiselina (PLA), polihidroksi alkanoat (PHA) i polihidroksi butirat (PHB). Polilaktidna kiselina je biorazgradljiv, termoplastični, linearni poliester koji nastaje kondenzacijskom polimerizacijom mliječne kiseline, a sirovina za dobivanje mliječne kiseline je glukoza iz škroba. Svojstva PLA su slična polietilenu (PE), polipropilenu (PP), polistirenu (PS) i polietilentereftalatu (PET). Upotrebljava se najčešće za izradu vrećica, filmova i boca. U aerobnim uvjetima se potpuno razgrađuje do H<sub>2</sub>O i CO<sub>2</sub> unutar 3 do 4 tjedna. Polihidroksi alkanoat su linearni poliesteri koji nastaju mikrobiološkom fermentacijom glukoze iz kukuruznog škroba ili fermentacijom lipida pomoću određene bakterije. Postoji više od 150 različitih monomera, koji se mogu kombinirati unutar ove obitelji čime nastaju materijali s iznimno različitim svojstvima, ali svi spadaju u biorazgradljivu plastiku. Oni mogu biti termoplasti ili elastomeri, a najvažnije svojstvo koje posjeduju je dobra biokompatibilnost koja im omogućava široko područje primjene. Zbog svojstava biokompatibilnosti i biodegradabilnosti često se primjenjuju u području

biomedicine što uključuje: inženjerstvo tkiva, flastere za bioimplantate, nosače lijekova te za operacije i previjanje rana. Poli-3-(hidroksi butirat) (PHB) spada u obitelj polihidroksi alkanoata, a ima svojstva slična polipropilenu. Nije topljiv u vodi, otporan je na hidrolitičku degradaciju, ima dobru UV otpornost, ali je slabo otporan na kiseline i baze. Potpuno je biorazgradiv i to bez ostatka.<sup>1</sup>

### **2.2.2. Biorazgradljivost**

Biorazgradljivost (biodegradacija) je proces tijekom kojeg se organske tvari razlažu uz pomoć mikroorganizama (bakterije, gljivice) i njihova enzimskog djelovanja pri čemu im se bitno mijenja kemijska struktura. Produkti razgradnje su ugljični dioksid, voda, biomasa i dijelom metan. Postoje dvije vrste biorazgradnje, a to su aerobna i anaerobna razgradnja. Aerobna razgradnja se odvija u prisutnosti kisika, a konačni produkt razgradnje je kompost koji se sastoji od minerala i kompleksnih organskih tvari. Anaerobna razgradnja se odvija bez prisutnosti kisika, a nusprodukt razgradnje je metan koji se može koristiti kao energent. Biodegradacija je značajna sa stajališta zaštite okoliša te zbrinjavanja / recikliranja polimernih materijala putem kompostiranja. U biorazgradljive polimere ubrajaju se svi oni koji se razlažu pod utjecajem mikroorganizama u relativno kratkom vremenu. Pošto se biorazgradljivi polimeri razlažu na ugljikov dioksid i vodu koju biljke dalje koriste za svoj rast, smanjuje se emisija CO<sub>2</sub> u atmosferu. Na taj način se omogućuje stvaranje industrije koja omogućuje održivi razvoj društva. Zahtjevi u standardima za mjerenje biorazgradljivosti različiti su od države do države, ali obično se traži razgradnja u iznosu od 60 do 90% polimera u vremenu od 60 do 180 dana kompostiranja. Biorazgradljivost se određuje prema normama EN 13432 i ASTM D6400. Norma EN 13432 (Zahtjevi za oporabivost ambalaže kompostiranjem i biorazgradnjom) određuje zahtjeve i postupke kompostiranja polimerne ambalaže vezano uz 4 karakteristike: biorazgradnju, razgradnju tijekom biološkog tretmana, posljedice razgradnje te utjecaj na kvalitetu nastalog komposta. Norma ASTM D6400 (Specifikacije za označivanje aerobno kompostabilne plastike u komunalnim ili industrijskim postrojenjima) označava četverodijelni test biorazgradnje za procjenu biorazgradljivosti koji uključuje analizu sastava, klijanje biljaka (fitotoksičnost) i mrežnu filtraciju nastalih čestica.<sup>1</sup>

### 2.2.3. Antimikrobno djelovanje

Antimikrobno djelovanje je sposobnost polimernog materijala da onemogućuje rast i razmnožavanje mikroorganizama na vlastitoj površini. To je svojstvo materijala da inhibira (usporava) ili u potpunosti zaustavi širenje mikroorganizama. Mnogo različitih čimbenika utječe na antimikrobno djelovanje polimera i polimernih materijala, a dijele se na unutarnje i vanjske. Neki od tih čimbenika su: vrsta polimera, stupanj polimerizacije, kemijski sastav supstrata, hranjiva podloga, uvjeti okoliša poput vlage i sl.

Za kitozan je poznato da ima odlična antimikrobna svojstva, ali mehanizam inhibicije još nije poznat u potpunosti. Pretpostavlja se da se mehanizam inhibicije bazira na promjeni propusnosti stanica zbog interakcija između pozitivno nabijenog kitozana (pri pH nižem od 6,5) i negativno nabijene membrane mikroorganizama. Hipoteza je da je osnova mehanizma inhibicije rasta bakterija kombinacija pozitivno nabijenog polimera s anionskim komponentama na površini bakterija. Kitozan (osobito čestice niske molekulske mase) bi mogao prodrijeti u staničnu stjenku bakterije, kombinirati se s DNA i inhibirati sintezu mRNA i transkripciju DNA dok bi kitozan visokih molekulskih masa mogao stupiti u interakciju sa staničnom površinom i posljedično promijeniti permeabilnost stanica, blokirajući tako transport otopljenih hranjivih tvari u stanicu.<sup>8</sup>

Kitozanski filmovi pokazali su se obećavajućim za primjenu u konzerviranju hrane. Uz to što je kitozan netoksičan, biorazgradiv, biofunkcionalan, biokompatibilan te posjeduje antimikrobna svojstva, kitozan ima prednost što može ugraditi funkcionalne tvari poput minerala ili vitamina u svoju strukturu. S obzirom na ove kvalitete, kitozanski filmovi korišteni su kao materijal za pakiranje i kvalitetno očuvanje raznih vrsta hrane. Nedavno je pripremljen film od kitozan - škroba pomoću mikrovalne obrade za kojeg bi se mogla naći potencijalna primjena u pakiranju hrane.<sup>6</sup>

#### 2.2.4. Nastajanje biofilma

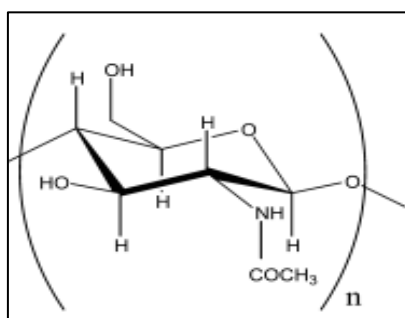
U prirodi mikroorganizmi preživljavaju prvenstveno vezanjem za i rastom na živim i neživim površinama. Ove površine mogu imati mnogo oblika, uključujući one u tlu i u vodenim sustavima, one u spektru medicinskih implantata i živih tkiva kao što su zubna caklina, srčani zalisci, pluća ili srednje uho. Zajednička značajka u ovom stanju rasta je da stanice razvijaju biofilm. Nastanak biofilma je proces kojim se mikroorganizmi nepovratno pričvršćuju i rastu na površini te proizvode izvanstanične polimere koji olakšavaju vezanje i nastanak matriksa, što rezultira promjenom fenotipa organizama. Biofilmovi su opsežno proučavani u posljednjih 20 godina pa se mnogo zna o procesu mikrobnog vezivanja i početnog stvaranja biofilma. Da bismo razumjeli prvu fazu stvaranja biofilma - vezanje za površinu, potrebno je detaljno ispitati svojstva podloge i površine stanice.

Karakteristike podloge mogu imati značajni utjecaj na brzinu i opseg vezivanja mikroorganizama. Općenito (iako postoje iznimke), grublji i više hidrofobni materijali brže će razvijati biofilmove. Kod nekih materijala poput kitozana mora se uzeti u obzir i njihovo antimikrobno djelovanje. Situacija postaje kompliciranija kad podloga smještena u fluidno okruženje dobiva kondicionirajući film ili premaz koji se prvenstveno sastoji od proteinskog materijala koji je prisutan u tekućini u tom okolišu. Ovaj kondicionirajući film će površini podloge dati kemijska svojstva koja mogu u potpunosti maskirati svojstva same temeljne podloge. Osim karakteristika podloge, bitne su i karakteristike stanične površine. Na primjer, prisutnost flagela, pili, fimbriae ili glikokaliksa može utjecati na brzinu vezivanja mikroba. To je zato što stanica mikroba, kad je izvučena na površinu, mora nadvladati odbojne sile zajedničke svim vrstama materijala, a ti dodaci omogućuju stanicama da ostanu vezane dok se ne uspostave trajniji mehanizmi vezivanja. Nakon procesa vezivanja za površinu slijedi rast mikroorganizama.

Biofilmovi imaju veliki značaj za zdravlje ljudi jer mikroorganizmi povezani sa stvaranjem biofilma pokazuju dramatično smanjenu osjetljivost na antimikrobna sredstva. Ova osjetljivost može biti intrinzična (kao prirodni rezultat rasta biofilma) ili stečena. Mnoge infekcije krvotoka i mokraćnog sustava povezane su sa medicinskim proizvodima i implantatima pa su u većini slučajeva povezani s biofilmom. Bolje razumijevanje procesa stvaranja biofilma može utjecati na način na koji su uzorci krvi i uzorci s vrha katetera prikupljeni i ispitivani.<sup>9</sup>

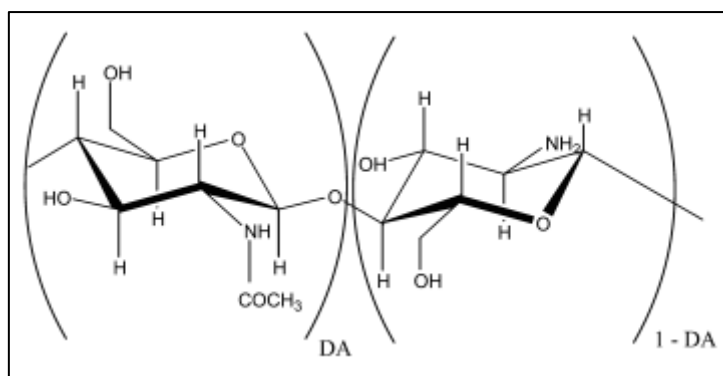
### 2.3. KITOZAN

Kitozan se dobiva modifikacijom hitina ili poli( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetil-D-glukozaamina) koji je prirodni polisaharid, a spada u grupu biopolimera iz bioosnove. U njegovoj strukturi postoje 2 molekule N-acetilglukozaamina povezane glikozidnim vezama pri čemu nastaju  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) veze (Slika 2.1.). Ovaj biopolimer nalazi se u velikom broju živih organizama i pripada najzastupljenijim prirodnim polimerima, nakon celuloze. Najčešće se javlja kao dio strukturnih komponenti u egzoskeletu člankonožaca ili u staničnim stjenkama gljiva i kvasaca, a unutar kojih postoji u obliku uređenih kristalnih mikrovlakana. U moderno vrijeme glavni komercijalni izvori hitina su ljuske rakova i škampa.<sup>10</sup> Hitin se javlja u tri polimorfna oblika,  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -hitini, koji se razlikuju u rasporedu molekularnih lanaca unutar kristalne stanice.  $\alpha$ -Hitin koji u strukturi ima antiparalelne lance je najrasprostranjeniji hitin u prirodi i nalazi se u škampima i rakovima,  $\beta$ -hitin ima paralelne lance i javlja se u gladiusu lignja, dok  $\gamma$ -hitin predstavlja smjesu  $\alpha$ - i  $\beta$ -hitina. Hitin je zbog svojih jakih unutar- i međumolekularnih vodikovih veza netopiv u vodi, vodenim otapalima i uobičajenim organskim otapalima. Topljivost hitina vrlo je teško kontrolirati jer je povezana s mnogim različitim parametrima i zbog toga predstavlja velik problem preradi i primjeni hitina i proizvoda od hitina.<sup>11</sup>



**Slika 2.1.** Kemijska struktura hitina

U svrhu boljeg iskorištenja i mogućnosti prerade i primjene, hitin se prevodi u kitozan. Kitozan je statistički kopolimer s određenim molarnim udjelom DA (stupanj acetilacije, eng. degree of acetylation)  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetil-D-glukozaamina i molarnim udjelom (1-DA)  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glukozaamina (Slika 2.2.). Stupanj acetilacije kitozana karakterizira molarni udio N-acetiliranih jedinica (DA) koji se može izraziti i kao postotak acetilacije (DA%).<sup>8</sup>



**Slika 2.2.** Kemijska struktura kitozana

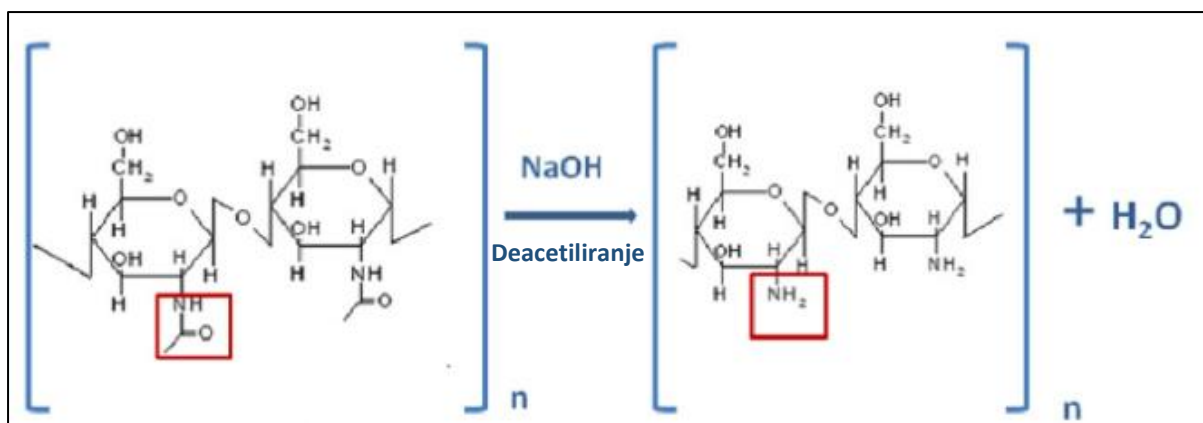
Dobivanje kitozana sastoji se od dva postupka: izolacija odnosno ekstrakcija hitina te deacetiliranje hitina. Ekstrakcija hitina može se provesti kemijski ili biološki. Ovisno o odabiru izvora hitina, odnosno koriste li se ljuske jastoga, škampa ili rakova i sl., pojavljuju se značajne razlike u određenim koracima, ali se uvijek ekstrakcija provodi u dva stupnja, a to su demineralizacija (DM) i deproteinacija (DP). Prije ova dva stupnja prethodi pranje, sušenje i usitnjavanje ljuski člankonožaca. U jednoj kemijskoj metodi koja koristi ljuske jastoga, proteini se uklanjaju djelovanjem 1M otopine NaOH tijekom 3 sata, na povišenoj temperaturi (80-90 °C) uz neprekidno miješanje i omjer krute tvari i otapala 1:10 (w v<sup>-1</sup>). Demineralizacija se postiže stalnim miješanjem osušenih, mljevenih, deproteiniranih ljuski u 1M otopini HCl 2 h, na sobnoj temperaturi i uz omjer krute tvari i otapala 1:15 (w v<sup>-1</sup>). Postoje dva različita načina ekstrakcije hitina: prvi stupanj je deproteinacija, a zatim demineralizacija (DP-DM) te obrnutim redoslijedom, dakle demineralizacija pa deproteinacija (DM-DP). U oba slučaja, rezultat je deproteinirani, demineralizirani hitin. Može se primijetiti da je sadržaj proteina u ostatku kada se primjenjuje DM-DP metoda bio niži od metode DP-DM, što ukazuje na potpuniju deproteinaciju ljuski. Razine demineralizacije nisu se uvelike razlikovale između metoda.<sup>12</sup>

U drugoj kemijskoj metodi koja koristi ljuske rakova za dobivanje hitina, za proces demineralizacije koristio se 0.55M HCl na sobnoj temperaturi, a broj i trajanje kupki ovisan je o vrsti rakova. Potom se provodi acidimetrijska titracija prema neutralnosti tijekom koje je primijećena veća emisija CO<sub>2</sub>, koja ovisi o sastavu ljuske rakova, a povišena je kad je količina minerala u ljusci veća. Deproteinacija se provodila uz djelovanje 0.3M otopine NaOH na temperaturi od 80-85 °C. Postupak je ponovljen nekoliko puta tijekom jednog sata. Odsutnost proteina potvrđivala se odsutnošću boje otopine na kraju zadnjeg tretmana.<sup>13</sup>

Najveći problem kod ekstrakcije hitina različitim kemijskim metodama je kvaliteta konačnog proizvoda, koja je funkcija molekularne mase (prosjeaka i polidisperznosti) te stupnja acetilacije. Tretmani jakim kiselinama mogu uzrokovati hidrolizu polimera (cijepanje molekule) čija su posljedica nedosljedna fizička svojstva hitina, a produkti hidrolize djeluju kao onečišćenje. Visoke koncentracije NaOH i visoke temperature deproteinacije mogu uzrokovati nepoželjnu deacetilaciju i depolimerizaciju hitina.<sup>11</sup> Stoga se sve češće hitin ekstrahira različitim biološkim metodama i to u procesu fermentacije enzimskim djelovanjem mikroorganizama poput bakterija. U jednoj takvoj metodi, koja koristi škampe kao izvor dobivanja hitina, za fermentaciju su korištene bakterije mliječne kiseline *Lactococcus lactis* i bakterija koja proizvodi proteazu (proteolitski enzim) *Teredinobacter turnirae*.<sup>14</sup>

U drugoj biološkoj metodi kao izvor hitina koristili su se rakovi, a fermentacija je postignuta djelovanjem bakterija *Bacillus licheniformis* i *Bacillus subtilis*. Fermentacija se provodila u morskoj vodi u koju su dodane ljuske rakova te glukoza (izvor fermentacijskog šećera) i ekstrakt kvasca (izvor dušika) koji su služili povećanju stope demineralizacije povećanjem produkcije kiseline te rasta mikroba.<sup>15</sup> Treća metoda biološke ekstrakcije hitina odvijala se na sličan način uz bakterije *Bacillus megaterium*, *Serratia marcescens* i *Lactobacillus plantarum* u mediju koji se sastojao od vode, inokulanata bakterija, ljuski jastoga te glukoze.<sup>12</sup> Svim ovim metodama zajednička su dva stupnja: demineralizacija koristeći bakterije koje proizvode kiselinu te deproteinacija koristeći bakterije koje proizvode proteazu.

Nakon što se dobije hitin slijedi proces deacetiliranja u svrhu dobivanja kitozana. Pojam kitozan obično se odnosi na obitelj polimera dobivenih nakon deacetilacije hitina do različitog stupnja. Stupanj acetilacije, koji odražava ravnotežu između dvije vrste polimera, omogućava nam razlikovanje hitina od kitozana. Kada je stupanj acetilacije DA (izražen kao molarni postotak) niži od 50 mol%, proizvod se naziva kitozan i postaje topljiv u kiselim vodenim otopinama. Tijekom procesa deacetilacije uklanjaju se acetilne skupine, ali se i javlja reakcija depolimerizacije što se može primijetiti promjenom molekulske mase. Hitin se može prevoditi u kitozan enzimskom ili kemijskom deacetilacijom. Kemijske metode pripreme kitozana se uvelike koriste u komercijalne svrhe zbog njihovih niskih cijena i prikladnosti za masovnu proizvodnju.<sup>8</sup>



**Slika 2.3.** Reakcija deacetiliranja hitina natrijevim hidroksidom

Postoje dva standardna kemijska procesa deacetilacije hitina. U prvom procesu kao reagens za deacetilaciju koristila se smjesa krutog kalijevog hidroksida (50 w/w%), 96%-tni etanol (25 w/w%) i monoetilen glikol (25 w/w%) što je gotovo bezvodni reakcijski medij. Za pripremu ove smjese prvo su pomiješana dva otapala i zatim je dodan čvrsti kalijev hidroksid u malim porcijama uz miješanje. Otapanje je egzotermno, a temperatura smjese tijekom ovog koraka može porasti do 90 °C. Hitin je zatim postupno dodavan u reagens i temperatura se povećava do željene vrijednosti. Nakon određenog vremena postupak je zaustavljen, a filtriranjem se izdvaja kitozan. Druga metoda koristi suspenziju hitina u vodenoj otopini natrijevog hidroksida (50% w/v) koja se zagrijava do 80 °C (Slika 2.3.). Nakon određenog vremena kruti hitin izdvaja se filtriranjem.<sup>13</sup>

Kemijska deacetilacija također ima nedostatke poput potrošnje energije, viška koncentrirane otopine lužine, čime se onečišćuje okoliš te širok i heterogen raspon topljivih i netopljivih produkata. Kako bi se prevladali ovi nedostaci u pripremi kitozana, istraživana je alternativna enzimska metoda, koja koristi hitin deacetilaze i nudi mogućnost kontroliranog, nedestruktivnog procesa i dobivanje dobro definiranog kitozana. Hitin deacetilaza katalizira hidrolizu N-acetamido veza u hitinu da bi se dobio kitozan. Prisutnost ove enzimske aktivnosti zabilježena je u nekoliko vrsta gljiva i insekata. Najbolje proučeni enzimi su oni ekstrahirani iz gljiva *Mucor rouxii*, *Absidia coerulea*, *Aspergillus nidulans* i dva soja *Colletotrichum lindemuthianum*. Svi enzimi su glikoproteini i izlučuju se bilo u periplazmatsku regiju ili u medij za uzgoj. Nadalje, svi enzimi pokazuju izvanrednu toplinsku stabilnost pri njihovoj optimalnoj temperaturi (50 °C), te pokazuju vrlo jaku specifičnost za β-(1,4)- povezane N-acetil-D-glukozaamin polimere.<sup>8</sup>



Budući da kitozan i njegovi derivati posjeduju mnoga korisna svojstva poput biokompatibilnosti, biorazgradivosti, netoksičan je i posjeduje zanimljive biološke aktivnosti, posvećena mu je velika pozornost. Primjenjuje se u biomedicini, prehrambenoj industriji, biotehnologiji i farmaciji. Među njegovim atraktivnim biološkim svojstvima izdvajaju se antimikrobno, antioksidativno i antitumorsko djelovanje. Ova su svojstva posebno značajna u području konzerviranja i pakiranja hrane kako bi se izbjegla uporaba kemijskih konzervansa te za proizvodnju jestivih antimikrobnih filmova, ali i u medicini. Kitozan, kao polimerni materijal s odličnim antimikrobnim i antioksidativnim svojstvima, ne migrira lako iz zaštitnog filma i ima dobra barijerna svojstva. Kad se kitozanski filmovi primjenjuju za pakiranje, pokazuju otpornost na difuziju masti i selektivnu propusnost za određene plinove. No, problemi se pojavljuju zbog njihove niske otpornosti na vodu i prijenos vodene pare. Iz tog razloga potencijalni pristupi pripremi bioaktivnih premaza na bazi kitozana su miješanje polimera ili uporaba biokompozita te višeslojnih sustava.

U istraživanjima je primijećeno da kitozan ima nekoliko prednosti u odnosu na druge dezinficijense jer posjeduje veće antimikrobno djelovanje, ima širi spektar djelovanja, veću stopu ubijanja i nižu toksičnost prema stanicama sisavaca. Stvarni mehanizam inhibicije još nije u potpunosti shvaćen. Pretpostavlja se da se mehanizam inhibicije bazira na promjeni propusnosti stanica zbog interakcija između pozitivno nabijenog polisaharida (kitozan pri pH nižem od 6,5) i negativno nabijene membrane. Dakle, osnova mehanizma inhibicije rasta bakterija bi trebala biti kombinacija pozitivno nabijenog polimera s anionskim komponentama poput N-acetilmuraminske kiseline, sialne kiseline i neuraminske kiseline na površini stanica.

Pokazalo se da sintetički antioksidansi stvaraju potencijalne opasnosti po zdravlje i njihova je upotreba ograničena u nekim zemljama. Stoga, raste interes za upotrebu prirodnih antioksidansa te je mnogo pažnje posvećeno proučavanju antioksidativnog djelovanja kitozana i njegovih derivata. Kitozan i njegovi derivati djeluju kao antioksidansi uklanjanjem radikala kisika kao što su hidroksil, superoksid i alkil. Znanstvenici su zaključili da se kitozan i njihovi derivati ponašaju kao donori vodika u svrhu sprječavanja oksidacije. Kitozan i njegovi derivati također posjeduju antitumorsko djelovanje koje je ispitano *in vitro* (eksperimenti u epruvetama) i *in vivo* (eksperimenti u živim organizmima) metodama. Neka *in vivo* istraživanja su pokazala da kitozan inhibira rast tumorskih stanica poboljšavanjem imunološkog učinka.<sup>16</sup> Druge studije su pokazale da kitozan također ima izravan učinak na tumorske stanice tako da inhibira proliferaciju tumorskih stanica induciranjem apoptoze

(programirana stanična smrt u višestaničnim organizmima).<sup>17</sup> Daljnje studije su otkrile da nanočestice kitozana također mogu izazvati nekrotičnu smrt (smrt stanica i tkiva).<sup>18</sup> Antitumorska aktivnost kitozana ovisi o strukturnim karakteristikama kitozana, kao što su stupanj acetilacije i molekulska masa te o tumorskim vrstama.

U određenim slučajevima u primjeni hitina i kitozana provodi se modifikacija da se poboljšaju postojeća ili dobiju nova svojstva s ciljem razvoja svojstava za specifičnu primjenu. Bez obzira na već nabrojena izuzetno dobra svojstva kitozana i njegovih derivata njihova primjena može biti ograničena njihovom topljivošću u mnogim polarnim otapalima i vodi. Prevladavanje ovog problema moguće je mijenjanjem kitozana kemijskim ili enzimskim metodama pri čemu se stvaraju depolimerizirani i/ili novi derivati. Zbog prisutnosti reaktivnih amino (-NH<sub>2</sub>) i hidroksilnih (-OH) skupina, kitozan se vrlo lako modificira. Jedna od takvih metoda uzima u obzir modificiranje pozitivnog (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) naboja kitozana za povećanje topivosti u velikom rasponu pH vrijednosti, ali i u neutralnom ili blago alkalnom mediju. Kvarternizacija je primjer postupka za povećanje topljivosti kitozana u vodi. Ugljikov sulfid (CS) je pozitivno nabijen pri pH nižim od 6.5, dok je kvaternizirani kitozan i dalje trajno pozitivno nabijen pri pH iznad 6.5.<sup>19</sup> Smanjivanje čestica kitozana do nanometarskih veličina pokazalo je poboljšanje svojstava koja mu omogućavaju bolju primjenu u obliku antimikrobnih sredstava, nosača lijekova, za dostavu gena ili cjepiva te kao antitumorski agensi.<sup>20</sup> Jedna od najčešćih metoda modifikacije kitozana je pomoću nanočestica titanijevog dioksida (TiO<sub>2</sub>). Titanijev dioksid, koji se često koristi kao punilo i/ili pigment, se koristi kao učinkoviti tipični apsorber koji selektivno apsorbira UV svjetlo i reemitira ga na manje štetnim valnim duljinama uglavnom u obliku topline što je značajno za primjenu kitozana za pakiranje hrane.<sup>21</sup> TiO<sub>2</sub> se može koristiti i kao punilo u samočistećim premazima za brodove koji ujedno ne dopuštaju prljanje broda.<sup>22</sup> Hitin nanometarskih dimenzija naširoko je proučavan kao svojevršno punilo polimera, koje ima golem potencijal zamjene anorganskih nanočestica koje se koriste kao aditivi, koji se ne mogu reciklirati. Koristi se u obliku čvrstih, samostojećih nanovlakana u površinski nabijenim hidrogelovima.<sup>23</sup> Hidrogelovi su umreženi polimeri, koji jako nabubre u dodiru s vodom zadržavajući svoju umreženu strukturu.<sup>24</sup>

Zbog svojih prethodno spomenutih svojstava hitin i kitozan se već naširoko koriste u biomedicini i farmaceutskoj industriji kao promotori apsorpcije i sredstva za hidrataciju, kao i za proizvodnju filma i zacjeljivanje rana. Kitozan / hitin se može preraditi, ovisno o namjeni, u različite konformacije, npr. kao vlakna, prašci, filmovi, spužve, kuglice, otopine, gelovi i

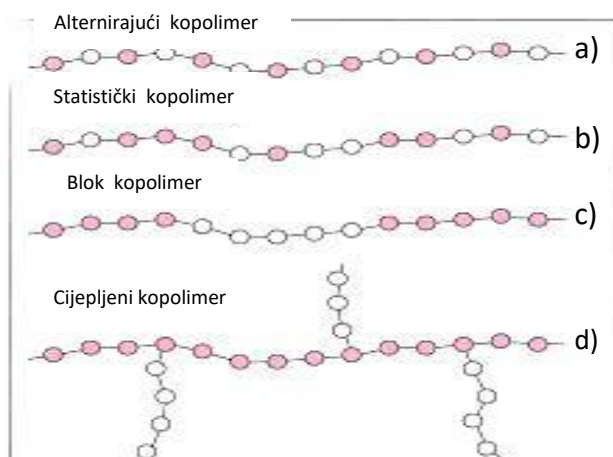
kapsule. Posljedično, kitozan se može koristiti oralno, nazalno i očno, za isporuku lijekova u implantabilnom i injekcijskom obliku. Kitozan / hitin u stanju vlakana ili filma uglavnom se primjenjuju za tkivno inženjerstvo i kao zavoj za rane. Primjene hitina su manje razvijene u usporedbi s kitozonom zbog velike netopivosti i poteškoća u obradi. Stoga se hitin vrlo često kombinira s kitozonom što mu omogućava primjenu u sličnim područjima. Hitin ubrzava zacjeljivanje rana u obliku spreja, gela i gaze. Koristi se kao podrška lijekovima ili za kontrolu oslobađanja lijekova uzimajući u obzir biorazgradivost, nisku toksičnost, fiziološku inertnost, antibakterijska svojstva, hidrofilni karakter, svojstva stvaranja gela, afinitet za proteine i mukoadhezivnost (adhezija na sluzave dijelove). Velika pozornost posvećena je kompozitnom materijalu izrađenom od hidroksiapatit - hitin - kitozana koji se može koristiti kao materijal za punjenje kostiju u svrhu vođenja regeneracije tkiva.<sup>8</sup>

Osim široke primjene u biomedicini i farmaceutskoj industriji, hitin i kitozan se mogu upotrebljavati u raznim područjima poput prehrambene industrije ili u tretiranju otpadnih voda. U prehrambenoj industriji koriste se zbog svojih funkcionalnih svojstava te prehrambene i fiziološke aktivnosti. Kitozan pokazuje sposobnost vezanja vode, masti i bojila, kao i određena svojstva emulgiranja što se pokazalo korisnim u pripremi stabilnih emulzija bez ikakvog drugog surfaktanta. Kitozan se u prehrambenoj industriji najčešće koristi za konzerviranje i izradu ambalaže za hranu te kao antioksidans. U tretiranju otpadnih voda ističe se vrlo dobro svojstvo adhezivnosti koje omogućava primjenu kitozana u pročišćavanju otpadnih voda od metalnih iona poput bakra, kroma, kadmija, olova, nikla, žive, željeza, srebra, cinka, kobalta i arsena te za vezivanje i uklanjanje boja i teških metala.<sup>11</sup>

## 2.4. MODIFIKACIJA POLIMERA

Modifikacija polimera ili polimernog materijala je postupak promjene sastava i strukture polimera radi poboljšavanja njegovih svojstava i konačne kvalitete u primjeni. Cilj je izmjena i/ili poboljšanje svojstava u odnosu na izvorni polimer te razvoj specifičnih, funkcionalnih svojstava za specifične primjene. Modifikacijom polimera obično se namjerava poboljšati stara i dodati nova, tipično željena svojstva novog modificiranog materijala poput povećane toplinske stabilnosti, višefaznih fizičkih reakcija, biološke otpornosti, kompatibilnosti ili razgradivosti, odziva na udar, fleksibilnosti, krutosti, itd. U današnje vrijeme modifikacije polimera se mogu grubo grupirati u dvije kategorije: fizičke modifikacije koje uključuju zaplitanje i zarobljavanje te promjene izazvane zračenjem i kemijske modifikacije.

Pod kemijsku modifikaciju ubraja se sinteza kopolimera kojom se postiže promjena sastava polimera na molekularnoj razini što konačno utječe na njegova svojstva i kvalitetu. Kopolimeri su polimeri u kojima su različite vrste monomera kemijski povezane u molekulu. Redoslijed pojavljivanja ponavljanih jedinica u makromolekuli može biti različit pa se prema tome dijele na: statističke (eng. random) kopolimere u kojima se ponavljane jedinice u makromolekuli pojavljuju nasumično, alternirajuće kopolimere u kojima se ponavljane jedinice u makromolekuli pojavljuju u pravilnom redoslijedu, blok kopolimere gdje se u makromolekuli naizmjenice smjenjuju duži odsječci s jednom ili drugom vrstom ponavljanih jedinica te cijepljene (graft, kalemljene) kopolimere u kojima se na dugački glavni lanac jednog tipa ponavljanih jedinica kemijski vežu kraći lanci drugog tipa ponavljanih jedinica (Slika 2.4.).<sup>25</sup>



**Slika 2.4.** Strukture različitih vrsta kopolimera: a) alternirajući polimer; b) statistički polimer; c) blok kopolimer; d) cijepljeni kopolimer

### 2.4.1. Fizička modifikacija

Fizička modifikacija polimera odnosi se na miješanje dva ili više polimera čime dobivamo polimerne mješavine ili dodatkom određenog punila u polimer čime dobivamo polimerne kompozite. Ukoliko je punilo nanometarskih dimenzija nazivamo ih polimernim nanokompozitima. Određene materijale ili proizvode možemo modificirati i na način da se nanosi tanki površinski film polimera ili polimernog (nano)kompozita. Preduvjet dobrih svojstava polimernih kompozita je homogena i termodinamički stabilna disperzija punila u polimernoj matrici. Da bi se to moglo postići, potrebno je razdvajanje čestica punila, koje se drže zajedno jakim međučestičnim silama (iz nakupina koje sadržavaju desetke, stotine pa čak i milijune čestica), koje se osigurava uspostavljanjem dovoljno jakih kohezijskih sila na graničnoj površini polimer / punilo. No ovisno o nanopunilu mogu postojati određene dodatne zapreke koje treba prevladati (npr. razmršenje isprepletenih nakupina jednodimenzijskih punila kao što su snopovi ili svežnjevi ugljikovih nanocjevčica) da bi se mogao formirati nanokompozit. Kod polimernih nanokompozita nova svojstva potječu u pravilu iz promjene prirode polimera u blizini punila. Povoljna termodinamika miješanja je ključna za nanočestice budući da se one drže zajedno privlačnim silama i ne može se očekivati da će isključivo mehanički postupci miješanja biti dostatni za njihovo raspršivanje. Dobra disperzija nanočestica u matrici rezultira formiranjem nanokompozita pri niskim koncentracijama punila. Bez dobrog dispergiranja do izražaja ne dolaze karakteristična svojstva nanopunila poput njihove nanometarske geometrije i ultravelike površine već se formira klasični kompozit.<sup>3</sup>

## 2.5. TEHNIKE KARAKTERIZACIJE

Tehnike karakterizacije polimera i polimernih materijala dijele se na: spektroskopske, toplinske, mikroskopske, mehaničke, reološke i rendgensku difrakciju (XRD). Najčešće korištene spektroskopske metode su nuklearna magnetska rezonancija (NMR), infracrveno zračenje s Fourierovim transformacijama (FTIR) i UV/VIS spektroskopija, a koriste se za identificiranje kemijskog sastava i djelomično strukture (cis-, trans- položaji) polimera. Pod toplinske metode svrstavamo: diferencijalnu pretražnu kalorimetriju (DSC), termogravimetriju (TG, DTG) i dinamičko - mehaničku analizu (DMA). Ove metode nam omogućuju praćenje ponašanja polimernih materijala s promjenom temperature. Od mikroskopskih uređaja izdvajaju se transmisijski elektronski mikroskop (TEM), pretražni (eng. scanning) elektronski mikroskop (SEM), pretražni mikroskopi sa sondom (probe) (STM, AFM, ...) te optički mikroskop (OM). Oni nam služe za određivanje morfologije i topologije polimera višefaznih sustava. Najpoznatije mehaničke metode su test naprezanje - istezanje, test žilavosti i test tvrdoće čime se određuje čvrstoća, elastičnost i tvrdoća materijala. Reološke metode nam omogućuju određivanje viskoznosti polimernih otopina, suspenzija ili taljevina, a među njima se izdvajaju viskozimetrijske metode.<sup>2</sup> Metoda rendgenske difrakcije nam omogućuje kvalitativnu i kvantitativnu analizu kristalnih materijala, a njome je moguća identifikacija faza, određivanje parametara jedinične ćelije, postotka kristalnosti materijala itd.<sup>26</sup> Upotrebom svih ovih metoda određujemo svojstva polimera i polimernih materijala i time ih karakteriziramo (opisujemo) te na osnovu toga možemo predvidjeti njihovo ponašanje u određenim uvjetima primjene. Osim nekih osnovnih svojstava poput fizikalnih, kemijskih, mehaničkih i toplinskih određivati se mogu i specifična svojstva koja uvjetuju područje primjene materijala; barijerna svojstva, antimikrobna, gorivost i dr.

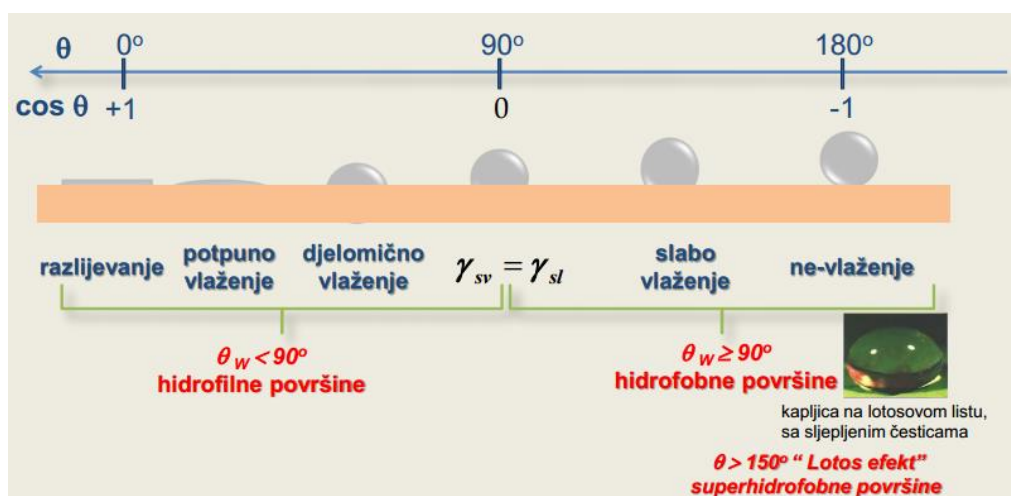
Tako, karakterizacija polimernih premaza podrazumijeva određivanje svojstva tekućeg premaza i primjenska svojstva premaznog filma. Pod svojstva tekućeg premaza svrstavamo: sadržaj lako hlapive tvari (eng. volatile organic compound, VOC), sadržaj vode, gustoću, viskoznost i stabilnost suspenzije tijekom skladištenja. Primjenska svojstva premaznog filma su: vrijeme sušenja, vrijeme umrežavanja i nastajanja filma, debljina nastalog filma. Zatim, adhezijska svojstva (svojstva prijanjanja uz površinu) koja se testiraju testom guljenja (eng. peeling test), testom struganja, testom adhezije određivanjem vlačne čvrstoće i karakterizacija površine određivanjem energije površine ( $\gamma$ ) ili kontraktnog kuta ( $\theta$ ). Potom, abrazijska

svojstva koja možemo analizirati testom otpornosti na habanje (trošenje), izgled filma (dekorativna uloga), kemijska otpornost, permeabilnost (penetracija, propusnost) te konačno otpornost na koroziju.<sup>1</sup>

### 2.5.1. Karakterizacija površine

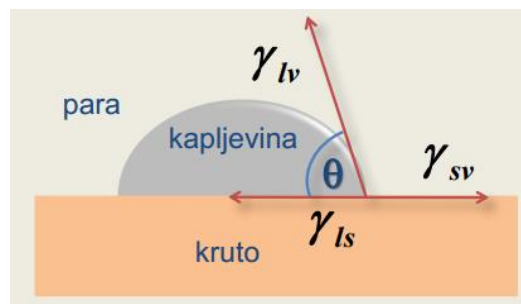
Karakterizacija površine polimera provodi se određivanjem kontaktnog kuta i energije površine. Kemija međupovršina razmatra fenomene i procese heterogenih sustava, u kojima ključnu ulogu imaju fenomeni površina, odnosno pojave na granici faza tj. područje u kojem sustav podliježe prijelazu iz jedne faze u drugu. Površina predstavlja područje između kondenzirane faze (krute, S ili tekuće, L) i plinovite faze dok međupovršina predstavlja područje između dviju kondenziranih faza, odnosno granicu dviju faza koje su međusobno u kontaktu (kruta i tekuća). Razumijevanje molekulske aktivnosti na međupovršini pomaže nam da razumijemo ponašanje različitih heterogenih sustava.

Vlaženje (eng. wetting) predstavlja kontakt između kapljevine i krutine i posljedica je djelovanja intermolekularnih sila (sila međudjelovanja). Ono određuje afinitet između dviju faza u kontaktu. Kontaktni kut teta ( $\theta$ ) je kvantitativna mjera vlaženja krutine kapljevnom, može poprimiti vrijednosti između  $0^\circ$  i  $180^\circ$  i prema toj vrijednosti površine dijelimo na: superhidrofilne (kontaktni kut vode s podlogom manji od  $10^\circ$ ), hidrofilne (kontaktni kut vode s površinom manji od  $90^\circ$ ), hidrofobne (kontaktni kut vode veći od  $90^\circ$ ) i superhidrofobne (kontaktni kut veći od  $150^\circ$ , „lotos efekt“). Vrste vlaženja i površina s obzirom na kontaktni kut vode s površinom prikazane su na slici 2.5.



Slika 2.5. Vrste vlaženja i površina s obzirom na kontaktni kut vode ( $\theta_w$ ) s površinom

Jedna od najvažnijih metoda određivanja slobodne međupovršinske energije je metoda mjerenja kontaktnog kuta kapi određenog otapala na krutoj površini. Određivanje kontaktnog kuta provodi se kad su kruta, kapljevit i parna faza u ravnoteži. U toj ravnoteži na međupovršinama faza postoje određene sile, a to su: energija površine na granici faza krutina / para ( $\gamma_{sv}$ ), energija površine na granici faza krutina / kapljevitina ( $\gamma_{ls}$ ) te energija površine na granici faza kapljevitina / para  $\gamma_{lv}$ . (Slika 2.6.) Energija površine ( $\gamma$ ) predstavlja direktnu mjeru međumolekularnih sila, tj. odnosa sila koje djeluju na molekule u unutrašnjosti kapljevitine te sila koje djeluju na molekule na površini kapljevitine. Jednaka je radu (W) potrebnom za jedinično povećanje površine (A), a izražena je u jedinicama  $\text{J m}^{-2}$  ili  $\text{N m}^{-1}$ . Metodom mjerenja kontaktnog kuta možemo odrediti karakteristike površine materijala poput relativne hidrofobnosti i hidrofilitnosti gdje se kao testna tekućina koristi voda.<sup>27</sup>

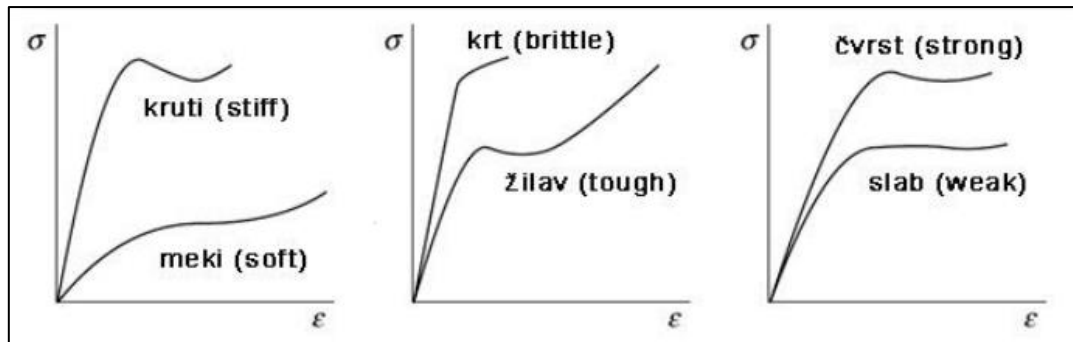


**Slika 2.6.** Sile na međupovršinama faza u metodi mjerenja kontaktnog kuta

### 2.5.2. Mehanička svojstva

Najčešća metoda ispitivanja mehaničkih svojstava polimera i polimernih materijala je test rastezanja poznatiji kao test naprezanje - istezanje. U tom testu ispitivanje se provodi na epruветama (ispitnim tijelima) poznatih dimenzija i na kidalici. Tijekom rastezanja uzorka, kidalica registrira silu (F) i istezanje ( $\Delta l$ ) te se kao rezultat dobiva dijagram ovisnosti naprezanja o istezanju kidanja ( $\sigma$ - $\epsilon$  dijagram). Iz tog dijagrama očitavaju se karakteristične veličine: maksimalna ili prekidna čvrstoća ( $\sigma_m$ ), gornja granica tečenja ( $\sigma_y$ ), istezanje (deformacije) u tim točkama ( $\epsilon_m$  i  $\epsilon_y$ ), a iz tih veličina možemo izračunati modul elastičnosti (Youngov modul, E). Površina ispod dijagrama označava žilavost materijala. Ovisno o mehaničkim svojstvima polimere možemo razvrstati na krute (tvrde, eng. stiff) ili meke (eng. soft), na žilave (eng. tough) ili krte (eng. brittle) te čvrste (eng. strong) ili slabe (eng. weak). Tipične krivulje ovakvih materijala prikazane su na slici 2.7.<sup>4</sup>



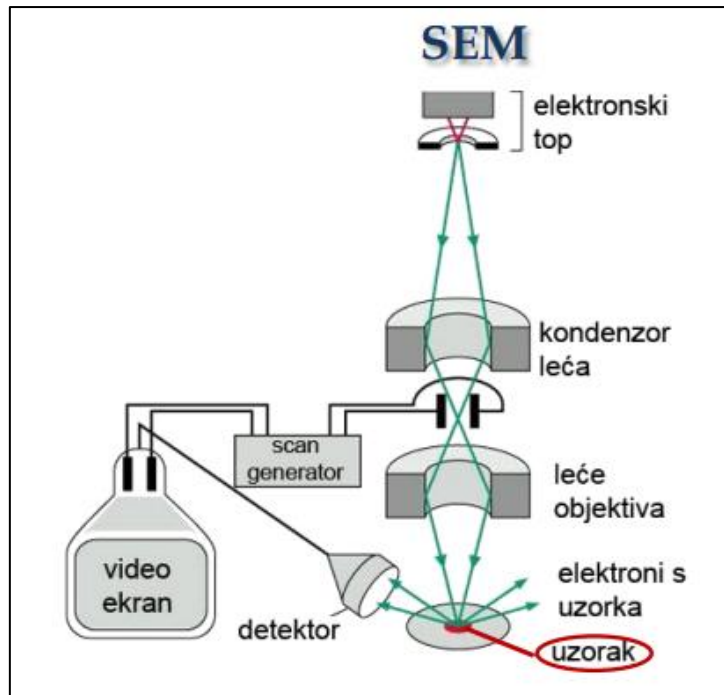


**Slika 2.7.** Tipične krivulje naprezanje ( $\sigma$ ) - istezanje ( $\epsilon$ ) različitih vrsta polimera

### 2.5.3. SEM mikroskopija

Mikroskopija je grana znanosti koja proučava finu strukturu i morfologiju objekta primjenom mikroskopa. Mikroskop je instrument kojim se postiže veliko povećanje slike bliskih predmeta i tako omogućuje promatranje materijala / tvari pri iznimno velikim povećanjima za opažanje vrlo sitnih objekata i detalja. Sastoji se od dviju leća od kojih svaka povećava sliku predmeta. Leća bliža oku naziva se okularom, a ona bliža uzorku objektivom. Objektiv stvara realnu povećanu sliku u žarišnoj ravnini okulara dok okular djeluje kao povećalo koje od realne slike stvara virtualnu povećanu sliku u beskonačnosti.

Pretražni (eng. scanning) elektronski mikroskop (SEM) je vrsta mikroskopa u kojem je slika površine predmeta rezultat detekcije izbijenih elektrona sa uzorka. Proces nastajanja slike kod SEM analize započinje usmjeravanjem elektrona čiji je izvor užarena wolframova nit iz elektronskog topa prema površini uzorka. Uzorak je suh i prekriven ultratankim metalnim premazom (mora provoditi električnu struju). Elektronske leće djeluju na snop elektrona kao što leća djeluje na zrake svjetlosti i usmjeravaju elektrone na preparat. Za osiguranje pravocrtnog širenja elektrona u unutrašnjosti mikroskopa održava se visoki vakuum. Nakon prolaska kroz preparat elektroni ulaze u elektromagnetsko polje objektiva, koji daje uvećanu sliku predmeta koju elektromagneti projektorske leće još više povećavaju. Slika površine predmeta se zatim projicira na fluorescentnom zaslonu. Shema nastajanja slike prikazana je na slici 2.8. SEM mikroskop može prikazati slike predmeta iz područja veličina od 4 nm do 4 mm, omogućava čak i kemijsku analizu ako se detektiraju rendgenske zrake koje nastaju uslijed interakcije elektrona sa uzorkom, no isto tako može doći do ozbiljnijih oštećenja uzorka zračenjem.<sup>27</sup>



**Slika 2.8.** Shema procesa nastajanja slike u pretražnom elektronskom mikroskopu (SEM)

### 3. METODIKA

#### 3.1. MATERIJALI I KEMIKALIJE

- a) Kitozan – visoke molekularne mase, 100.000-300.000 Da, Acros Organics
  - Stupanj deacetilacije:  $\geq 75\%$
- b) Octena kiselina,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 99,5 %, J.T. Baker
  - Molekularna masa:  $60,05 \text{ g mol}^{-1}$
  - Gustoća:  $1,04 \text{ g cm}^{-3}$
- c) Titanijev (IV) oksid,  $\text{TiO}_2$ , Aeroxide P25
  - Molekularna masa:  $79,87 \text{ g mol}^{-1}$
  - Gustoća:  $4,23 \text{ g cm}^{-3}$
  - Veličina čestica:  $< 100 \text{ nm}$
- d) Deionizirana voda, pripravljena na Milipor Millipack, Direct Q-3
  - Vodljivost:  $< 1 \mu\text{Scm}^{-1}$

#### 3.2. PRIPRAVA UZORAKA

Prvi korak u pripremi uzorka bila je priprema 1%-tne otopine octene kiseline. Otopina je pripravljena u odmjernoj tikvici od 250 ml gdje je dodano 2.51 mL 99.5 %-tne octene kiseline, a ostatak nadopunjen deioniziranom vodom. Zatim, u tikvici od 100 mL pripravljena je 2%-tna (m/V) otopina kitozana koja je nastavljena miješati još 24 sata na magnetskoj miješalici. Kitozanski filmovi pripravljeni su izlivanjem otopine u Petrijevu zdjelicu i ostavljeni da se suše u sušioniku na  $70^\circ\text{C}$  tijekom 20 h, a krajnja debljina filmova bila je 1 mm. Za pripremu nanokompozitnog kitozanskog filma korištene su čestice titanijevog dioksida ( $\text{TiO}_2$ ). U 100 ml otopine kitozana dodano je 100 mg  $\text{TiO}_2$ , koji je zatim dispergirao Ika, T18 disperzerom, pri brzini od 3500 rpm (eng. rotations per minute) tijekom 1 min. Dobivena smjesa izlivena je u Petrijevu zdjelicu i ostavljena da se suši u sušioniku 20 h na  $70^\circ\text{C}$ .

### 3.3. METODE KARAKTERIZACIJE

#### 3.3.1. Određivanje antimikrobnih svojstava

##### *Bakterijske kulture*

Za određivanje prijenosa antimikrobnih sastojaka korištene su bakterijske kulture *Escherichia coli* (3001), *Pseudomonas aeruginosa* (3011) i *Bacillus subtilis* (3020). Svi korišteni mikroorganizmi izolirani su iz okoliša i pohranjeni u zbirci Zavoda za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

##### *Priprema hranjive podloge*

Hranjiva podloga za uzgoj bakterija (hranjivi agar) priređena je u Erlenmeyer tikvici prema uputama proizvođača (Biolife Manual, second edition, Ingraf, Italija 1991.). 3,25 g bujona i 4,70 g agara otopljeno je u 250 cm<sup>3</sup> deionizirane vode. Podloga je homogenizirana, zagrijana do vrenja i sterilizirana 15 minuta u autoklavu pri 120 °C i 1,1 atm. U svrhu određivanja prijenosa antimikrobnih sastojaka korištena je hranjiva podloga Mueller Hinton Agar.

##### *Priprava suspenzija bakterija*

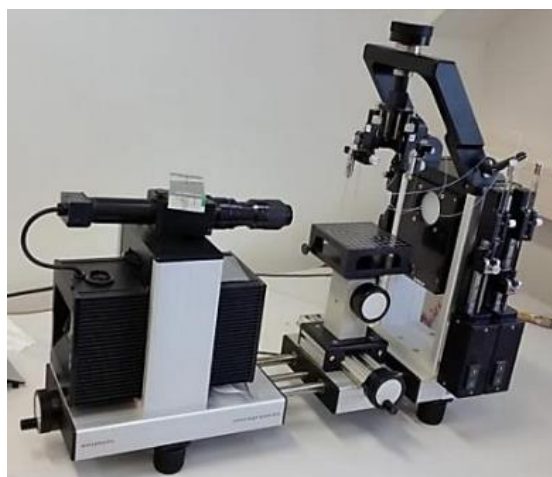
Dan prije postavljanja pokusa potrebno je bakterije *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Bacillus subtilis* uzgojiti na kosoj hranjivoj podlozi te ih staviti na inkubaciju na temperaturu od 37 °C 24 sata. Sterilnom mikrobiološkom ušicom potrebno je ostrugati malu količinu izrasle bakterijske kulture s podloge te ju prenijeti u 10 cm<sup>3</sup> sterilne fiziološke vode i dobro ju homogenizirati. Početan broj stanica bakterija *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Bacillus subtilis* iznosio je 10<sup>6</sup> st cm<sup>-3</sup>.

##### *Ispitivanje antibakterijskih svojstva*

Prijenos antimikrobnih sastojaka odredio se prema Normi EN ISO 22196:2011. Prije postavljanja pokusa bilo je potrebno osigurati sterilne uvjete rada. Na prethodno izlivenu hranjivu podlogu (Mueller Hinton Agar) u Petrijevoj zdjelici otpipetiralo 0,1 cm<sup>3</sup> priređene suspenzije ispitivane bakterije (10<sup>6</sup> st cm<sup>-3</sup>), homogeniziralo pomoću štapića po Drigalskom te se na sredinu Petrijeve zdjelice stavio uzorak materijala (u obliku diska). Petrijeve zdjelice stavile su se na inkubaciju na temperaturu od 37 °C, 24 sata. Nakon 24 sata izmjerene su zone inhibicije. Sva istraživanja provedena su u duplikatu.

### 3.3.2. Određivanje kontaktnog kuta

Uzorci kitozanskih filmova karakterizirani su mjerenjem kontaktnog kuta metodom viseće kapi (eng. sessile drop method) pomoću goniometra DataPhysics OCA 20 (Slika 3.1.). Otapalo koje je korišteno za mjerenje bila je deionizirana voda, volumen kaplji, koje su se nanosile na uzorak, iznosio je 2  $\mu\text{L}$ . Nakon nanošenja kapi na površinu uzorka, kap se ostavi stajati 10 sekundi da se uspostavi ravnoteža, potom se slika kap, koristeći računalni program. Zatim, provedeno je mjerenje kontaktnog kuta između površine uzorka filma (dodirne površine uzorka i kapljice) i kapi na granici faza. Kao rezultat mjerenja dana je srednja vrijednost 10 do 12 mjerenja.



**Slika 3.1.** Goniometar DataPhysics OCA 20

### 3.3.3. Određivanje mehaničkih svojstava

Mehanička svojstva; prekidna čvrstoća i prekidno istežanje filmova kitozana i nanokompozita kitozan /  $\text{TiO}_2$  određena su na mehaničkoj kidalici ZWICK Testing Machine 1445 (Slika 3.2). Mjerenja su provedena na uzorcima (epruvetama), duljina uzoraka bila je 70 mm, a širina 10 mm. Epruvete su postavljene u čeljusti kidalice koje su međusobno razmaknute 50 mm te su podvrgnute rastezanju brzinom od 1 mm/min. Sva mjerenja provedena su pri sobnoj temperaturi (23 °C) i relativnoj vlažnosti od 65 %.



**Slika 3.2.** Mehanička kidalica ZWICK Testing Machine 1445

### **3.3.4. SEM mikroskopija**

Morfologija pripremljenih uzoraka filma kitozana i nanokompozitnog filma kitozan /  $\text{TiO}_2$  karakterizirana je pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa, Tescan VEGA 3 SEM (Slika 3.3). Prije početka mjerenja, na površinu uzoraka nanesen je sloj zlato / paladij (Au / Pd) nparivanjem u plazmi, a mjerenje je provedeno pri naponu od 10 kV.

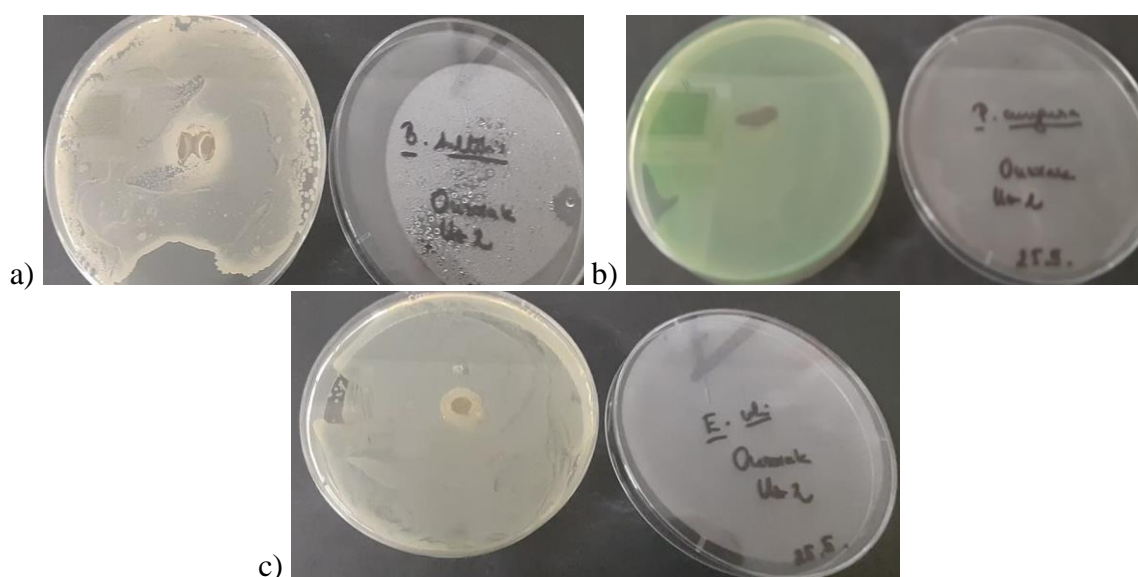


**Slika 3.3.** Skenirajući elektronski mikroskop Tescan VEGA 3 SEM

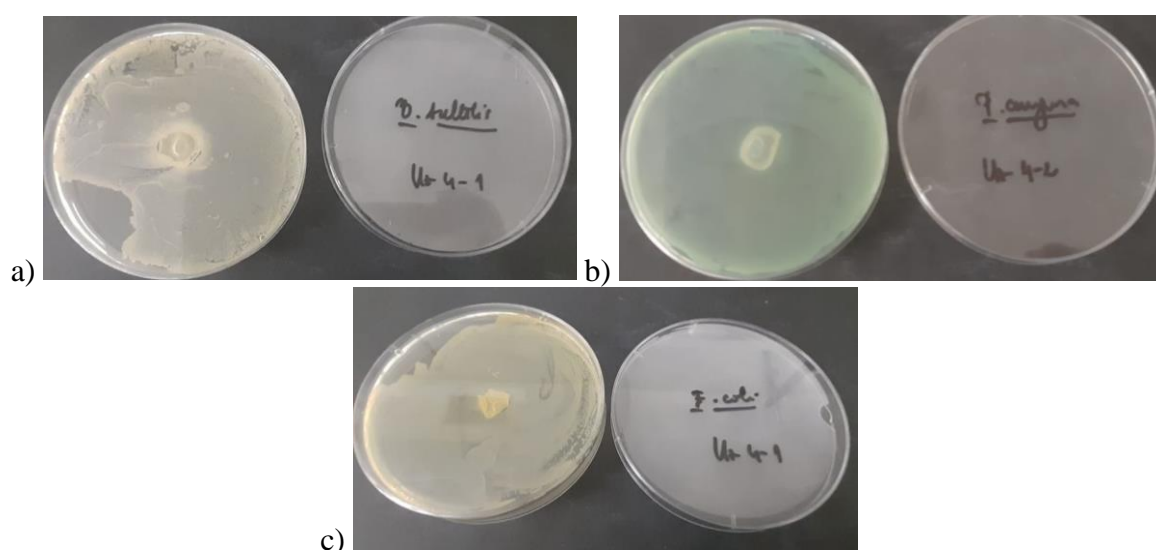
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. ANALIZA REZULTATA ANTIMIKROBNOG DJELOVANJA

Ispitivanje antimikrobnog djelovanja filmova kitozana (Cs) te kitozana s nanočesticama titanijevog dioksida (Cs-TiO<sub>2</sub>) provedeno je s tri vrste bakterija: *Escherichia coli* (G negativna bakterija), *Pseudomonas aeruginosa* (G negativna bakterija) i *Bacillus subtilis* (G pozitivna bakterija). Rezultati ispitivanja prikazani su na slikama 4.1. i 4.2. te u tablici 4.1.



**Slika 4.1.** Antimikrobna aktivnost filmova kitozana (Cs) ispitanih sa 3 vrste bakterija: a) *B. subtilis*, b) *P. aeruginosa* i c) *E. coli*



**Slika 4.2.** Antimikrobna aktivnost filmova kitozana (Cs) s nanočesticama titanijeva titanijeva dioksida (Cs-TiO<sub>2</sub>) ispitanih sa 3 vrste bakterija: a) *B. subtilis*, b) *P. aeruginosa* i c) *E. coli*

**Tablica 4.1.** Rezultati inhibicije, tj. antimikrobnog djelovanja uzoraka filmova: kitozana (Cs) te kitozana s nanočesticama titanijeva dioksida (Cs-TiO<sub>2</sub>) za 3 vrste bakterija: *B. subtilis*, *P. aeruginosa* i *E. coli*

	<b>UZORCI</b>	<i>B. subtilis</i> <b>(mm)</b>	<i>P. aeruginosa</i> <b>(mm)</b>	<i>E. coli</i> <b>(mm)</b>
UZ 2	<b>Cs</b>	0	0	0
UZ 4	<b>Cs-TiO<sub>2</sub></b>	0	0	0

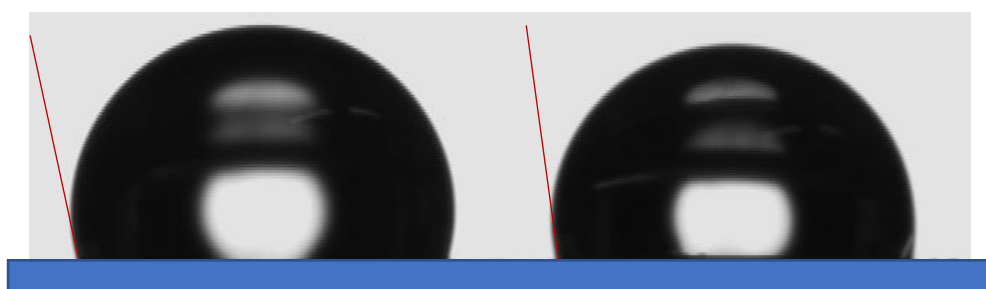
Antimikrobno djelovanje filmova analizirano je mjerenjem veličine inhibicijskih zona (radijus prstena mjeren od centra uzorka) nakon 24 h od stavljanja uzorka u suspenziju navedenih triju bakterija, a vrijednosti veličina inhibicijskih zona dane su u tablici 4.1. Iz rezultata se može primijetiti kako kitozanski film nema antimikrobno djelovanje niti za jednu od ovih bakterija. Također, može se primijetiti kako se dodatkom nanočestica TiO<sub>2</sub> u kitozanski matriks antimikrobno djelovanje ne mijenja. U literaturi<sup>21</sup> se može vidjeti da su u nekim drugim istraživanjima provedenim za uporabu u biomedicini i prehrambenoj industriji, kitozanski filmovi također pokazali nisko antimikrobno djelovanje, suprotno očekivanjima.

Ako govorimo o kitozanu, pretpostavlja se da način njegove pripreme ima utjecaj na njegova antimikrobna svojstva budući da se on može pripremiti u obliku nanočestica, gelova, filmova, ali i ovisno o mediju u kojem se nalazi. Uzimajući za primjer TiO<sub>2</sub>, možemo reći da još nisu u potpunosti poznati utjecaji smanjenja veličine njegovih čestica do nano- razine ili utjecaji procesa migracije tih nanočestica u polimernom matriksu na općenita svojstva materijala.



## 4.2. ANALIZA REZULTATA KONTAKTNOG KUTA

Vlaženje predstavlja kontaktnu površinu između kapljevine i krutine, a posljedica je djelovanja intermolekularnih sila (sila međudjelovanja). Ono određuje afinitet između dviju faza u kontaktu. Kontaktni kut teta ( $\theta$ ) je kvantitativna mjera vlaženja krutine kapljevnom. Metodom kontaktnog kuta karakterizira se površina krutih uzoraka. Metoda se zasniva na mjerenju kuta kojega kap kapljevine zatvara s krutom površinom uzorka. Tako, mali kontaktni kut upućuje na međusobnu privlačnost dviju faza jer se snižava slobodna energija međupovršine. S druge strane, veliki kontaktni kut upućuje na slabu privlačnost na međupovršini te je posljedično slobodna energija međupovršine viša. Ukoliko je testna kapljevina kojom vlažimo površinu polimernog materijala voda, onda možemo govoriti o hidrofilnosti i hidrofobnosti njegove površine. Ako je kontaktni kut između površine i kapljice vode manji od  $90^\circ$  govorimo o hidrofilnim površinama, a ako je kontaktni kut između površine i kapljice vode veći od  $90^\circ$  riječ je o hidrofobnim površinama.<sup>27</sup>



**Slika 4.3.** Kapi vode na podlozi uzoraka polimernih filmova: kitozana (Cs, lijevo) i kitozana s nanočesticama titanijevog dioksida (Cs-TiO<sub>2</sub>, desno)

**Tablica 4.2.** Vrijednosti kontaktnog kuta ( $\theta$ ) za uzorke filmova: kitozana, kitozana s nanočesticama titanijeva (II) oksida u dodiru s vodom

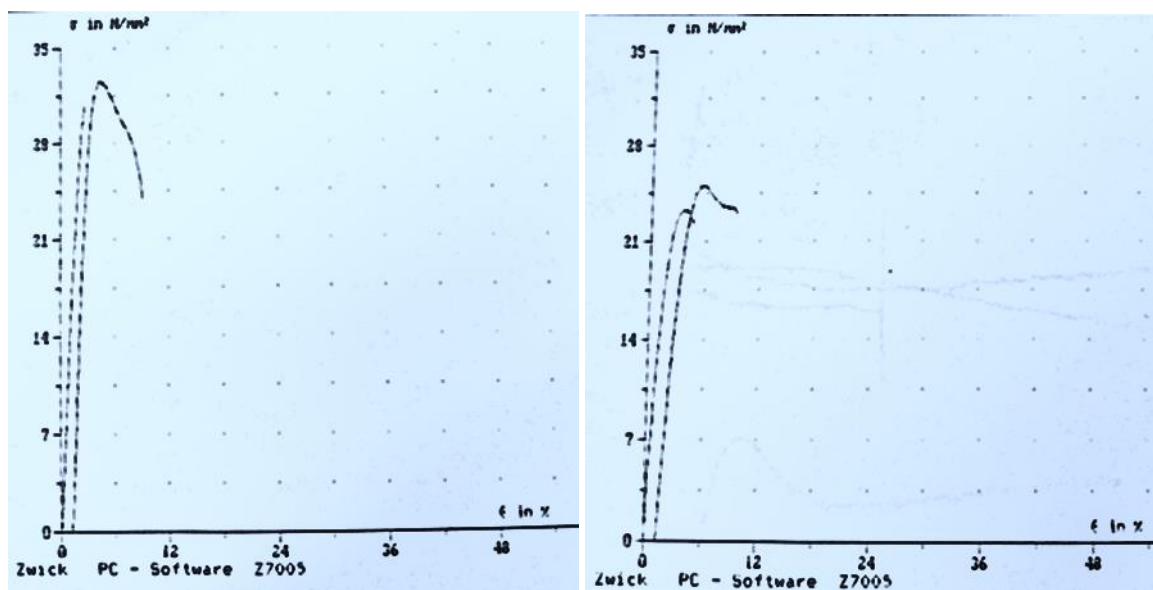
UZORCI	Cs	Cs-TiO <sub>2</sub>
kontaktni kut vode ( $\theta$ ) / °	104,2	99,5

Na slici 4.3. prikazane su kapi korištene testne kapljevine (vode) nanese na uzorke polimernih filmova kitozana (Cs) i kitozana s nanočesticama titanijevog dioksida (Cs-TiO<sub>2</sub>), a u tablici 4.2. prikazane su vrijednosti dobivenih kontaktnih kutova za iste filmove. Oba

uzorka pokazuju vrijednosti kontaktnih kutova koja je veća od  $90^\circ$  što znači da su površine oba uzorka hidrofobna. Također, može se primijetiti da se dodatkom nanočestica titanijevog dioksida kontaktni kut smanjuje, a to znači da se povećala hidrofilitnost površine nanokompozita, no on je i dalje u području hidrofobnosti. Što je vlaženje površine materijala bolje, to kapljica bolje prijanja uz površinu materijala. Na slici 4.3. je vidljivo da je vlaženje površine uzoraka slabo što znači da su kohezivne sile unutar kapljevine i unutar polimernog filma jače nego adhezivne sile između dviju faza. Pošto su vrijednosti kontaktnih kutova velike, može se zaključiti da je slobodna energija međupovršine vode i polimernih filmova kitozana te kitozana s dodatkom nanočestica  $\text{TiO}_2$  velika. Karakterizacija hidrofobnosti i hidrofilitnosti površine metodom kontaktnog kuta bitna nam je u svrhu određivanja ponašanja polimernih filmova u dodiru s vodom ili vodenom okruženju zbog procesa adsorpcije različitih tvari iz voda (rijeke, mora) na površinu filma.

### 4.3. ANALIZA REZULTATA MEHANIČKIH SVOJSTAVA

Analiza mehaničkih svojstava polimernih filmova kitozana (Cs) i kitozana s nanočesticama titanijeva dioksida (Cs-TiO<sub>2</sub>) provedena je prema dijagramu naprezanje ( $\sigma$ ) - istezanje ( $\epsilon$ ), slika 4.4. i vrijednostima vlačne čvrstoće ( $\sigma$ ), prekidnog istezanja ( $\epsilon$ ) te modula elastičnosti (E modul), tablica 4.3.



Slika 4.4. Dijagrami naprezanje ( $\sigma$ ) - istezanje ( $\epsilon$ ) za uzorke polimernih filmova kitozana (Cs, lijevo) i kitozana s nanočesticama titanijevog dioksida (Cs-TiO<sub>2</sub>, desno)

**Tablica 4.3.** Rezultati mehaničkih svojstava: vlačna čvrstoća ( $\sigma$ ), prekidno istezanje ( $\epsilon$ ) i modul elastičnosti (E modul), polimernih filmova kitozana (Cs) i kitozana s nanočesticama titanijeva dioksida (Cs-TiO<sub>2</sub>)

UZORCI	$\sigma$ (N/ mm <sup>2</sup> )	$\epsilon$ (%)	E modul (N/ mm <sup>2</sup> )
Cs	27,25	3,87	986,50
Cs-TiO <sub>2</sub>	22,80	6,33	967,3

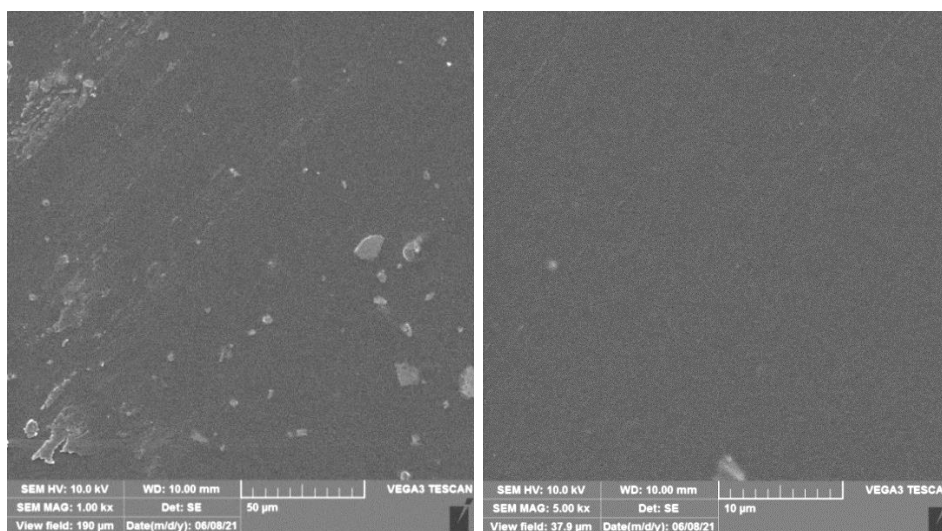
Uzorak polimernog filma čistog kitozana (Cs) ima relativno visoku vlačnu čvrstoću u iznosu od 27,25 N mm<sup>-2</sup> te nisku vrijednost prekidnog istezanja od samo 3,87%. Prema tim rezultatima može se zaključiti da je kitozanski film čvrst te slabo rastezljiv što je u skladu s teorijskom klasifikacijom, slika 2.6. Prema obliku krivulje naprezanje - istezanje, materijale možemo podijeliti u različite skupine. Oni mogu biti kruti ili meki, žilavi ili krti te čvrsti ili

slabi.<sup>27</sup> Oblik krivulje polimernih filmova kitozana te kitozana s dodatkom nanočestica titanijevog dioksida pokazuje nam da su oba srednje čvrsti, kruti i kruti materijali.

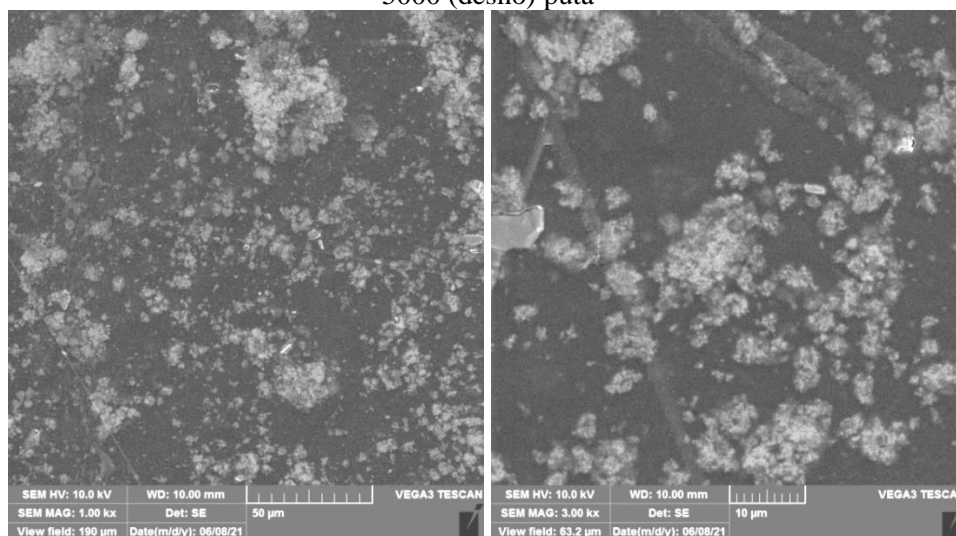
Nanokompozit kitozana (Cs-TiO<sub>2</sub>) pokazuje smanjenje vlačne čvrstoće za 16% te povećanje prekidnog istezanja čak za 64% što znači da je došlo do određenog manjeg smanjenja čvrstoće i do značajnog povećanja istezanja, odnosno elastičnosti filmova s dodatkom nanočestica TiO<sub>2</sub>. Iz teorijskih znanja poznato je da dodatak nanočestica, kad su one homogeno raspodijeljene, odnosno dispergirane u polimernom matriksu, utječe na povećanje vlačne čvrstoće i prekidnog istezanja. Ovakva raspodjela povećanja i smanjenja određenih svojstava može značiti da nanočestice titanijevog dioksida nisu dovoljno jednoliko dispergirane u matrici kitozana te da je došlo do njihovog međusobnog agregiranja.<sup>21</sup>

#### 4.4. ANALIZA REZULTATA SEM ANALIZE

Morfologija uzoraka filmova kitozana (Cs) i kitozana s nanočesticama titanijeva dioksida (Cs-TiO<sub>2</sub>) analizirana je pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM). Mikrografi uzoraka prikazani su na slici 4.5. i slici 4.6. Kad je riječ o nanokompozitnim filmovima možemo reći da je morfologija to homogenija, odnosno jednolika, bez agregiranja, što je dispergiranost nanočestica bolja. Do boljeg dispergiranja u filmu dolazi ukoliko su veće međusobne interakcije čestica i polimerne matrice te obrnuto, ukoliko nema interakcija dolazi do agregiranja. Drugim riječima, da bi čestice bile dobro mješljive s polimerom, moraju se uspostaviti međusobne interakcije putem sekundarnih (fizikalnih) veza. Posljedica dobrog dispergiranja čestica su dobra svojstva nanokompozitnog filma.



**Slika 4.5.** SEM mikrografi uzorka polimernog filma kitozana (Cs) pri povećanju od 1000 (lijevo) i 5000 (desno) puta



**Slika 4.6.** SEM mikrografi uzorka polimernog filma kitozana s nanočesticama titanijevog dioksida (Cs-TiO<sub>2</sub>) pri povećanju od 1000 (lijevo) i 5000 (desno) puta

Na slikama se mogu primijetiti velike razlike u morfologiji kitozana te nanokompozita kitozana. Na mikrografu čistog kitozana (Slika 4.5.) primjećuje se mali broj agregiranih čestica koje su malih dimenzija i nisu vidljive pri manjim povećanjima. Takve nepravilnosti u strukturi filma Cs su vrlo vjerojatno zaostale čestice neotopljenog kitozana iz procesa pripreme polimernog filma. Budući da su prisutne u niskim koncentracijama nemaju značajan utjecaj na krajnja svojstva filma. Nasuprot tome, na mikrografu nanokompozitnih filmova kitozana i titanijevog dioksida (Slika 4.6.) može se uočiti veći broj, neravnomjerno raspoređenih nanočestica  $\text{TiO}_2$ , koje čine nakupine, tj. agregirane su. Do takve aglomeracije dolazi zbog snažnih sekundarnih veza između molekula  $\text{TiO}_2$ ,<sup>21</sup> a slabih sekundarnih veza između kitozana i  $\text{TiO}_2$ . Takva slaba dispergiranost i aglomeracija čestica općenito ima velik utjecaj na svojstva, a u našem slučaju, niska antimikrobna svojstva i izmjenjena mehanička svojstva. Dakle, može se zaključiti da morfologija materijala ima velik utjecaj na njegova svojstva jer predstavlja i opisuje odnos strukture i svojstava materijala.

## 5. ZAKLJUČCI

Karakterizacijom kitozanskih filmova (Cs) i nanokompozitnih filmova s nanočesticama titanijevog dioksida (Cs-TiO<sub>2</sub>) te analizom dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- analizom rezultata antimikrobnog djelovanja može se zaključiti da uzorci čistog kitozana (Cs) i nanokompozita kitozana (Cs-TiO<sub>2</sub>) ne pokazuju antimikrobno djelovanje ni za jednu od ispitivanih bakterija (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Bacillus subtilis*).
- rezultati analize površine kitozanskih filmova (Cs) i nanokompozitnih filmova kitozana (Cs-TiO<sub>2</sub>) ukazuju da su oba uzorka hidrofobna te da se ta hidrofobnost smanjuje dodatkom nanočestica titanijevog dioksida. Nadalje, može se zaključiti da nanokompozitni filmovi kitozana s TiO<sub>2</sub> doprinose ubrzanom rastu biofilma ukoliko bi se upotrebljavali kao premazi za plovila.
- rezultati mehaničkih svojstava uzorka kitozanskih filmova ukazuju da je dodatkom nanočestica TiO<sub>2</sub> u matricu kitozana došlo do njihove promjene. Čvrstoća je smanjena, a istezanje je značajno povećano i to 68%. Svojstva su izmijenjena, ali nisu lošija budući da se ona određuju prema području primjene.
- SEM analiza morfologije ispitivanih uzoraka pokazuje da je dispergirano nanočestica TiO<sub>2</sub> u kitozanu relativno slaba, budući da su primijećena brojna agregiranja. Posljedica heterogenosti u morfologiji uzoraka je snižavanje krajnjih primjenskih svojstava filmova.

## 6. LITERATURA

1. Hrnjak-Murčić, Z., Polimeri i polimerizacijski procesi, predavanja, Sveučilište u Zagrebu: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2008.)
2. Katančić, Z., Karakterizacija materijala, predavanja, Sveučilište u Zagrebu: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2021)
3. Ivanković, M., Polimerni nanokompoziti, *Kem.ind.*, **28** (2007) 156-167
4. Vrsaljko, D., Mehanika materijala - predavanja, Sveučilište u Zagrebu: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2017)
5. Katić, J., Elektrokemija - predavanja, Sveučilište u Zagrebu: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2019)
6. Dutta P.K., Tripathi S., Mehrotra G.K., Dutta J., Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications, *Food Chem.*, **114** (2009) 1173–1182
7. Ren J., Li M., Yuan R., Pang A., Lu Z., Ge L., Adherent self-healing chitosan/dialdehyde starch coating, *Colloids and Surfaces A*, **586** (2020) 124203, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.124203>
8. Younes I., Rinaudo M., Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources, Structure, Properties and Applications, *Mar. Drugs*, **13** (2015) 1133-1174
9. Donlan, R.M., Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process, *CID*, **33** (2001) 1387–1392
10. Budiasih W., Junianto, Siswa S., Process Design of Microbiological Chitin Extraction, *Microbiol. Indones.*, **5** (1) (2013) 39-45
11. Arbia W., Arbia L., Adour L., Amrane A., Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods – A Review, *Food Technol. Biotechnol.* **51** (1) (2013) 12–25
12. Chakravarty J., Yang C.L., Palmer J., Brigham C.J., Chitin Extraction from Lobster Shell Waste using Microbial Culture-based Methods, *Appl. Food Biotechnol.*, **5** (3) (2018) 141-154.
13. Tolaimate A., Desbrieres J., Rhazi M., Alagui A., Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties, *Polymer*, **44** (2003) 7939–7952
14. Ozhan A., Murat E., Cocultivation of *Lactococcus lactis* and *Teredinobacter turnirae* for biological chitin extraction from prawn waste, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **33** (2010) 393–399



15. Pachapur V.L., Guemiza K., Rouissi T., Sarma S.J., Brar S.K., Novel biological and chemical methods of chitin extraction from crustacean waste using saline water, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **91** (2016) 2331–2339
16. Dass C.R., Choong P.F., The use of chitosan formulations in cancer therapy, *J. Microencapsul.*, **25** (2008) 275–279
17. Murata J., Saiki I., Nishimura S., Nishi N., Tokura S., Azuma I., Inhibitory effect of chitin heparinoids on the lung metastasis of B16-BL6 melanoma, *Jpn. J. Cancer Res.*, **80** (1989) 866–872
18. Qi L., Xu Z., Chen M., In vitro and in vivo suppression of hepatocellular carcinoma growth by chitosan nanoparticles, *Eur. J. Cancer*, **43** (2007) 184–193
19. Brasselet C., Pierre G., Dubessay P., Dols-Lafargue M., Coulon J., Maupeu J., Vallet-Courbin A., de Baynast H., Doco T., Michaud P., Delattre C., Modification of Chitosan for the Generation of Functional Derivatives, *Appl. Sci.*, **9** (7) (2019) 1321-1354
20. Vaezifar S., Razavi S., Ali Golozar M., Karbasi S., Morshed M., Kamali M., Effects of Some Parameters on Particle Size Distribution of Chitosan Nanoparticles Prepared by Ionic Gelation Method, *J. Clust Sci.*, **24** (2013) 891–903
21. Kratofil Krehula Lj., Papić A., Krehula S., Gilja V., Foglar L., Hrnjak-Murgić Z., Properties of UV protective films of poly(vinylchloride)/TiO<sub>2</sub> nanocomposites for food packaging, *Polym. Bull.*, **74** (2017) 1387–1404
22. Selim M.S., El-Safty S.A., El-Sockary M.A., Hashem A.I., Abo Elenien O.M., El-Saeed A.M., Fatthallah N.A., Data on photo-nanofiller models for self-cleaning foul release coating of ship hulls, *Data Br.*, **8** (2016) 1357–1364
23. Peng C., Xu J., Chen G., Tian J., He M., The preparation of  $\alpha$ -chitin nanowhiskers-poly (vinyl alcohol) hydrogels for drug release, *Int. J. Biol. Macromol.*, **15** (2019) 131:336-342. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.015>
24. Deng Z., Wang H., Ma X.P., Guo B., Self-healing conductive hydrogels: preparation, properties and applications, *Nanoscale*, **12** (2020) 1224-1246
25. Govorčin Bajsić, E., *Struktura i svojstva polimernih materijala - predavanja*, Sveučilište u Zagrebu: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2019)
26. Rogina, A., *Karakterizacija materijala - predavanja*, Sveučilište u Zagrebu: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2021)
27. Leskovic, M., *Karakterizacija materijala - predavanja*, Sveučilište u Zagrebu: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2021)

## 7. ŽIVOTOPIS

### Osobni podaci:

- Ime i prezime: Duje Kusanović

■ [REDACTED]  
■ [REDACTED]  
■ [REDACTED]  
■ [REDACTED]

### Obrazovanje:

Rujan 2017. – Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

- Student 3. godine preddiplomskog studija Kemija i inženjerstvo materijala

2013. – 2017., Srednja škola „Jure Kaštelan“, Omiš

- Učenik Opće gimnazije
- Prosjek ocjena: 4.9

### Radno iskustvo:

Srpanj 2021.

- Stručna praksa u tvrtki GALEB DALMATINSKA TRIKOTAŽA d.d., Omiš

Lipanj 2021. - srpanj 2021.

- Stručna praksa u tvrtki KUTRILIN d.o.o., Zagreb

### Strani jezici:

- Engleski jezik: razumijevanje i govor
- Njemački jezik: osnovno razumijevanje i govor  
Položen B1 stupanj, obrazovanje odraslih „Maksima“ u Splitu

### Računalne kompetencije:

- Iskusan u Microsoft Officeu (Excel, Word, Powerpoint)

### Ostale vještine i kompetencije:

- Vozačka dozvola - B kategorija
- Hobi - gitara, sport