

# Enzimaska razgradnja prirodnih polimera pri fiziološkim uvjetima

---

Lončarević, Andrea

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:915305>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-24**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Andrea Lončarević

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE I INŽENJERSTVA  
MATERIJALA

Andrea Lončarević

**ENZIMSKA RAZGRADNJA PRIRODNIH POLIMERA PRI  
FIZIOLOŠKIM UVJETIMA**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Marica Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Marica Ivanković

prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

dr. sc. Anamarija Rogina

Zagreb, rujan 2016.

## SAŽETAK

U današnje vrijeme, prirodni polimeri se sve više istražuju zbog biorazgradivosti koja se temelji na hidrolitičkom ili enzimskom djelovanju na kemijskim vezama u polimerima. Materijali koji imaju svojstvo biokompatibilnosti koriste se za medicinsku primjenu kao nosači lijekova, u inženjerstvu tkiva i kože, pri izradi srčanih zalistaka, proteza krvnih žila itd. Do njihove razgradnje dolazi u kontaktu s tjelesnim fluidima i tkivima, a produkti ne smiju biti toksični. Najčešće korišteni biomaterijali su celuloza, kolagen, poli( $\epsilon$ -kaprolakton) i hidrogelovi.

U ovom radu praćena je enzimska razgradnja poroznih struktura kitozana uz katalizator lizozim tijekom četiri tjedna inkubacije pri temperaturi od 37 °C. Enzimska razgradnja pratila se u fosfatom puferiranoj otopini soli (PBS, pH = 7,38) i u vodenom mediju. Porozne strukture karakterizirane su prije i nakon razgradnje instrumentalnim metodama rendgenske difrakcijske analize i infracrvene spektroskopije s Fourierovim transformacijama. Morfologija uzoraka istražena je pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa.

Dobiveni rezultati ukazuju na enzimsku biorazgradivost kitozana visokog stupnja deacetilacije (95 – 98 %) pri fiziološkim uvjetima, dok je aktivnost enzima u vodenom mediju izostala. Identifikacijska analiza potvrdila je zaostatak adsorbiranog lizozima koji utječe na konačni pad mase uzoraka tijekom razgradnje. Mikroskopska analiza ukazala je na promjenu mikrostrukture kitozanskih spužvi tijekom enzimске razgradnje, ali i na potencijalnu nehomogenost pripremljenih uzoraka.

**Ključne riječi:** biomaterijali, prirodni polimeri, kitozan, biorazgradivost, lizozim.

## ABSTRACT

### *Enzymatic degradation of natural polymers at physiological conditions*

Nowadays, natural polymers are being more studied due to their biodegradability, which is based on hydrolytic or enzymatic actions on chemical bonds in polymers. Biocompatible materials are used in medical applications, such as drug delivery, tissue and skin engineering, manufacturing of heart valves, vascular prostheses etc. They degrade in contact with body fluids and tissue, and degradation products must not be toxic. The mostly used biomaterials are cellulose, collagen, poly( $\epsilon$ -caprolactone) and hydrogels.

In this paper, enzymatic degradation of porous chitosan structures was monitored with lysozyme as a catalyst during four weeks of incubation at 37 °C. The enzymatic degradation was monitored in phosphate buffered saline (PBS, pH = 7.38), and water media. Scaffolds were analyzed before and after enzymatic degradation using X-ray diffraction analysis and infrared spectroscopy with Fourier transformations, while morphology of scaffolds was investigated by scanning electron microscopy.

The results indicate enzymatic biodegradability of highly deacetylated chitosan (95 – 98%) at physiological conditions, while lysozyme showed the absence of its activity in aqueous medium. The scaffolds' identification has confirmed the residues of absorbed lysozyme, which affects the final weight loss of the sample. Microscopic analysis has indicated changes in the microstructure of chitosan sponges during the enzymatic degradation, but also potential lack of homogeneity of prepared samples.

**Keywords:** biomaterials, natural polymers, chitosan, biodegradation, lysozyme.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Sintetski polimeri</b> .....	<b>3</b>
2.1.1. Sinteza sintetskih polimera.....	3
2.1.2. Razgradnja sintetskih polimera .....	3
2.1.3. Poli( $\epsilon$ -kaprolakton).....	4
<b>2.2. Prirodni polimeri</b> .....	<b>6</b>
2.2.1. Biorazgradivost prirodnih polimera .....	6
2.2.2. Proteini .....	7
2.2.3. Polisaharidi.....	8
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1. Materijali</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2. Priprema poroznih struktura</b> .....	<b>16</b>
<b>3.3. Priprema fosfatom puferirane otopine soli</b> .....	<b>17</b>
<b>3.4. <i>In vitro</i> razgradnja</b> .....	<b>18</b>
<b>3.5. Metode karakterizacije</b> .....	<b>19</b>
3.5.1. Mjerenje pH vrijednosti degradacijskog medija .....	19
3.5.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama.....	19
3.5.3. Rendgenska difrakcijska analiza .....	19
3.5.4. Pretražna elektronska mikroskopija .....	19
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>20</b>
<b>4.1. Utjecaj enzimske razgradnje na promjenu mase uzoraka i pH medija</b> .....	<b>20</b>
<b>4.2. FTIR spektroskopija</b> .....	<b>23</b>
<b>4.3. Rendgenska difrakcijska analiza</b> .....	<b>27</b>
<b>4.4. Pretražna elektronska mikroskopija</b> .....	<b>30</b>

<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>35</b>
<b>6. POPIS SIMBOLA .....</b>	<b>36</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>37</b>

# 1. UVOD

Biomaterijali su materijali koji mogu reagirati s biološkim sustavom u svrhu liječenja, povećanja ili zamjene bilo kojeg tkiva, organa ili funkcije u tijelu. Da bi se neki materijal mogao kvalificirati kao biomaterijal, osnovni preduvjet koji mora zadovoljavati je biokompatibilnost, odnosno, sposobnost materijala da na odgovarajući način reagira u zadanim uvjetima [1].

Biomaterijali su materijali napravljeni i prilagođeni za medicinsku primjenu. Najčešće se koriste kao nosači lijekova, pri izradi srčanih zalistaka, kontaktnih leća, umjetnih ligamenata i tetiva, proteza krvnih žila itd. Također se koriste i u dentalnoj medicini kao implantati za zubne fiksatore. Često primjenjivani kao biomaterijali su celuloza, poli(metilmetakrilat), poliuretani, hidrogelovi, kolagen i drugi [2]. Do razgradnje ovih biomaterijala dolazi u kontaktu s tjelesnim fluidima i tkivima koju potiče nekoliko enzima, oksidacija ili hidroliza [3].

Prirodni i sintetski polimeri opsežno se istražuju kao biorazgradivi polimerni materijali. Biorazgradivost polimernih materijala temelji se na hidrolitičkom ili enzimskom djelovanju na vezama polimera čiji raspad vodi ka polimernoj eroziji. Ovisno o tipu razgradnje, polimerni biomaterijali mogu se podijeliti u hidrolitički razgradive polimere te enzimski razgradive polimere. Prirodni polimeri uglavnom podliježu enzimskoj razgradnji [1].

Hidrolitički razgradivi polimeri su polimeri koji imaju hidrolitički nestabilne veze u svom osnovnom lancu. Funkcionalne skupine podložne hidrolizi su esterske, ortoesterske, anhidridi, karbonati, amidi, uretani, uree itd. [4]. Neki od biomaterijala koji podliježu hidrolizi su poli( $\alpha$ -esteri) (poliglikolid, polilaktid, poli( $\epsilon$ -kaprolakton) itd.), poliuretani i (umreženi) polianhidridi [1].

Enzimski razgradive polimere može se podijeliti u dvije osnovne skupine: proteini i poli(aminokiseline) te polisaharidi. U prvu skupinu ubrajaju se kolagen, prirodne i sintetske poli(aminokiseline), albumin i dr., dok se skupina polisaharida može podijeliti na polisaharide koji se mogu pronaći u ljudskom organizmu i na one kojih u njemu nema [1].

Neka od važnijih svojstva biorazgradivih biomaterijala su [5]:

- materijal ne smije izazivati upalnu ili toksičnu reakciju implantata u tijelu,
- materijal mora imati odgovarajući rok trajanja,



- vrijeme razgradnje materijala mora odgovarati vremenu potrebnom za zacjeljivanje ili obnovu tkiva,
- materijal mora imati odgovarajuća mehanička svojstva tijekom primjene, tijekom i nakon razgradnje,
- produkti razgradnje ne smiju biti toksični te moraju imati mogućnost metaboličkog uklanjanja iz tijela.

Biorazgradivi polimerni materijali sve se više istražuju. Koriste se kao privremene proteze ili kao trodimenzijske porozne strukture, odnosno nosači (engl. *scaffolds*) u inženjerstvu tkiva. Zbog svoje prilagodljivosti polimerni materijali ubrzano zamjenjuju druge vrste materijala koji se također koriste kao biomaterijali kao što su metali, legure te keramika [1].

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Sintetski polimeri

#### 2.1.1. Sinteza sintetskih polimera

Sintetski polimeri, ovisno o mehanizmu nastanka, mogu biti kondenzacijski, adicijski ili polimeri nastali polimerizacijom otvaranjem prstena. Kondenzacijski polimeri nastaju tijekom serija reakcija u kojima bilo koje dvije tvari (monomera, dimera itd.) reagiraju dajući veće molekule, uz izdvajanje „malih“ (kao što su molekule vode, amonijaka i sl.). U pojedinačnim reakcijama reagiraju pojedine funkcionalne skupine molekula. Primjeri kondenzacijskih polimerizacija su nastajanje poliestera te poliamida [6].

Polimeri nastali adicijskom polimerizacijom nastaju reakcijom u kojoj se monomeri dodaju na druge monomere stvarajući brzorastući lanac, a primjeri adicijskih polimera su polistiren, polietilen, poli(vinil-klorid) i drugi [6].

Polimerizacija otvaranjem prstena (engl. *ring-opening polymerization*) je reakcija u kojoj polimeri nastaju otvaranjem prstena monomera [6] i to je jedna od najistraživanijih polimerizacija u svrhu razvoja hidrolitički osjetljivih polimera kao što su polifosfazeni ili poliesteri [1].

#### 2.1.2. Razgradnja sintetskih polimera

Sintetski polimeri uglavnom podliježu hidrolitičkoj razgradnji, to jest hidrolizi odgovarajućih funkcionalnih skupina. Morfologija polimernih materijala ima glavnu ulogu pri procesu razgradnje. Razgradnja polukristalnih poliestera u vodenom mediju odvija se u dva stupnja. U prvom stupnju voda difundira u amorfna područja pri čemu nasumično kida esterske veze. Drugi stupanj započinje kada je amorfna faza većinom razgrađena. Hidroliza se nastavlja tada od ruba prema centru kristalnih domena (lamela) [4].

Osim hidrolize, polimere sintetskog podrijetla mogu razgraditi i enzimi. Dugački lanci polimera, kao što su lanci poli(vinil-klorida), poli( $\epsilon$ -kapolaktona) ili polietilena, kada su izloženi djelovanju enzima smanjuju svoju veličinu lanaca ili se reduciraju sve do monomera. Neki od polimera te enzimi koji utječu na njihovu razgradnju dani su u tablici 1. Literaturno je

navedeno da enzimi prvo razgrađuju amorfne dijelove polimera, a zatim napadaju kristalične dijelove [3]. Također enzimi djeluju i na aromatske i alifatske ko-poliestere. Na primjeru razgradnje poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) enzimom lipazom u organskom otapalu otkriveno je da razgradnja i polimerizacija mogu biti kontrolirane u isto vrijeme prisutnošću ili odsutnošću otapala te koncentracijom enzima [8,9].

**Tablica 1.** Enzimska razgradnja sintetskih polimera [7].

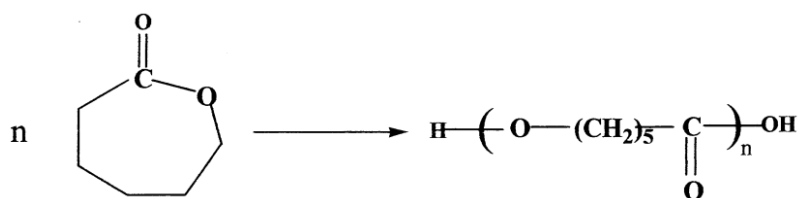
<b>POLIMER</b>	<b>ENZIM</b>
<b>polietilen glikol</b>	dehidrogenaza
<b>polipropilen glikol</b>	dehidrogenaza
<b>poli(vinil-alkohol)</b>	oksidaza, dehidrogenaza, hidrolaza
<b>poli(<math>\epsilon</math>-kaprolakton)</b>	lipaza, kutinaza
<b>poli(laktidna kiselina)</b>	proteaza, lipaza

### **2.1.3. Poli( $\epsilon$ -kaprolakton)**

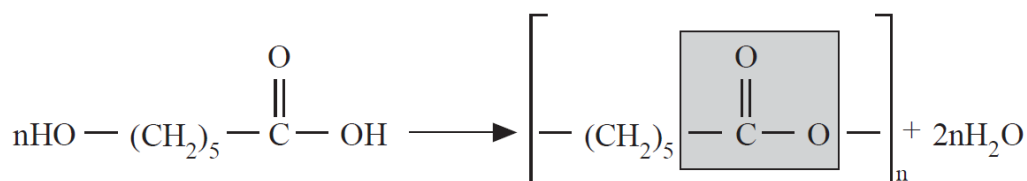
Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL) je alifatski poliester. To je polukristalinični polimer stupnja kristalnosti do 69 %. Fizikalna, toplinska i mehanička svojstva ovise o molekulskoj masi i stupnju kristalnosti. Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) topljiv je u mnogim organskim otapalima i netopljiv u alkoholima, dietil-eteru i vodi. Ima nisko talište (55 – 60 °C) i staklište (-60 °C). Može stvarati mješavine s mnogim polimerima (kao što su poli(vinil-klorid), stiren-akrilonitrilna smola, akrilonitril-butadien-stiren) [1,10].

#### **2.1.3.1. Sinteza poli( $\epsilon$ -kaprolaktona)**

Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) je od velikog značaja jer se može dobiti polimerizacijom otvaranjem prstena relativno jeftinog monomera  $\epsilon$ -kaprolaktona ( $\epsilon$ -CL) (slika 1) [1]. Također se može dobiti i polikondenzacijom 6-hidroksikapronske (6-hidroksiheksanske) kiseline (slika 2) [10].



**Slika 1.** Polimerizacija otvaranjem prstena  $\epsilon$ -kaprolaktona [11].



**Slika 2.** Polikondenzacija 6-hidroksikapronske kiseline [6].

### 2.1.3.2. *Biorazgradivost i primjena poli( $\epsilon$ -kaprolaktona)*

Polimer podliježe hidrolizi zbog prisutnosti funkcionalne skupine estera i ona traje od nekoliko mjeseci do nekoliko godina, ovisno o molekularnoj masi, stupnju kristalnosti i uvjetima razgradnje. Netoksičnost, visoka propusnost za mnoge lijekove i dug rok trajanja prednosti su poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) koje ga čine zanimljivim kao dugoročnog dostavljača lijekova ili cjepiva [1,10]. Istraživanja kao dostavljača lijekova također se provode i na razini mikro- i nano-veličina [12], a zbog odlične biokompatibilnosti također se istražuje u inženjerstvu tkiva kao nosač. Kao kompozit s hijaluronskom kiselinom, PCL se istražuje kao potencijalna zamjena za meniskus [13]. Koristi se i kao adheziv [10].

Kako bi se poli( $\epsilon$ -kaprolaktonu) smanjilo vrijeme potrebno za razgradnju,  $\epsilon$ -kaprolakton kombinira se s drugim monomerima (npr. DL-laktid, glikolid) dajući kopolimere željenih svojstava. Kopolimer  $\epsilon$ -kaprolaktona i DL-laktida brže se razgrađuje u odnosu na poli( $\epsilon$ -kaprolakton). Poli(laktid-co-glikolid-co- $\epsilon$ -kaprolakton) kopolimer u kombinaciji s polietilen glikolom primjenjuje se kao dostavljač lijekova za biološki aktivne molekule male i srednje veličine [1].

Prirodni polimeri koji se najčešće dodaju PCL-u su kitozan, paukova svila, kolagen, i elastin. Trodimenzijski kompozitni hidrogelovi PCL/kitozan pokazuju puno bolja fizikalna i mehanička svojstva u odnosu na čisti poli( $\epsilon$ -kaprolakton) [14].

## **2.2. Prirodni polimeri**

Svi procesi pretvorbe koji se događaju u ljudskom tijelu (na primjer proizvodnja energije iz hrane unijete u organizam), događaju se zbog prisutnosti enzima. Enzimi, nukleinske kiseline i proteini su polimeri biološkog porijekla. Dok su njihove strukture obično vrlo kompleksne, strukture celuloze i prirodnog kaučuka, koji su također biljnog porijekla, znatno su jednostavnije [6].

Prirodni polimeri imaju nekoliko prednosti pred sintetskim polimerima u primjeni, a to su bioaktivnost, osjetljivost na proteolitičku razgradnju (cijepanje proteina na nukleinske kiseline) i mogućnost (prirodnog) preslagivanja. Bioaktivnost ima i svoje mane, kao što su snažan imunogeni odgovor povezan s većinom polimera, kompleksnost povezana s njihovom čistoćom, te mogućnost prenošenja bolesti.

Polisaharidi i poliesteri su dvije glavne skupine biopolimera koji se koriste u raznovrsnim primjenama. Najvažniji polisaharidi dobiveni iz biljaka i mikrobnih izvora su celuloza, škrob i glikogen. Primjer poliestera dobivenog iz bakterija je polihidroksibutirat (PHB), a najznačajniji polimeri životinjskog porijekla i korišteni kao biomaterijali su kolagen, hitin, kitozan i svila [15].

### **2.2.1. Biorazgradivost prirodnih polimera**

Biorazgradivost (engl. *biodegradation*) je često definirana kao razgradnja u biološkom okruženju. S biomedicinskog stajališta, biorazgradivost je definirana kao postepeni raspad materijala posredovan specifičnom biološkom aktivnošću. Kada se govori o biorazgradivim polimerima, tada se smatra da su to materijali koji imaju mogućnost obavljanja određenih funkcija tijekom vremena nakon čega se počinju razgrađivati. Razgradnja je praćena kontroliranim mehanizmima, a produkti se lako eliminiraju iz tijela metaboličkim putem. Na ovaj način biorazgradnja smanjuje moguće komplikacije do kojih bi došlo uslijed dugoročne prisutnosti stranih materijala u tijelu ili potrebu za novom operacijom kako bi se implantat nakon određenog vremena uklonio iz tijela [15].

Tijekom procesa razgradnje, enzimi prvo difundiraju kroz otopinu do površine polimernog materijala. Zatim se adsorbiraju na površinu i kataliziraju reakciju razgradnje nakon čega produkti razgradnje prelaze u otopinu [15].

Primjer biorazgradivog polimera je škrob koji nastaje povezivanjem monomera glukoze  $\alpha(1\rightarrow4)$  glikozidnom vezom. U ljudskom tijelu škrob razgrađuju enzimi amilaze i to tijekom 20 – 60 min [16]. Celuloza, drugi derivat glukoze, za razliku od škroba nije razgradiva u ljudskom organizmu [17].

## **2.2.2. Proteini**

Proteini su glavne strukturne komponente mnogih tkiva, a po kemijskom sastavu su poliamidi čije su monomerne jedinice sastavljene od 20 različitih  $\alpha$ -aminokiselina spojenih u trodimenzijsku zavijenu strukturu. Također su to i polipeptidi – dugolančane molekule koje su nastale spajanjem aminokiselina. Peptidna veza je veza između amino-skupine jedne aminokiseline i karboksilne skupine druge aminokiseline. Proteini se smatraju jednim od najvažnijih biomolekula, a uz njih značajnu ulogu imaju i ostali aminokiselinski derivati, koji se u biomedicinskoj primjeni koriste kao šavovi, nosači u inženjerstvu tkiva i kao dostavljači lijekova. Neki od važnijih proteina su kolagen, elastin, albumin i fibrin [1,18].

### **2.2.2.1. *Kolagen***

Kolagen je jedan od najčešće prisutnih proteina u ljudskom tijelu kao komponenta kože te u mišićnom i koštanom tkivu. Polimerni lanac približno je dugačak 300 nm, relativne molekulske mase 300 000. Do sada su utvrđene 22 vrste kolagena u ljudskom tijelu, a najčešći su tip I-IV. Kolagen tip I je najčešće prisutni kolagen u sisavaca te je i najistraživaniji. Sastoji se od tri polipeptidne jedinice sličnih gradivnih jedinica (aminokiselina) [1].

Kako je kolagen glavna komponenta izvanstanične matrice i služi kao prirodni supstrat za pričvršćivanje stanica, smatra se idealnim materijalom za inženjerstvo tkiva i za liječenje rana. Uslijed visoke reaktivnosti, kolagenu se mogu dodati umreživala kao što su aldehidi, karbodiimidi te poliepoksi-komponente. Pomoću umreživala nastaju gelovi koji se koriste kao dostavljači lijekova (za dostavu antibiotika i lijekova male molekulske mase) te kao porozne strukture u tkivnom inženjerstvu [1]. Umreživala usporavaju brzu razgradnju i poboljšavaju slabu mehaničku čvrstoću netretiranog kolagena [19].

Umrežene apsorbirajuće spužve na bazi kolagena klinički se istražuju kao dostavljači proteina [20], gena i plazmida DNK. Uslijed odlične biokompatibilnosti, biorazgradivosti i porozne strukture, apsorbirajuće kolagenske spužve se istražuju u području ubrzane regeneracije tkiva, a kompozit kojeg čine vlaknasti kolagen, hidroksiapatit i kalcijev fosfat koristi se kao zamjena za kosti [1]. Umrežene porozne strukture na bazi kolagena i kitozana također se istražuju. Koriste se u inženjerstvu tkiva i kože [19,21] te pri izradi umjetne jetre [22].

Kolagen podliježe enzimskoj razgradnji uzrokovanoj enzimima kao što su kolagenaza i metaloproteinaza. Fizikalno-kemijska, mehanička i biološka svojstva kolagena tijekom razgradnje se istražuju u svrhu biomedicinske primjene. Većinom je topljiv u razrijeđenim otopinama kiselina i može biti prerađen u različite oblike kao što su cijevi, spužve, nano-vlaknaste matrice, prašci, injekcijske otopine i disperzije [1].

Pri razgradnji kolagena (dobivenog iz kože ovce i umreženog s karbodiimidom) kao enzim korištena je bakterijska kolagenaza, a dobiveni rezultati pokazuju da nije došlo do gubitka mase tijekom 24-satnog praćenja razgradnje. U kontrolnoj grupi koju je činio čisti kolagen, zabilježen je gubitak mase u iznosu od 18,1 % po satu razgradnje [23]. U literaturi [24] pretpostavlja se mehanizam razgradnje kolagena posredovane kolagenazom. Primarni efekt kolagenaze je da cijepa molekulu kolagena na dva segmenta koji su zatim više podložni hidrolizi ostalih proteaza.

Kolagen za biomedicinsku primjenu dobiva se iz goveđe ili svinjske kože, ili iz Ahilove tetive goveda ili konja. Nedostatak biomaterijala na bazi kolagena za rašireniju kliničku primjenu je blaga imunogenost uzrokovana sastavom terminalne regije i antigenskih mjesta u središnjoj spirali. Imunogenost ovisi o vrsti od koje kolagen potječe, procesnim tehnikama kojima je dobiven te o mjestu implantacije. Uz visoku cijenu dobivanja čistog kolagena, variranje u fizikalno-kemijskim i degradacijskim svojstvima, mana kolagena je i mogućnost prenošenja infekcija. Trenutno se provode istraživanja na temelju proizvodnje kolagena iz ljudskog organizma kako bi se smanjila potrošnja onog dobivenog iz životinja [1].

### **2.2.3. Polisaharidi**

Polisaharidi su makromolekule nastale spajanjem monosaharida pomoću glikozidnih veza. Sve se više izučavaju kao biomaterijali zbog njihovih jedinstvenih bioloških funkcija – od staničnih signalizacija pa sve do imunološkog prepoznavanja. U kombinaciji s novim

sintetičkim putevima koji su trenutno dostupni za modificiranje polisaharida, biorazgradivost i sposobnost proizvodnje odgovarajućih struktura, polisaharide čine važnima te izuzetno zanimljivima za istraživanje kao prirodnih biomaterijala [1].

Polisaharidi se dijele u dvije skupine. Prvu skupinu čine polisaharidi ljudskog podrijetla. Najvažniji predstavnici su hijaluronska kiselina i hondroitin sulfat. Druga skupina su polisaharidi koji ne nastaju u ljudskom tijelu. Najvažniji predstavnici ove skupine su kationski polimer kitozan i anionski polimer alginska kiselina. Kitozan se najčešće dobiva iz kostura rakova, a alginska kiselina iz smeđih algi. Oba polimera koriste se kao dostavljači lijekova, a njihov zajednički polielektrolitski kompleks koristi se i pri liječenju rana [1].

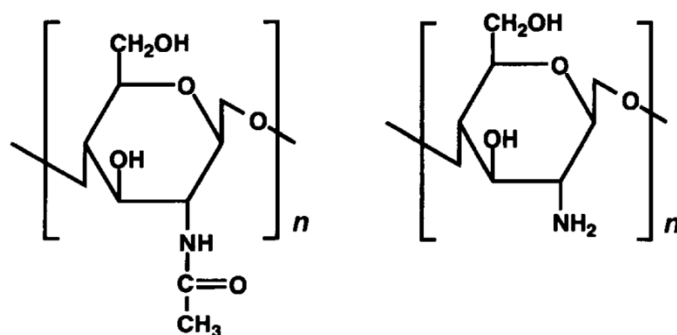
### **2.2.3.1. Kitozan**

#### **2.2.3.1.1. Dobivanje i struktura kitozana**

Hitin, poli( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-*N*-acetil-D-glukozamin), prirodni je polimer dobiven iz velikog broja živućih organizama. Dobiva se iz egzoskeleta člankonožaca ili iz stijenki stanica gljivica i kvasca. Također ga proizvode i organizmi iz nižih redova biljnog i životinjskog svijeta gdje služi kao pojačanje i obavlja funkcije u kojima je potrebna snaga. Glavni izvor hitina su rakovi i ljuske škampa [25,26].

Najvažniji derivat hitina je kitozan, poli(D-glukozamin) (slika 3), koji se dobiva deacetiliranjem hitina. U čvrstom stanju to je polukristalični polimer netopljiv pri pH vrijednostima većima od 7. Kada je stupanj deacetilacije (engl. *degree of deacetylation*, DD) hitina približno 50 % (ovisno o podrijetlu polimera), hitin postaje topljiv u razrijeđenim otopinama kiselina te se naziva kitozan. Do otapanja dolazi uslijed protoniranja  $-NH_2$  skupine na C-2 atomu D-glukozaminske ponavljajuće jedinice. Kitozan je jedini pseudo-prirodni kationski polimer, a zbog svoje topljivosti u vodenom mediju, koristi se kao otopina, gel, film ili u obliku vlakana [25-27]. Vlakna mogu biti nano-veličine, dok čestice mogu biti nano- i mikro-veličine [1].





**Slika 3.** Kemijske strukture hitina (lijevo) i kitozana (desno) [28].

#### 2.2.3.1.2. Svojstva i primjena kitozana

Zbog svoje strukture kitozan može stvarati komplekse s metalima, a kao polielektrolit, stvara i elektrostatičke komplekse u kiselim uvjetima. Elektrostatički kompleksi sa suprotno nabijenim polimerima (kao što su proteini, polianioni, DNK) sve se više istražuju. Primjenjuju se kao anti-trombogeni materijali, a koriste se i za inkapsulaciju lijekova, imobilizaciju enzima i stanica te kao nositelji gena. Polielektrolitički kompleksi zajedno s kitozansom stvaraju kapsule ili filmove temeljene na njihovoj biokompatibilnosti [25,26].

Prednost kitozana kao biomaterijala su biorazgradivost, antibakterijsko djelovanje i hidrofilnost postignuta uvođenjem polarnih skupina koje mogu stvarati sekundarne veze. Hidroksilna ( $-OH$ ) i amino ( $-NH_2$ ) skupina povećavaju afinitet kitozana za vodom, isto kao i mogućnost stvaranja vodikovih veza s molekulama vode te s drugim polimerima [25,27]. Karakteristike kitozana su i biokompatibilnost, dobra mješljivost s drugim polimerima te mogućnost stvaranja premaza. Nisko-molekulski fragmenti, tzv. kitozan-oligomeri, nastali razgradnjom kitozana, značajni su zbog svoje velike bioaktivnosti [29]. Uz to oligomeri kitozana su potvrđeni kao vrsta probiotika koja povoljno mijenja ravnotežu crijevne mikroflore, inhibira rast štetnih bakterija, potiče dobar rad probave te potiče rad imunološkog sustava [30]. Kitozan je netoksičan [31], a američka Agencija za hranu i lijekove (FDA) dozvolila je njegovu primjenu u zacjeljivanju rana [32].

U tablici 2 dana su glavna svojstva kitozana te moguće biomedicinske primjene. U farmaceutskom području kitozan se koristi kao dostavljač lijekova, primjenjujući se oralno, nazalno, parenteralno i transdermalno, te kao implantat i za dostavljanje gena. Jedno od područja u kojima se može primijeniti kitozan je i kozmetika. Koristi se za liječenje akni,

smanjenje statičkog elektriciteta u kosi, te za oralnu higijenu (paste za zube, žvakače gume) [25].

**Tablica 2.** Svojstva kitozana za medicinsku primjenu [25,30].

<b>KARAKTERISTIKE</b>	<b>BIOMEDICINSKA PRIMJENA</b>
<b>biokompatibilnost</b>	kirurški konci
<b>brza biorazgradivost</b>	zubni implantati
<b>obnovljivost</b>	umjetna koža
<b>oblikovanje (film)</b>	kontaktne leće (za rožnicu)
<b>sposobnost hidratacije</b>	inkapsulacijski materijal
<b>netoksičnost, biološka tolerantnost</b>	inženjerstvo tkiva
<b>enzimska razgradivost (lizozim)</b>	liječenje rana
<b>učinkovit protiv bakterija, virusa i gljivica</b>	

Kitozan se koristi i pri inkapsulaciji stanica kao unutarnja jezgra [33], dok kitozan glicerofosfat zajedno s kalcijevim fosfatom i limunskom kiselinom stvara injekcijski samootvrdnjavajući sustav za popravljavanje ili punjenje kostiju [25].

Kitozan je pronašao primjenu i u poljoprivredi gdje se koristi za poticanje prirodnog rasta biljaka, kao zaštita od smrzavanja, te pri otpuštanju gnojiva i hranjivih tvari u tlu. Zbog mogućnosti stvaranja kompleksa s teškim metalima, kitozan se koristi i pri pročišćavanju otpadnih voda. Primjenjuje se pri uklanjanju sintetskih polimera iz vode i smanjenju neugodnih mirisa vode. U prehrambenoj industriji (u Japanu, Italiji i Finskoj [31]) koristi se kao konzervans, te zgušnjivač i stabilizator za umake [25].

Današnja istraživanja temelje se na razvoju kitozana kao poroznog materijala za inženjerstvo (različitih) tkiva uključujući hrskavicu, kožu i kosti [1,30], a visoka kemijska reaktivnost vodi ka nekoliko kitozan-lijek sustava koji se proučavaju za liječenje tumora [1].

#### 2.2.3.1.3. Otapanje kitozana

Ispitivanja uloge protoniranja kitozana u prisutnosti octene kiseline [33] i klorovodične kiseline na topljivost pokazala su da stupanj ionizacije ovisi o pH i pK kiseline. Otapanje

kitozana visokog stupnja deacetilacije nastaje zbog prosječnog stupnja ionizacije,  $\alpha$ , koji iznosi oko 0,5 (pri pH = 4,5 – 5) [25].

Raspodjela acetilnih skupina duž lanca (nasumično ili u blokovima) može imati utjecaja na topljivost polimera isto kao i unutarlančane interakcije uslijed vodikovih veza i hidrofobnog karaktera acetilne skupine [25].

Otapanje kitozana, osim o stupnju deacetilacije i pH medija, ovisi i o ionskoj koncentraciji, korištenoj kiselini za protoniranje te o raspodjeli acetilnih/amino skupina duž lanca. Također su bitni uvjeti tijekom izolacije i sušenja polisaharida. Važne su i unutarlančane vodikove veze uključujući hidroksilne skupine. Mikrostruktura polimera također je važna pri topljivosti. Kritična vrijednost stupnja deacetilacije kitozana za postizanje netopljivosti u kiselom mediju je veća od 60 %, a topljivost kitozana pri neutralnom mediju je istražena za DD = 50 %. Stabilne otopine pripravljene su pri pH = 7,0 – 7,1 i pri sobnoj temperaturi, dok se gel stvara pri nešto većim temperaturama (oko 40 °C). Transformacija sol-gel djelomično je reverzna, a temperatura geliranja neznatno ovisi o eksperimentalnim uvjetima [25].

#### 2.2.3.1.4. Enzimska razgradnja

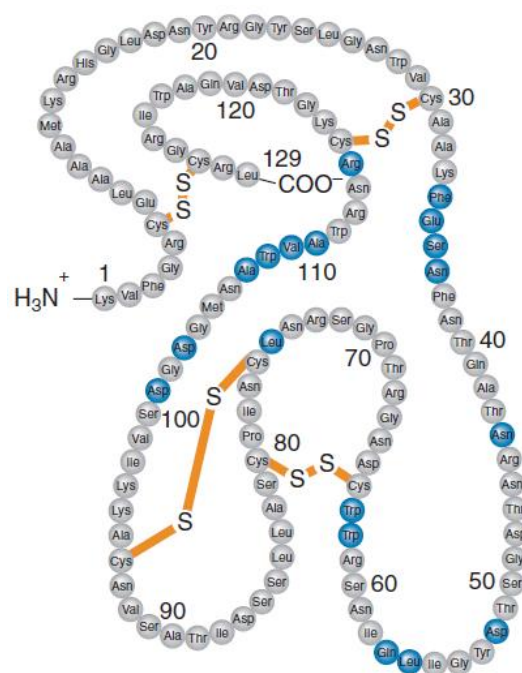
Biorazgradivost kitozana u živim organizmima ovisi o stupnju deacetilacije i o molekulskoj masi. Kitozan mogu razgraditi enzimi koji hidroliziraju veze glukozamin–glukozamin, glukozamin–*N*-acetil-glukozamin i *N*-acetil-glukozamin–*N*-acetil-glukozamin. U ljudskom tijelu može biti razgrađen djelovanjem lizozima te bakterijskih enzima prisutnih u debelom crijevu [31].

Do sada je otkriveno osam (ljudskih) hitinaza, a tri je pokazalo enzimsku aktivnost. Hitinaze u mikroorganizmima hidroliziraju *N*-acetil- $\beta$ (1→4)-glukozamindnu vezu, to jest one su endo-hitinaze. Hitinaze dobivene iz različitih organizama imaju različite karakteristike. Primjer je optimalna vrijednost pH za aktivnost enzima koja se kreće u rasponu od pH = 2,5 (hitinaza izolirana iz *Saccharomyces cerevisiae* [35]), pa sve do pH = 9,0 (hitinaza dobivena iz *Oreochromis niloticus*) [31].

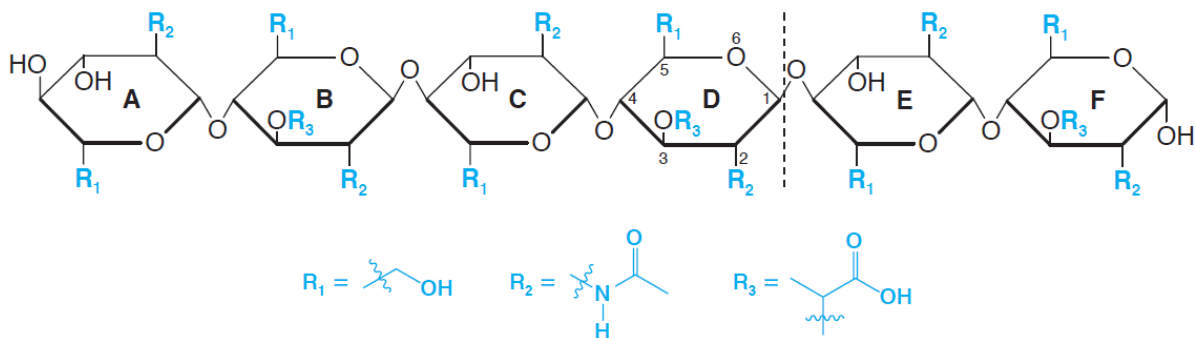
Lizozim (LZ) je jednolančani polipeptid sastavljen od 129 aminokiselina povezanih s četiri disulfidna mosta, a primarna struktura prikazana je na slici 4. Sekundarna struktura uključuje  $\alpha$ -heliks,  $\beta$ -nabrane ploče i  $\beta$ -hairpin. Lizozim je prisutan u mnogim tkivima i

izlučevinama ljudskog tijela (kao što su suze, majčino mlijeko, slina, sluzi), u biljkama, a najviše ga ima u bjelanjku kokošjeg jajeta [18,36,37].

Lizozim je enzim koji napada stanične stjenke gram-pozitivnih bakterija. Hidroliza specifičnih acetalnih veza polimera peptidoglikana u stanicama uzrokuje „smrt“ stanice. Struktura oligosaharida slična polisaharidima pronađenima u stjenkama bakterijskih stanica prikazana je na slici 5. *N*-acetilglukozamin (NAG) i *N*-acetilmuraminska kiselina (NAM) tvore pravilno naizmjenične ponavljajuće jedinice polisaharida. Lizozim selektivno povezuje šest-jedinica segmenata peptidoglikana, a hidrolizira vezu između prstena D i E (jedinica NAG i NAM; slika 5.) [18].



**Slika 4.** Primarna struktura lizozima dobivenog iz bjelanjka kokošjeg jajeta [18].



**Slika 5.** Struktura oligosaharida slična polisaharidima u stjenkama bakterijskih stanica.

Prsteni A, C i E su NAG, a prsteni B, D i F su NAM [18].

Osim do sad navedenih lizozima i hitinaza, enzimi koji razgrađuju kitozan su i kitozanaza, hitin-deacetilaza te  $\beta$ -N-acetil heksoaminidaza [29,31].

#### 2.2.3.1.5. Pregled literature

Zbog svojih odličnih svojstava, kitozan se sve više istražuje kao biomaterijal. Stoga su provedena mnoga istraživanja u svrhu određivanja što točnijih podataka, kako o fizikalnim i kemijskim svojstvima, tako i o njegovoj razgradnji.

Eksperiment proveden na mikrokristaličnim uzorcima kitozana (MCCh, DD = 82,7 %) u vodenom mediju pri različitim temperaturama daje rezultate koji upućuju da, kao takav polimer, kitozan vrlo lako podliježe biorazgradivosti i to najbrže pri temperaturi od 40 °C [26].

Enzimskoj razgradnji mikrokristalični kitozan (DD = 75,8 %) podvrgnut je u poljskom Institutu za biopolimere i kemijska vlakna, a u svrhu proučavanja fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava razgrađenog kitozana. Korišteni enzim je (neutralna) celulaza, a razgradnja je vođena tijekom 7 sati pri 50 °C. Dobiveni rezultati upućuju na to da je stupanj deacetilacije nakon razgradnje porastao (na DD = 77,4 %) te da oligomeri kitozana nastali razgradnjom imaju znatno bolja antivirusna svojstva od mikrokristaličnog kitozana. Uz to, oligomeri i djelomično razgrađeni uzorci kitozana pokazuju bolja antibakterijska djelovanja u odnosu na MCCh [29].

Nakon *in vitro* enzimske razgradnje kitozana (DD = 50 %) lizozimom tijekom četiri sata pri 37 °C i pH = 5,5 dobiven je 66 %-tni gubitak u odnosu na početnu vrijednost viskoznosti [31].

U istraživanju u kojem je stupanj deacetilacije kitozana iznosio 86 %, koncentracija lizozima bila jednaka koncentraciji u ljudskom tijelu, razgradnja je praćena tijekom četiri tjedna inkubacije pri fiziološkim uvjetima. Dobiveni rezultati pokazuju da gubitak mase ispitivanih uzoraka raste tijekom vremena inkubacije te da se kitozan s najvećom koncentracijom najsporije razgrađuje [27].

U ovom radu istražena je enzimska razgradnja kitozana uz lizozim u trajanju od četiri tjedna inkubacije u puferskom i vodenom mediju. Osim gravimetrijskog utvrđivanja razgradnje, istražen je utjecaj na sastav i mikrostrukturu kitozana prije i nakon podvrgavanja enzimskoj razgradnji, što je prema dostupnoj literaturi malo koje istraživanje do sada napravilo.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

Za pripremu poroznih uzoraka korišteni su:

- Kitozan, CHT ( $M_w = 100\ 000 - 300\ 000\ \text{g mol}^{-1}$ , stupanj deacetilacije, DD = 0,95 – 0,98; Across Organics, SAD),
- Octena kiselina,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (99,5 %; Poch Gliwice, Poljska),
- Natrijev hidroksid, NaOH (Gram-Mol d.o.o., Hrvatska),
- Etilni alkohol, EtOH (96 %; Kefo d.o.o., Slovenija).

Za pripremu otopine fosfatnog pufera (PBS) korišteni su:

- Natrijev klorid, NaCl (Carlo Erba Reagents, Francuska),
- Kalijev klorid, KCl (Gram-Mol d.o.o., Hrvatska),
- Kalijev dihidrogenfosfat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (ES, Acros, Geel, Belgija),
- Natrijev hidrogenfosfat anhidrid,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Fisher Scientific UK, Ujedinjeno Kraljevstvo),
- Klorovodična kiselina, HCl (37 %; Merk-Alkaloid, Makedonija).

Kao katalizator razgradnje korišten je lizozim, LZ ( $\geq 90\ \%$  proteina, aktivnosti  $\geq 40\ 000\ \text{U mg}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Kanada).

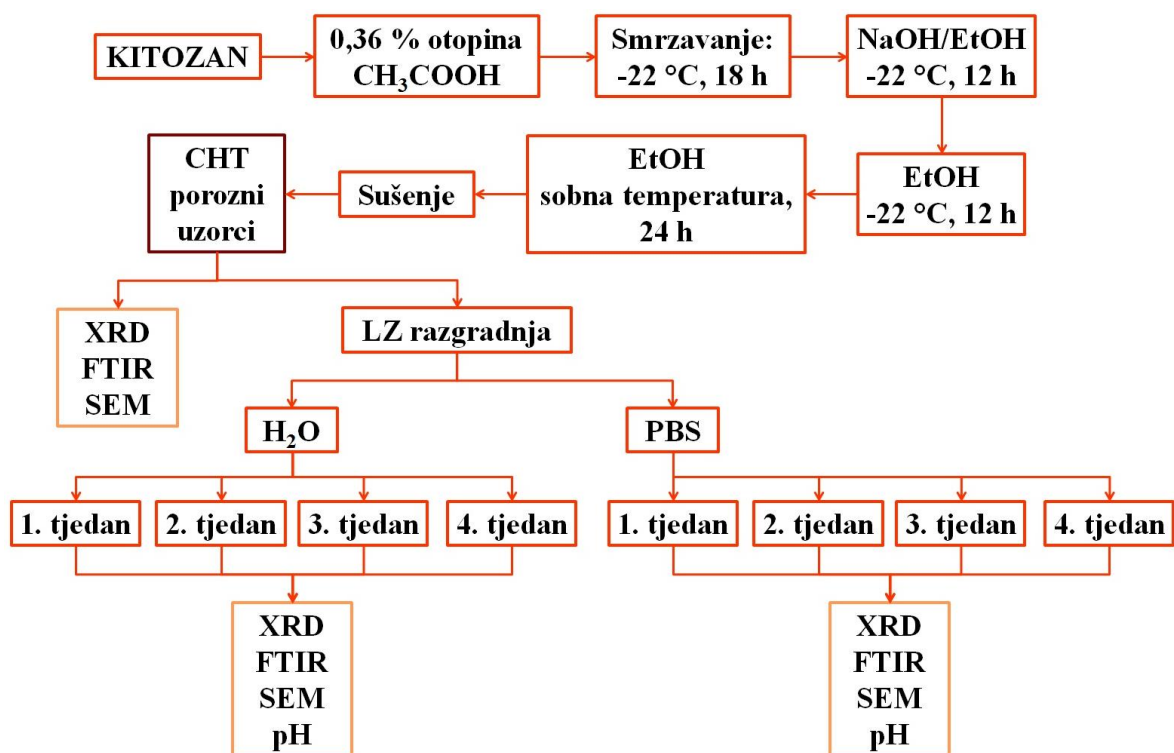
#### 3.2. Priprema poroznih struktura

Porozne strukture dobivene su primjenom metode toplinski inducirane fazne separacije uz geliranje i ekstrakciju (engl. *freeze-gelation*).

1,2 %-tna otopina kitozana pripremljena je otapanjem kitozana u 0,36 %-tnoj otopini octene kiseline. Dobivena otopina smrznuta je u kalupima pri  $-22\ ^\circ\text{C}$  tijekom 18 sati. Nakon toga, smrznuti uzorci su uronjeni u neutralizacijski medij koji čine  $1\ \text{mol dm}^{-3}$  NaOH i EtOH u volumnom omjeru 1:1 pri temperaturi od  $-22\ ^\circ\text{C}$  sljedećih 12 sati. Uzorci su potom uronjeni u čisti etanol pri  $-22\ ^\circ\text{C}$  tijekom sljedećih 12 sati. Pri tome se uzorci ispiru od natrijeve lužine te mogućih prisutnih nečistoća. Potom su uzorci uronjeni u čisti etanol pri sobnoj temperaturi

naredna 24 sata kako bi se uklonila voda iz njih, odnosno kako bi došlo do njihove dehidracije. Na kraju pripreme, uzorci su ostavljeni na sobnoj temperaturi sljedeća 24 sata kako bi sav etanol polagano ishlapio. Kitozanske spužve označene su oznakom CHT.

Shematski prikaz pripreme poroznih struktura te enzimske razgradnje dan je na slici 6.



Slika 6. Dijagram toka pripreme i enzimske razgradnje poroznih struktura.

### 3.3. Priprema fosfatom puferirane otopine soli

Fosfatom puferirana otopina soli (PBS) pripremljena je u odmjernoj tikvici volumena 1 dm<sup>3</sup>. Komponente iz tablice 3 izvagane su i postepeno dodavane u odmjernu tikvicu s 800 cm<sup>3</sup> deionizirane vode. Nakon što su soli otopljene, tikvica je napunjena do oznake, a pH vrijednost pripremljene otopine korigirana je dodatkom klorovodične kiseline. Konačna pH vrijednost otopine PSB-a iznosila je 7,38.



**Tablica 3.** Soli i pripadajuće mase potrebne za pripravu otopine 1X PBS otopine.

KOMPONENTA	<i>m</i> / g
NaCl	8,0
KCl	0,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44

### 3.4. In vitro razgradnja

*In vitro* razgradnja provedena je uz pomoć enzima lizozima u dva različita medija: deioniziranoj vodi, H<sub>2</sub>O (pH = 5,73) i fosfatnom puferu, PBS (pH = 7,38) pri koncentraciji lizozima od 800 mg dm<sup>-3</sup>. Izvagani uzorci (*m*<sub>1</sub>) poroznih struktura uronjeni su u otopine lizozima pripravljene u PBS-u (LZ/PBS), odnosno vodi (LZ/H<sub>2</sub>O). Enzimska razgradnja pratila se u inkubatoru tijekom četiri tjedna pri temperaturi od 37 °C uz 80 okr. min<sup>-1</sup>. Svježi medij mijenjan je svaka tri dana. Nakon određenog vremenskog perioda, ispitivani uzorci izvađeni su iz medija, isprani destiliranom vodom, osušeni u sušioniku do konstantne mase na temperaturi od 50 °C te vagani (*m*<sub>2</sub>). Kao rezultat *in vitro* razgradnje dobivene su vrijednosti gubitka mase ( $\Delta m$ ) tijekom ispitivanog razdoblja izračunate prema jednadžbi 1:

$$\Delta m (\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \quad (1)$$

Kao kontrola enzimske razgradnje, provedeno je inkubiranje kitozanskih uzoraka pri jednakim uvjetima u puferskom (PBS) i vodenom (H<sub>2</sub>O) mediju bez lizozima. Mjerenja enzimske razgradnje odrađena su u triplikatima, dok su kontrole u duplikatima.

Kako bi se potvrdile dobivene vrijednosti za gubitak mase nakon razgradnje, uzorci su podloženi postupku „freeze-extraction“. Uzorci prethodno isprani u deioniziranoj vodi, smrznuti su i isprani ohlađenim etanolom na temperaturi -22 °C, a potom i etanolom pri sobnoj temperaturi nakon čega su ostavljeni na zraku da se osuše do konstantne mase.

### **3.5. Metode karakterizacije**

#### **3.5.1. Mjerenje pH vrijednosti degradacijskog medija**

Mjerenje pH vrijednosti medija tijekom inkubacije ispitivanih uzoraka provedeno je pomoću pH-metra Schott CG 842 uz staklenu elektrodu BlueLine 14 s preciznošću od 0,01 i mogućnosti mjerenja temperature *in situ*.

#### **3.5.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama**

Infracrvena spektroskopska analiza s Fourierovim transformacijama (FTIR) korištena je za identifikaciju ispitivanih uzoraka pomoću instrumenta Bruker Vertex 70. Raspon mjernog područja je  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$  24 puta pri zadanom apsorpcijskom režimu uz rezoluciju od  $4 \text{ cm}^{-1}$  i temperaturi od  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **3.5.3. Rendgenska difrakcijska analiza**

Kristalnost ispitivanih uzoraka analizirana je primjenom kvalitativne rendgenske difrakcijske analize (XRD) koristeći Shimadzu XRD-6000 u mjernom rasponu kutova  $10^\circ < 2\theta < 40^\circ$ , brzinom snimanja od  $0,2 \text{ }^\circ/\text{s}$ .

#### **3.5.4. Pretražna elektronska mikroskopija**

Pretražni elektronski mikroskop (SEM) korišten je za snimanje mikrostrukture ispitivanih uzoraka. Korišteni instrument je TESCAN Vega3SEM Easyprobe, a energija elektronskog snopa  $10 \text{ keV}$ . Prije snimanja uzorci su izloženi utjecaju plazme paladija i zlata 120 sekundi.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Gubitak mase uzoraka kitozanskih spužvi tretiranih enzimskom razgradnjom ispitani su gravimetrijskom metodom. Sastav razgrađenih uzoraka analiziran je infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama (FTIR) i kvalitativnom rendgenskom difrakcijskom analizom (XRD). Mikrostruktura poroznih materijala proučavana je pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM).

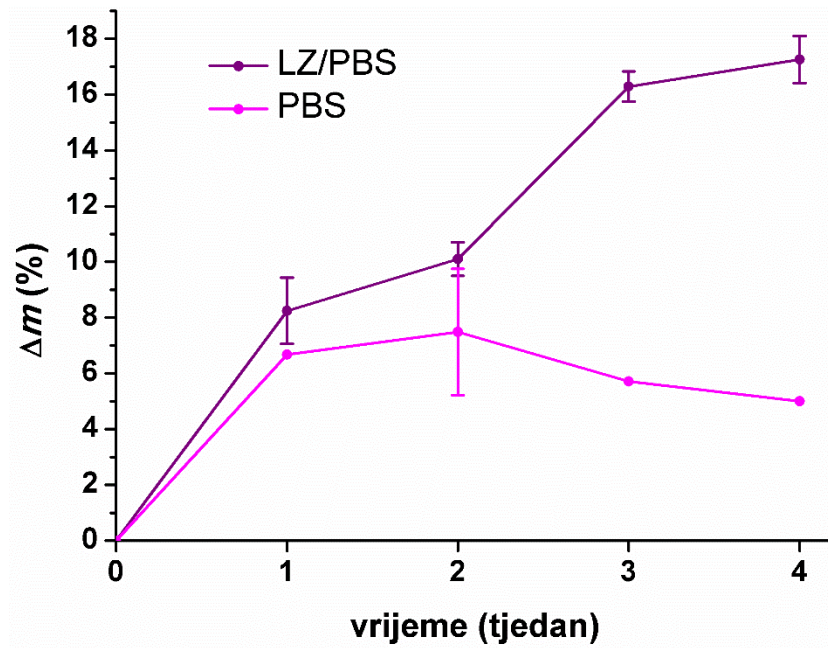
### 4.1. Utjecaj enzimske razgradnje na promjenu mase uzoraka i pH medija

Prema literaturi [27] gubitak mase ispitivanih poroznih struktura ovisi o koncentraciji otopine kitozana s kojom su uzorci pripremljeni, stupnju deacetilacije, raspodjeli molekulskih masa te svojstvima bubrenja kitozana. Budući da je u ovom radu korišten kitozan visokog stupnja deacetilacije 95 – 98 %, za očekivati je da će gubitak mase tijekom razgradnje biti manji s obzirom na manju osjetljivost takvog kitozana na utjecaj lizozima.

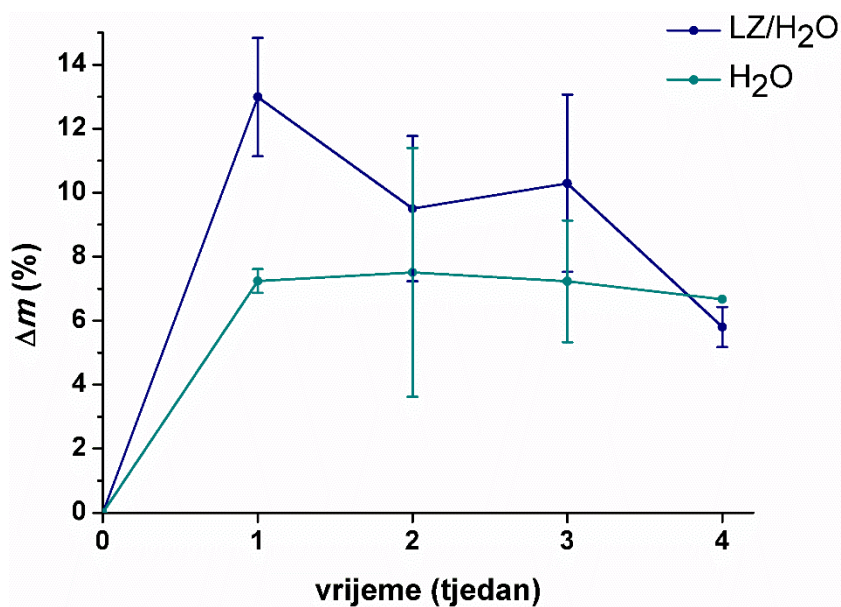
Na slikama 7 i 8 prikazan je gubitak mase u puferskom i vodenom mediju s i bez lizozima, tijekom četiri tjedna inkubacije kitozanskih uzoraka. Gubitak mase CHT-a u otopini LZ/PBS nakon 28 dana iznosio je približno  $17,3 \pm 0,8$  %. Moguće je uočiti dvostupanjsku razgradnju kitozanskih spužvi tijekom enzimskog djelovanja u neutralnom mediju. Enzimska razgradnja odvija se u nekoliko koraka počevši od difuzije enzima do površine kitozana, njegove adsorpcije i kataliziranja reakcije cijepanja glikozidnih veza. Veći pad mase tijekom trećeg tjedna inkubacije može biti posljedica veće difuzije i adsorpcije lizozima pa time i većeg postotka razgradnje kitozanskih makromolekula.

U otopini LZ/H<sub>2</sub>O najveći gubitak mase CHT-a zabilježen je nakon prvog tjedna te je iznosio  $13,0 \pm 1,9$  %, što predstavlja veći pad mase u odnosu na isto vrijeme inkubiranja u puferskoj otopini LZ/PBS ( $8,3 \pm 1,2$  %). Pretpostavlja se da je manji gubitak mase u puferskoj otopini ostvaren uslijed prisutnosti soli koje se zbog ionskog karaktera kitozana mogu taložiti na njegovoj površini. Negativne promjene u masi kitozana u LZ/H<sub>2</sub>O mediju mogu se povezati s aktivnošću lizozima. Prema sigurnosnom tehničkom listu, aktivnost lizozima ovisi o pH vrijednosti medija i to u pH području od 6,0 do 9,0. Prema pH vrijednostima izmjerenih za vodeni medij (slika 9), može se zaključiti o neaktivnosti lizozima. Kao posljedica toga moguće je taloženje enzima unutar kitozanskih uzoraka. Značajna promjena u masi kitozana

nije zabilježena nakon prvotnog gubitka mase (1. tjedan) do posljednjeg vremena inkubacije (4. tjedan). Međutim, potrebno je uzeti u obzir i moguću nehomogenost pripremljenih uzoraka.



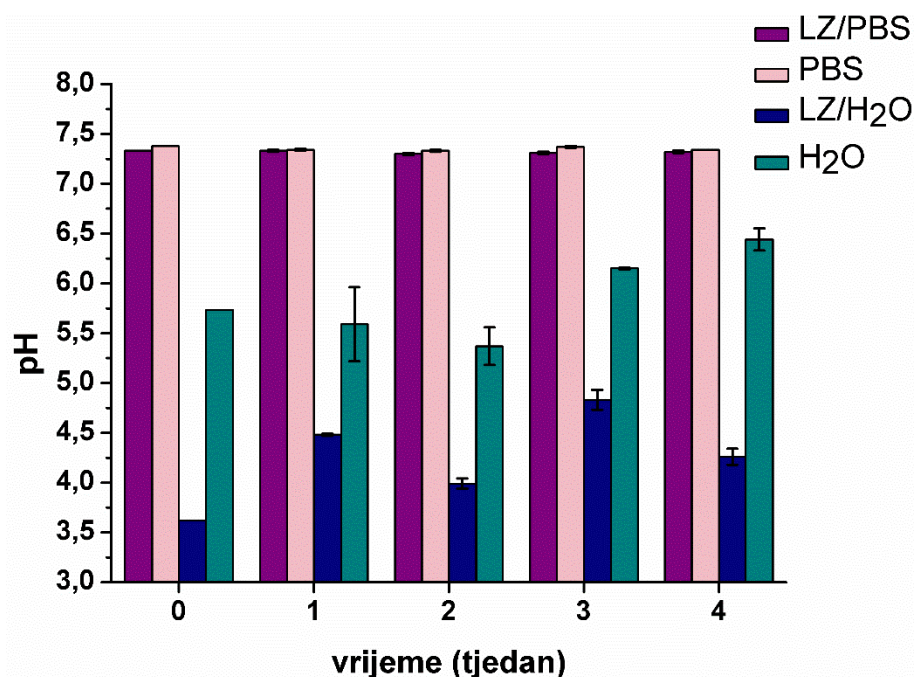
**Slika 7.** Promjena mase kitozanskih uzoraka u otopini LZ/PBS i PBS-a tijekom četiri tjedna.



**Slika 8.** Promjena mase kitozanskih uzoraka u otopini LZ/H<sub>2</sub>O i H<sub>2</sub>O tijekom četiri tjedna.

Kontrolni uzorci inkubirani u puferском i vodenom mediju pokazali su sličan trend gubitka mase. Izmjereni pad mase u oba medija predstavlja pad mase kitozanskih spužvi uzrokovan otapanjem manjih makromolekula kitozana. Iako kontrolni uzorci pokazuju sličan gubitak mase što bi moglo ukazati na jednako otapanje kitozana u oba medija, potrebno je uzeti u obzir efekt taloženja soli pufera koji utječe na konačnu masu uzorka. Mjerenje kontrolnih uzoraka kitozana u puferском i vodenom mediju ukazuje na zbrojni gubitak mase sastavljen od otapanja kitozana koje je prilično konstantno tijekom inkubacije te gubitka mase uslijed djelovanja lizozima.

Prikaz promjene pH vrijednosti medija prije i tijekom enzimske razgradnje dan je na slici 9. Za puferски medij (LZ/PBS i PBS) vidljivo je da nema znatnijih promjena u vrijednostima pH medija, dok u vodenom mediju (LZ/H<sub>2</sub>O) dolazi do određenih oscilacija. pH vrijednost početne vodene otopine lizozima je izrazito niska i iznosi 3,67. Pri tome dolazi do većeg otapanja kitozana što može biti uzrok većem padu mase zabilježenom u prvom tjednu inkubacije u LZ/H<sub>2</sub>O mediju (slika 8). Kako je pH vrijednost kontrolnog medija (H<sub>2</sub>O) viša (pH = 5,73), tako je i gubitak mase u kontrolnom mediju manji u odnosu na vodeni medij s enzimom. Također, uslijed velikog rasipanja vrijednosti gubitka mase u LZ/H<sub>2</sub>O i H<sub>2</sub>O ne može se reći da postoji značajna razlika između enzimskog i kontrolnog medija što ukazuje na neaktivnost lizozima.



**Slika 9.** Promjena pH vrijednosti medija LZ/PBS, PBS, LZ/H<sub>2</sub>O i H<sub>2</sub>O tijekom četiri tjedna.

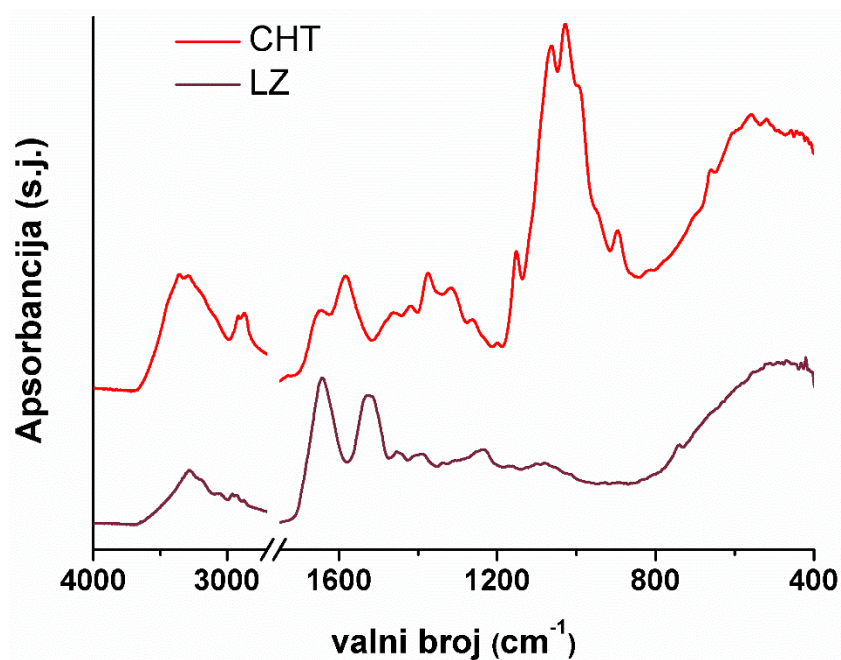
Lizozim se ubraja u proteine koji posjeduju dvije vrste reaktivnih skupina, amino i karboksilne, koje određuju kemijska, fizikalna i biološka svojstva proteina. Prisutnost dodatnih amino skupina kitozana može utjecati na ionizaciju karboksilnih/amino skupina lizozima, tj. na konačnu pH vrijednost otopine što se može pripisati oscilacijama pH vrijednosti LZ/H<sub>2</sub>O medija.

Kako tijekom razgradnje kitozanskih spužvi nisu zabilježene niže pH vrijednosti vodenog medija LZ/H<sub>2</sub>O od početnih, može se smatrati da kitozan ne stvara kiseli mikrookoliš koji u biomedicini može uzrokovati dodatne upalne procese tijekom primjene u ljudskom organizmu. To može potvrditi i povećanje pH vrijednosti kontrolnog vodenog medija tijekom inkubiranja kitozanske spužve.

## **4.2. FTIR spektroskopija**

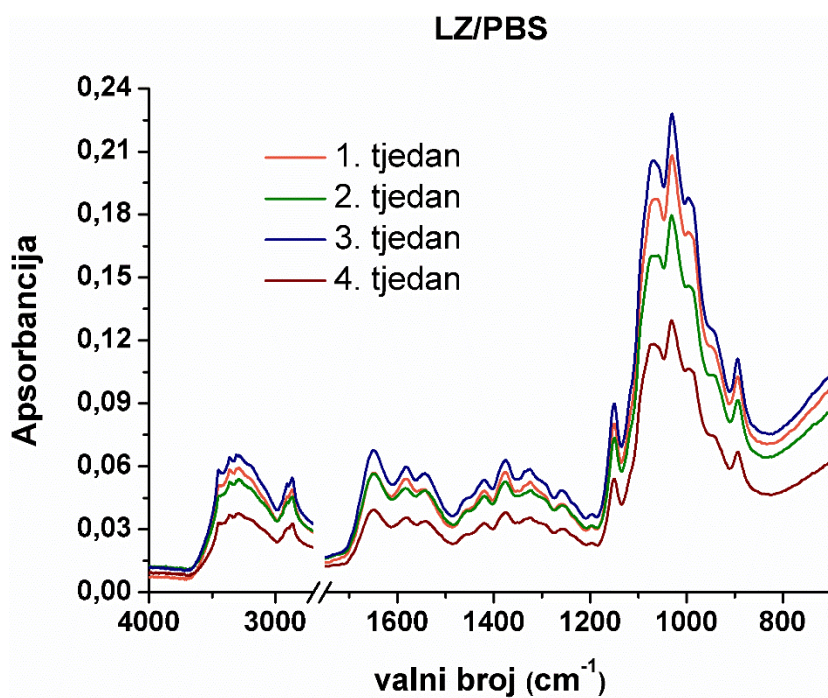
Na slici 10 dani su spektri dobiveni infracrvenom spektroskopskom analizom s Fourierovim transformacijama za kitozan i lizozim. Vidljive vrpce karakteristične za lizozim nalaze se na 1640 cm<sup>-1</sup> i 1525 cm<sup>-1</sup>, a odgovaraju skupinama –C=O (amid I) i –NH<sub>2</sub> (amid II) polipeptidnog lanca.

Za kitozan karakteristične vrpce koje mijenjaju svoje intenzitete ovisno o stupnju deacetilacije odgovaraju istežanju karbonilne skupine (amid I) i savijanju NH (amid II), a nalaze se na 1644 cm<sup>-1</sup> i 1583 cm<sup>-1</sup>. Budući da je vrpca na 1583 cm<sup>-1</sup> uža, to upućuje na kitozan visokog stupnja deacetilacije. Vrpca od 3359 cm<sup>-1</sup> do 3290 cm<sup>-1</sup> odgovara preklapanju vrpce amino (–NH<sub>2</sub>) i hidroksilne (–OH) skupine uslijed vibracijskog istežanja. Valni brojevi 2917 cm<sup>-1</sup> i 2869 cm<sup>-1</sup> odgovaraju simetričnom i asimetričnom istežanju –CH, –CH<sub>2</sub>OH te –CH<sub>3</sub> skupina prstena. Vrpce na 1420 cm<sup>-1</sup> i 1374 cm<sup>-1</sup> pripadaju skupinama C–N i –CH<sub>3</sub> iz acetilne skupine. Tri istežanja –CO skupina nalaze se na valnim brojevima 1151, 1063 i 1028 cm<sup>-1</sup>. Intenzitet prve vrpce pripada asimetričnom istežanju veze koju čini kisikov atom iz mosta i ugljikov iz prstena. Vrpce u području valnih brojeva od 1063 cm<sup>-1</sup> do 1028 cm<sup>-1</sup> pripadaju skupinama –COH, –COC i –CH<sub>2</sub>OH [39,40].



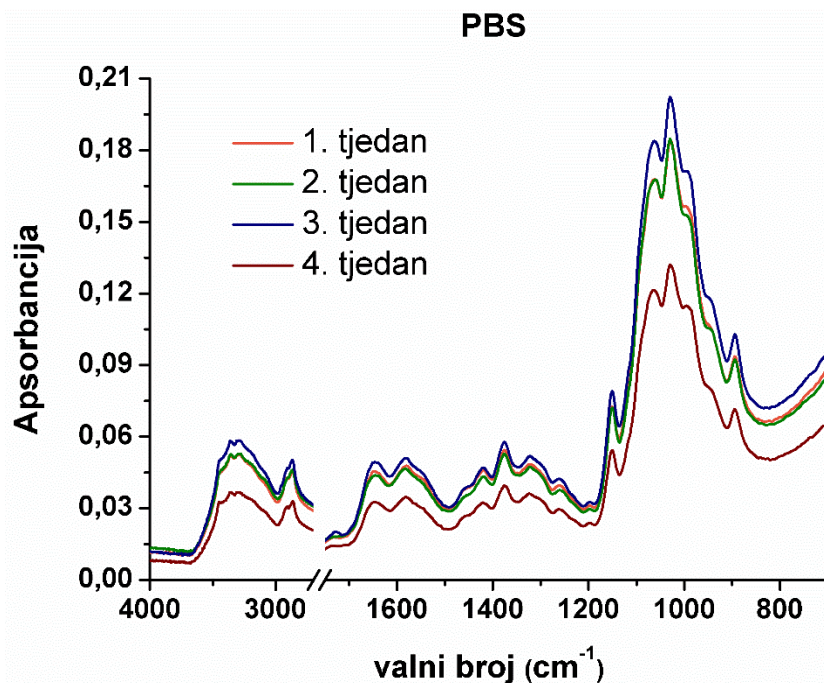
**Slika 10.** FTIR spektri kitozanske spužve (CHT) i lizozima (LZ).

Na slikama 11 – 14 dani su FTIR spektri za uzorke kitozana nakon razgradnje tijekom četiri tjedna inkubacije u puferskom i vodenom mediju te FTIR spektri kontrolnih uzoraka.



**Slika 11.** FTIR spektri uzoraka CHT-a u otopini LZ/PBS tijekom četiri tjedna inkubacije.



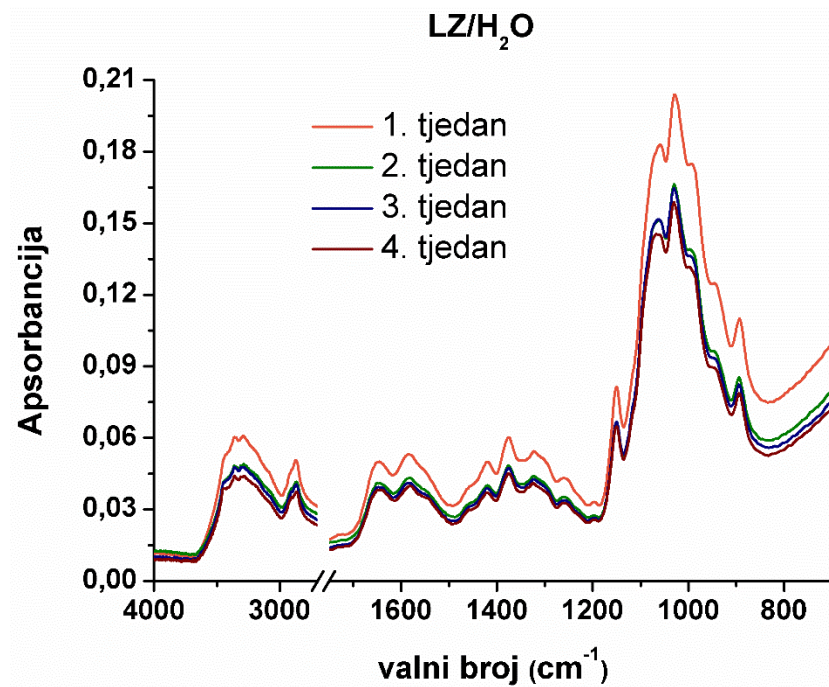


**Slika 12.** FTIR spektri uzoraka CHT-a u otopini PBS-a tijekom četiri tjedna inkubacije.

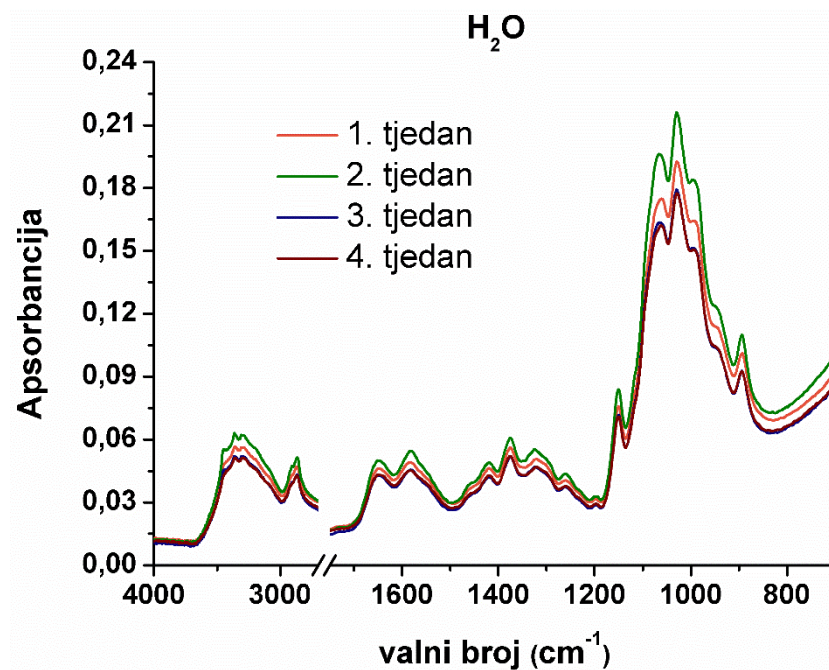
Analiza spektara kitozanskih spužvi tretiranih u LZ/PBS mediju u odnosu na kontrolni PBS (slika 11 i 12) ukazuje na zanimljiv rezultat zaostataka lizozima, što u malo kojem istraživačkom radu je analizirano i zabilježeno. Da bi se enzimsko cijepanje kitozana ostvarilo, lizozim se treba adsorbirati na površinu kitozana na odgovarajućem specifičnom mjestu glikozidne veze. Zaostatak lizozima potvrđuje uspješnu enzimsku razgradnju kitozana. Iako su uzorci nakon razgradnje podvrgnuti „freeze-extraction“ postupku ispiranja zaostataka enzima i puferskih soli, FTIR analiza potvrđuje njegov zaostatak što bi moglo ukazivati i na jače elektrostatske interakcije između specifičnih skupina lizozima i kitozana. S obzirom na zaostatak lizozima, gubitak mase tijekom *in vitro* razgradnje ne ovisi samo o količini otopljenog kitozana već i o udjelu zaostalog enzima.

Uzorci kitozana podvrgnuti enzimskoj razgradnji u vodenom mediju (slika 13) ne pokazuju promjene u FTIR spektrima u odnosu na kontrolne uzorke inkubirane u puferskom i vodenom mediju. Izostanak adsorbiranog lizozima je u skladu s gravimetrijskim rezultatima gubitka mase.





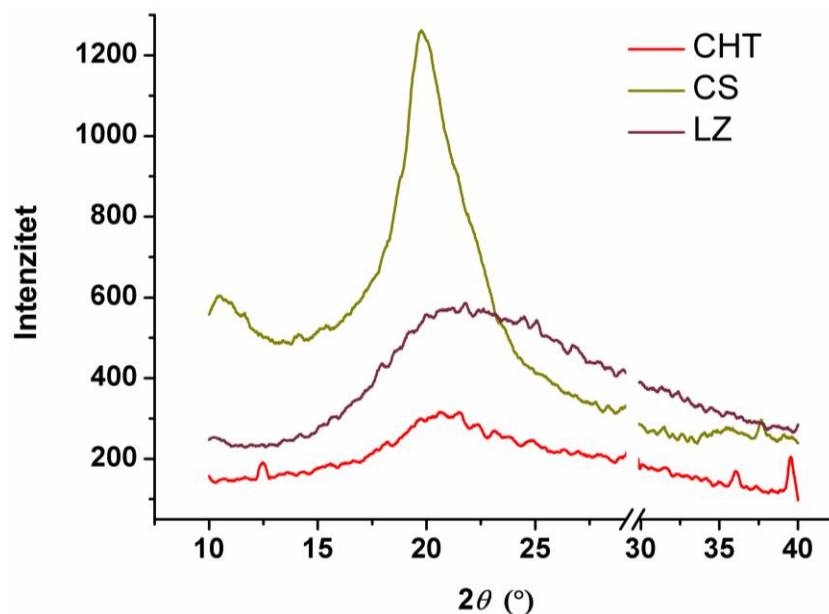
**Slika 13.** FTIR spektri uzoraka CHT-a u otopini LZ/H<sub>2</sub>O tijekom četiri tjedna inkubacije.



**Slika 14.** FTIR spektri uzoraka CHT-a u H<sub>2</sub>O tijekom četiri tjedna inkubacije.

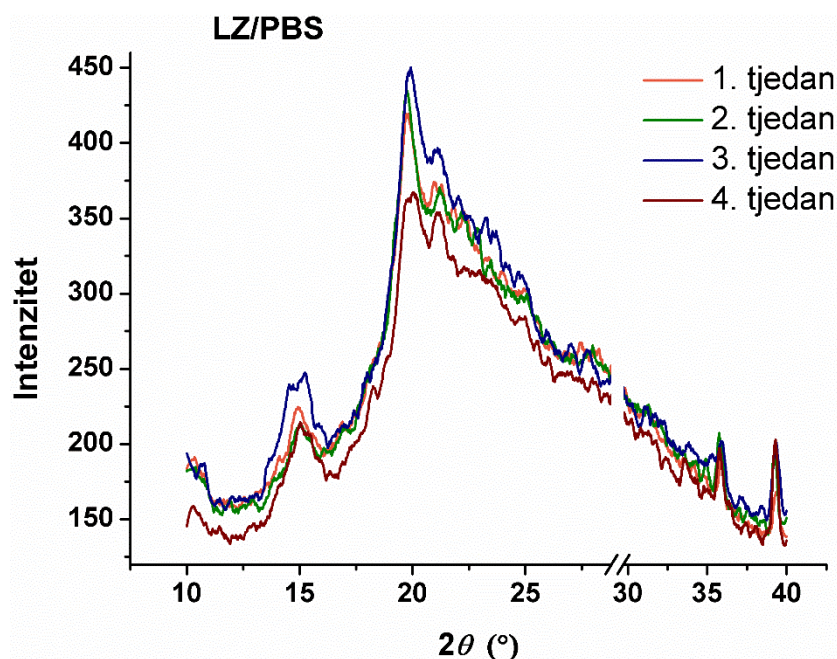
### 4.3. Rendgenska difrakcijska analiza

Utjecaj enzimske razgradnje na kristalnost kitozanskih spužvi procijenjen je rendgenskom difrakcijskom analizom. Na slici 15 dani su difrakcijski spektri netretirane kitozanske spužve (CHT), praha kitozana (CS) te praha lizozima (LZ). Karakteristični široki maksimum kitozanske spužve vidljiv je u području kuteva  $20^\circ < 2\theta < 25^\circ$  pri čemu je vidljiva niska kristalnost reprecipitiranog kitozana „freeze-gelation“ metodom stvaranja porozne strukture. Čisti prah lizozima također pokazuje jedan karakteristični maksimum u području kuteva kao i kitozan, na  $2\theta = 21^\circ$ . Pri snimanju XRD spektra kitozana zabilježeni su maksimumi nosača uzorka ( $2\theta = 12,5, 36,0$  i  $39,5^\circ$ ).

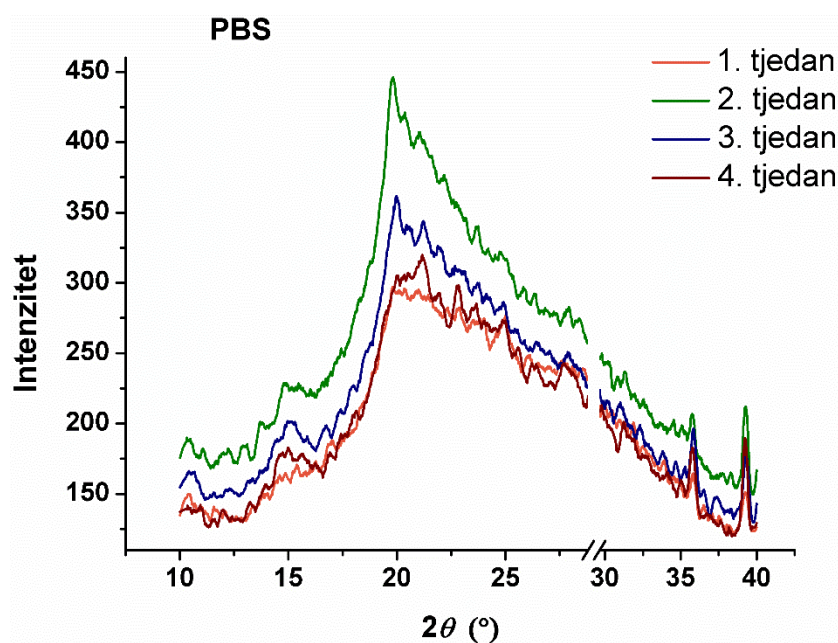


**Slika 15.** XRD spektar kitozanske spužve (CHT) i lizozima (LZ).

Indikacije promjena u kristalnosti ispitivanih uzoraka tijekom enzimske razgradnje te u kontrolnim medijima prikazane su na slikama 16 – 19. Šumovitost spektara uzrokovana je visokom poroznošću uzoraka. Uzorci podvrgnuti enzimskom i kontrolnom mediju pokazuju novi difrakcijski maksimum na  $2\theta \approx 15^\circ$  koji odgovara polimorfu anhidrida kitozana nastao tijekom dehidracije uzorka „freeze-extraction“ ispiranjem. Pokazano je [41] da kitozanske soli tipa II (nastale djelovanjem alkalijских i zemnoalkalijских metala) podliježu spontanom uklanjanju vode tijekom uranjanja u smjesu alkohol-voda pri čemu se odvija transformacija polimorfa.



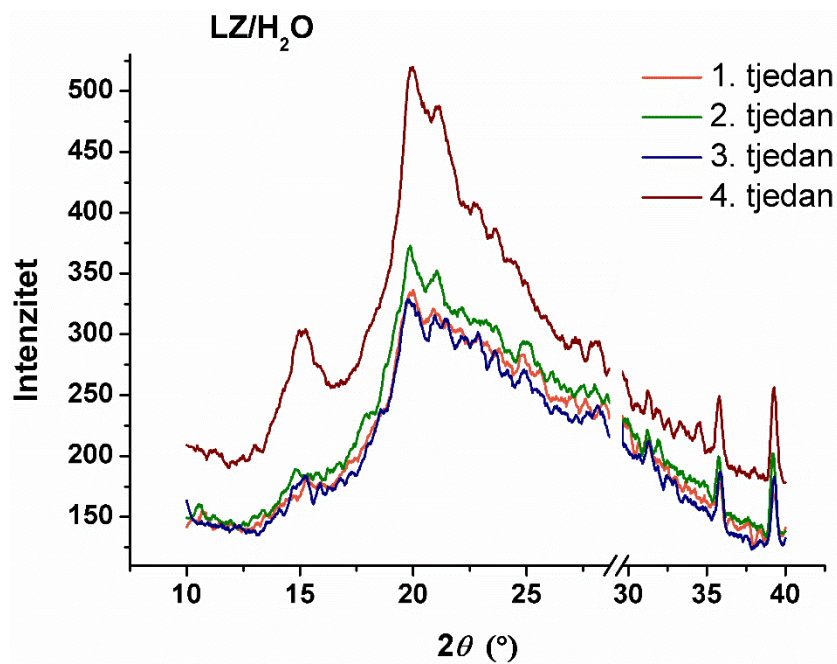
**Slika 16.** XRD spektri CHT-a u otopini LZ/PBS tijekom četiri tjedna inkubacije.



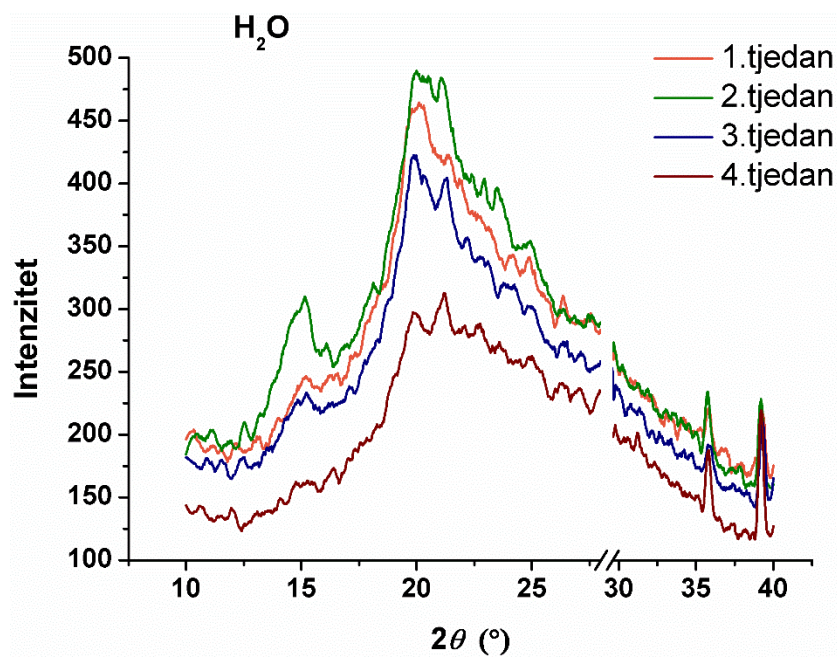
**Slika 17.** XRD spektri CHT-a u otopini PBS-a tijekom četiri tjedna inkubacije.

Svi ispitani uzorci pokazuju suženje širokog maksimuma kitozana i njegovog pomaka prema manjim difrakcijskim kutevima ( $2\theta \approx 19,7^\circ$ ). Enzimska razgradnja kitozana započinje cijepanjem amorfnih dijelova na manje degradacijske produkte (oligomere) koji difundiraju iz polimernog hidrogela u okolni medij te se u konačnici otapaju. Uređene strukture (lamelle)

semikristalnog kitozana pri tome ostaju netaknute. Pretpostavlja se da je suženje difrakcijskog maksimuma posljedica enzimske razgradnje i otapanja kitozana tijekom inkubacije.



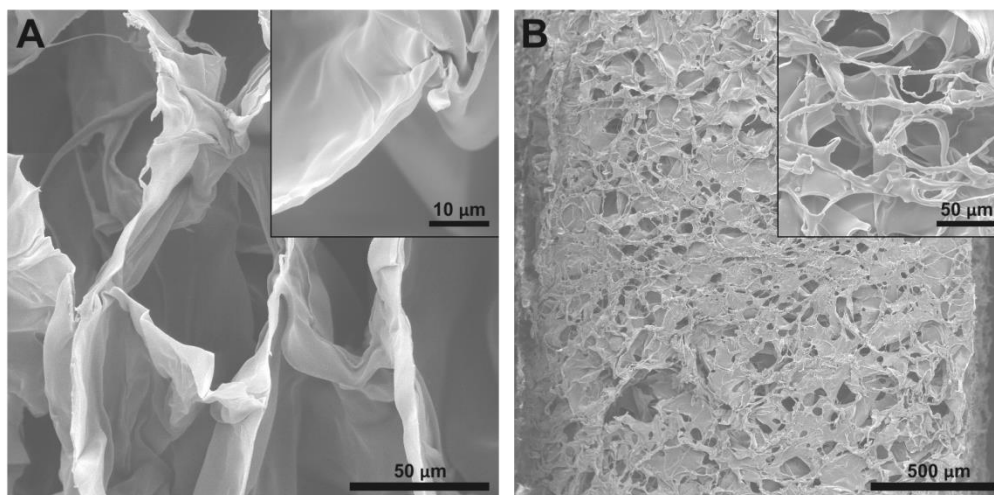
**Slika 18.** XRD spektri CHT-a u otopini LZ/H<sub>2</sub>O tijekom četiri tjedna inkubacije.



**Slika 19.** XRD spektri CHT-a u H<sub>2</sub>O tijekom četiri tjedna inkubacije.

#### 4.4. Pretražna elektronska mikroskopija

Utjecaj enzimske razgradnje na mikrostrukturu poroznih spužvi istražen je elektronskom mikroskopijom. Morfologija površine i poprečnog presjeka porozne strukture netretiranog kitozana prikazana je na slici 20. Uočena je visoka poroznost spužve, ali i nehomogenost površine početnog CHT uzorka.



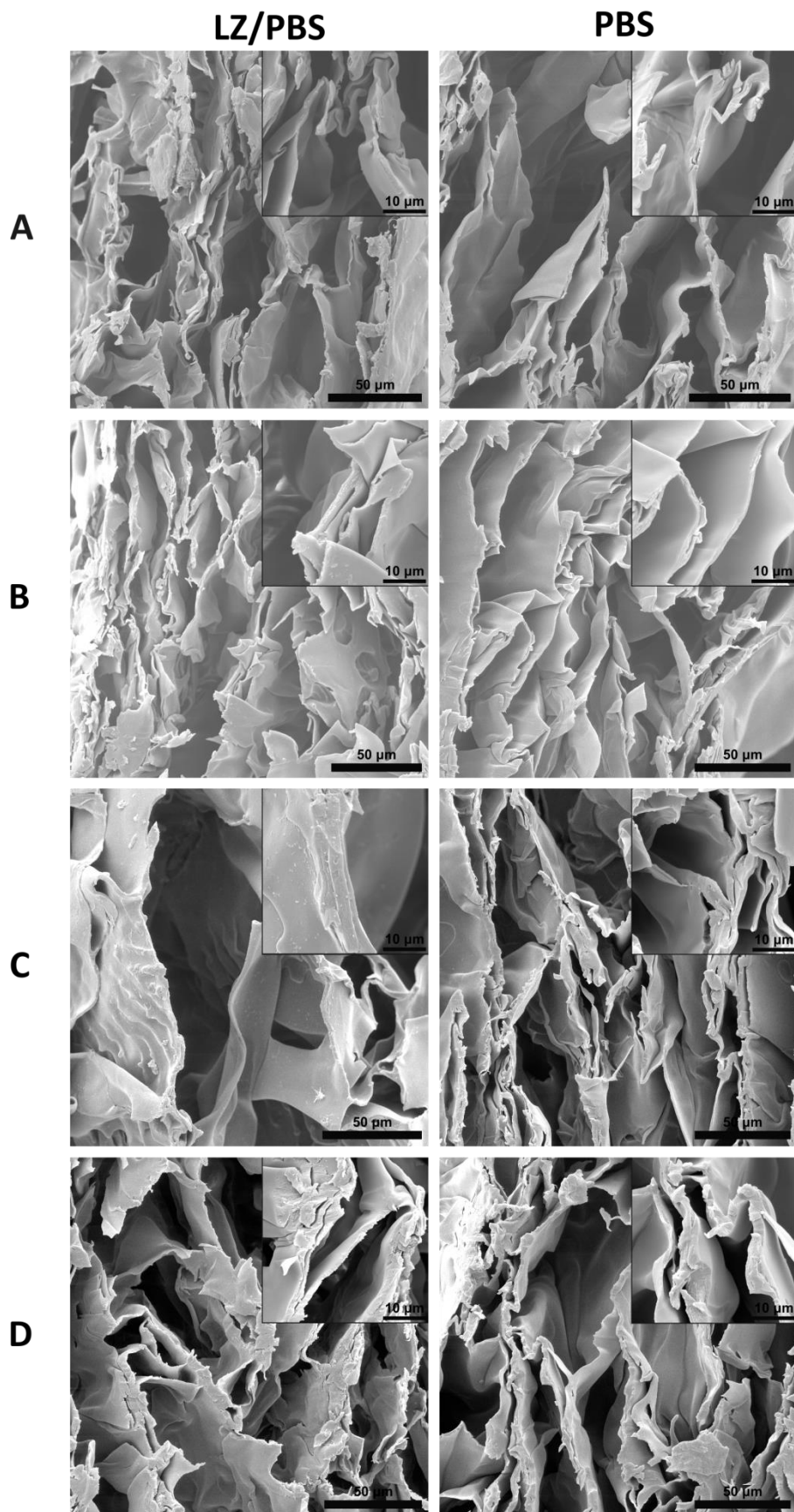
**Slika 20.** Mikrostruktura kitozanskih spužvi (CHT) pri različitim uvećanjima: (A) presjek i (B) površina.

Na slikama 21 – 24 prikazane su površine i presjeci kitozanskih spužvi podvrgnutih enzimskoj razgradnji tijekom četiri tjedna inkubacije u odnosu na kontrolne uzorke u puferskom i vodenom mediju.

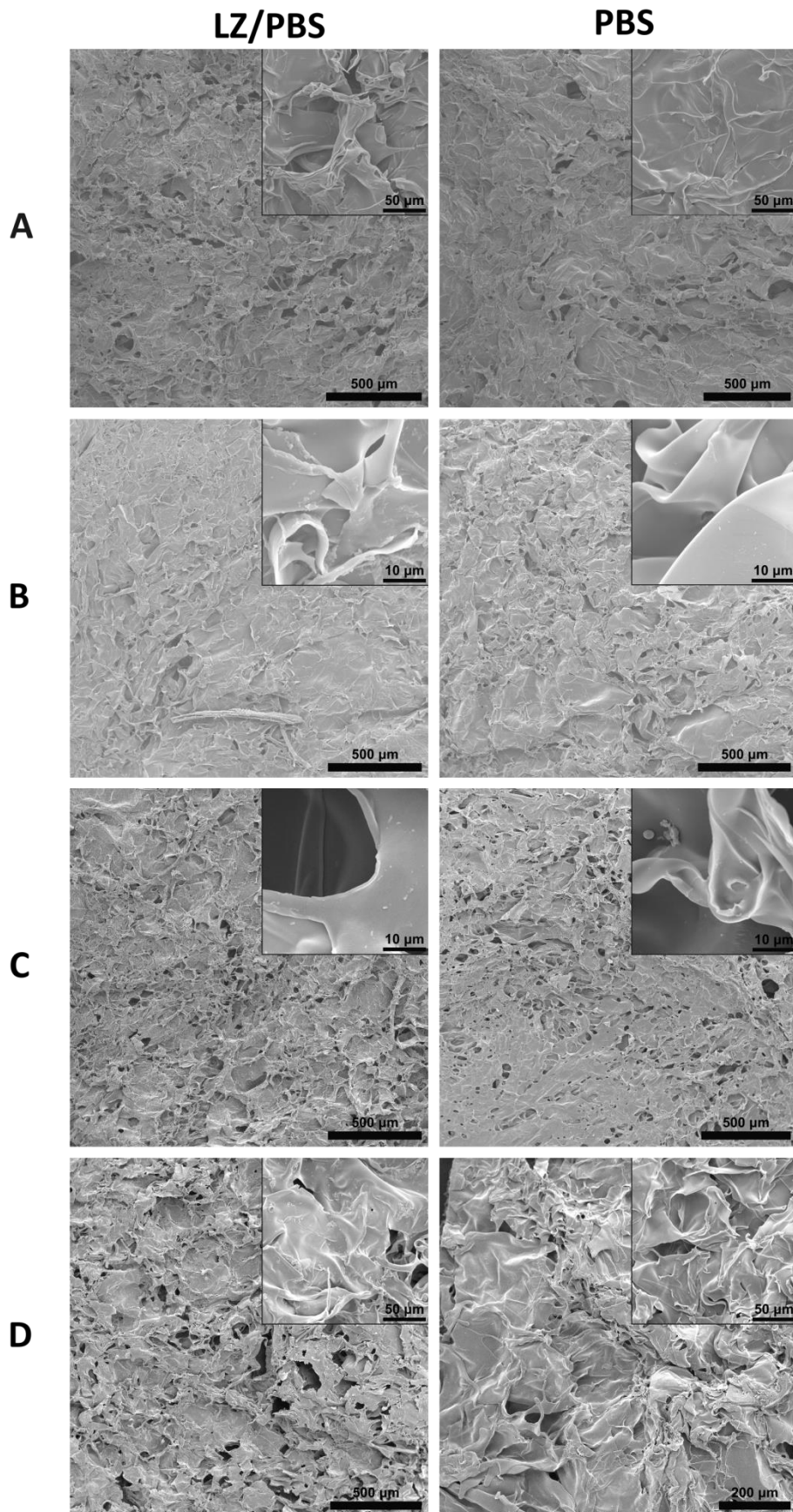
Djelovanje lizozima vidljivo je tijekom inkubacije uzoraka u LZ/PBS mediju (slika 21 i 22). Na površini CHT spužvi dolazi do nakupljanja razgrađenih dijelova polimera i zaostalog enzima. Nakon četvrtog tjedna vidljiv je i nastanak većih pora u strukturi. Na kontrolnim uzorcima u PBS-u dolazi do „sljepljivanja“ pora na površini uzorka te smanjenja poroznosti uslijed otapanja CHT-a i taloženja soli, ali nema vidljivog taloženja razgrađenog materijala.

SEM mikrografije presjeka kitozanskih spužvi uronjenih u vodenom mediju s i bez lizozima (slika 23 i 24) ne pokazuju značajne razlike u mikrostrukturi tijekom inkubacije. Međutim, površina uzoraka ukazuje na povećanje poroznosti CHT-a u LZ/H<sub>2</sub>O zbog otapanja uzrokovanog nižom pH vrijednosti medija. Također, vidljiva je nehomogenost spužvi.

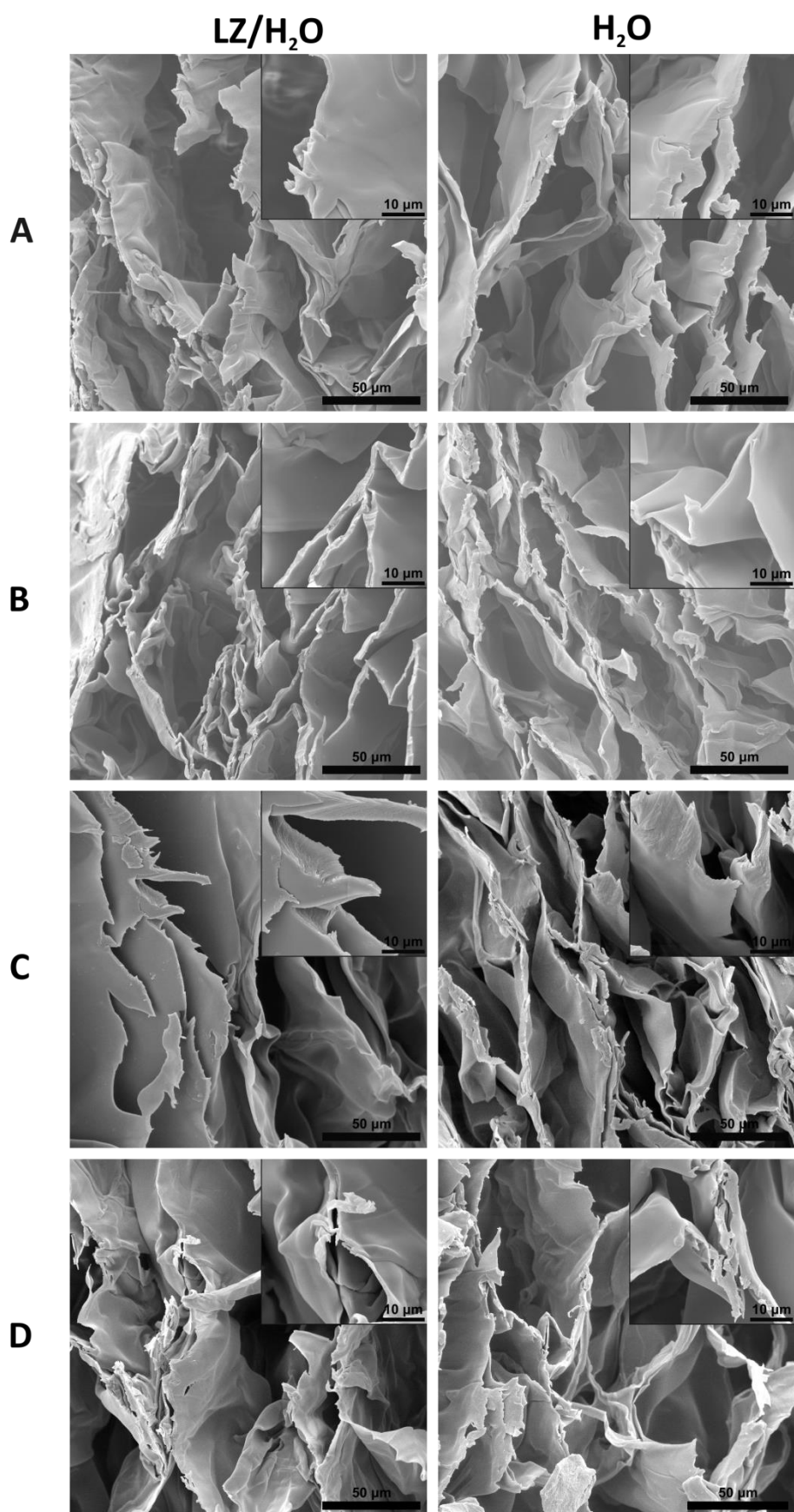




**Slika 21.** Presjek kitozanskih spužvi u LZ/PBS i PBS snimljen pomoću SEM-a nakon (A) 1. tjedna, (B) 2. tjedna, (C) 3. tjedna i (D) 4. tjedna razgradnje.

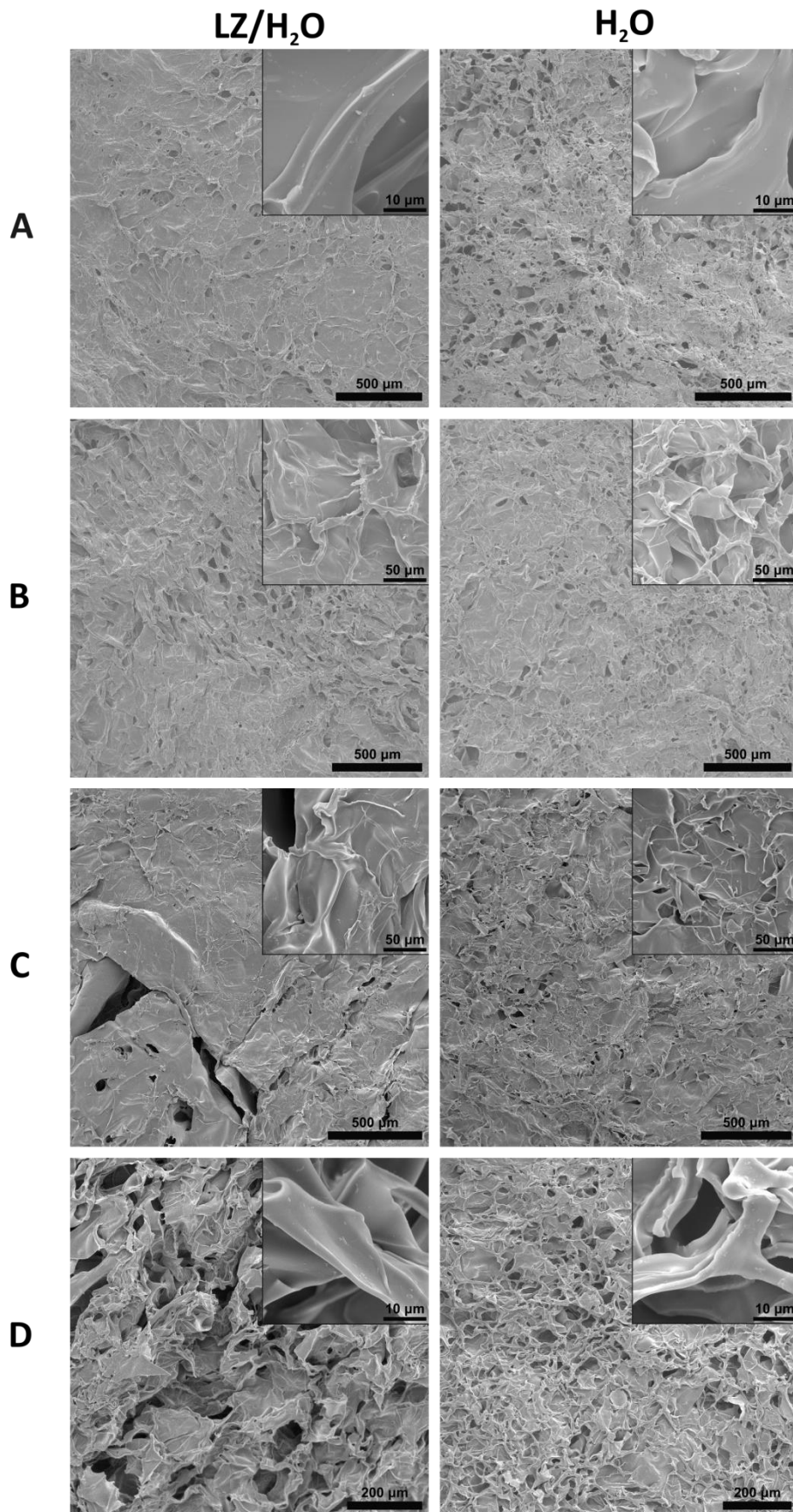


**Slika 22.** Površina kitozanskih spužvi u LZ/PBS i PBS snimljena pomoću SEM-a nakon (A) 1. tjedna, (B) 2. tjedna, (C) 3. tjedna i (D) 4. tjedna razgradnje.



**Slika 23.** Presjek kitozanskih spužvi u LZ/H<sub>2</sub>O i H<sub>2</sub>O snimljen pomoću SEM-a nakon (A) 1. tjedna, (B) 2. tjedna, (C) 3. tjedna i (D) 4. tjedna razgradnje.





**Slika 24.** Površina kitozanskih spužvi u LZ/H<sub>2</sub>O i H<sub>2</sub>O snimljena pomoću SEM-a nakon (A) 1. tjedna, (B) 2. tjedna, (C) 3. tjedna i (D) 4. tjedna razgradnje.

## 5. ZAKLJUČAK

Prirodni polimeri sve se više koriste u biomedicinske primjene zahvaljujući njihovoj biokompatibilnosti i biorazgradivosti. Zbog tih svojstava provode se mnoga istraživanja u svrhu ispitivanja i poboljšanja istih. Tako je u ovom radu praćena razgradnja kitozana, prirodnog polimera dobivenog deacetiliranjem hitina, uz enzim lizozim tijekom četiri tjedna pri fiziološkim uvjetima. Cilj rada bio je istražiti utjecaj enzimske razgradnje na strukturu, poroznost i morfologiju ispitivanih uzoraka kitozana.

Rezultati enzimske razgradnje kitozana dobiveni gravimetrijskom metodom ukazuju na gubitak mase u puferskom mediju (LZ/PBS) uslijed djelovanja enzima, odnosno u vodenom mediju (LZ/H<sub>2</sub>O) uslijed otapanja. Utvrđena je neaktivnost lizozima u vodenom mediju, što dosada nije prikazano u drugim studijama.

Dobiveni FTIR spektri ukazuju na prisutnost lizozima na kitozanskim spužvama nakon postupka ispiranja uzoraka „*freeze-extraction*“ metodom. Postojanje međusobnih interakcija lizozima i kitozana utječu na konačni gubitak mase kitozanskih spužvi nakon enzimske razgradnje.

Provedena XRD analiza pokazala je suženje karakterističnog difrakcijskog maksimuma kitozana što bi moglo upućivati na promjenu kristalnosti početnog uzorka, no potrebna su dodatna istraživanja stupnja kristalnosti kitozana nakon enzimske razgradnje.

SEM mikrografije kitozanskih spužvi nakon enzimske razgradnje prikazuju promjenu mikrostrukture početnog kitozanskog uzorka. Također, utvrđeno je smanjenje poroznosti površine uslijed sljepljivanja materijala.

## 6. POPIS SIMBOLA

PCL	polikaprolakton
$\epsilon$ -CL	$\epsilon$ -kaprolakton
PHB	polihidroksibutirat
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
FDA	Agencija za hranu i lijekove (engl. <i>Food and drug administration</i> )
LZ	lizozim
NAG	<i>N</i> -acetilglukozamin
NAM	<i>N</i> -acetilmuraminska kiselina
CHT	kitozan
CS	prah kitozana
$M_w$	maseni prosjek molekulskih masa
DD	stupanj deacetilacije (engl. <i>degree of deacetylation</i> )
MCCh	mikrokristalični kitozan (engl. <i>microcrystalline chitosan</i> )
H <sub>2</sub> O	deionizirana voda (vodeni medij)
PBS	fosfatom puferirana otopina soli (engl. <i>phosphate-buffered saline</i> )
LZ/PBS	otopina lizozima u puferskom mediju
LZ/H <sub>2</sub> O	otopina lizozima u vodenom mediju
$\Delta m$	gubitak mase [%]
FTIR	infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama
XRD	kvalitativna rendgenska difrakcijska analiza (engl. <i>X-ray diffraction analysis</i> )
SEM	pretražni elektronski mikroskop (engl. <i>scanning electron microscopy</i> )

## 7. LITERATURA

- [1] Nair, L. S., Laurencin, C. T., Biodegradable polymers as biomaterials, *Progress in Polymer Science* **32** (2007) 762-798.
- [2] Tathe, A., Ghodke, M., Nikalje, A. P., A brief review: Biomaterials and their application, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2** (2010) 19-23.
- [3] Banerjee, A., Chatterjee, K., Madras, G., Enzymatic degradation of polymers: a brief review, *Materials Sciences and Technology* **5** (2014) 567-573.
- [4] Li, S., Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acid, *Journal of Biomedical Materials Research* **48** (1999) 342-353.
- [5] Lloyd, A. W., Interfacial bioengineering to enhance surface biocompatibility, *Medical Device Technologies* **13** (2002) 18-21.
- [6] Ebewele, R. O., Polymer science and technology, CRC Press, New York, 2000., str. 30-31.; 47.; 20.
- [7] Kawai, F., The biochemistry and molecular biology of xenobiotic polymer degradation by microorganisms, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **74** (2010) 1743-1759.
- [8] Nagata, M., Nakae, M., Synthesis, characterization, and *in vitro* degradation of thermotropic polyesters and copolyesters based on terephthalic acid, 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid, and glycols, *Journal of Polymer Science* **39** (2001) 3043-3051.
- [9] Kobayashi, S., Uyama, H., Takamoto, T., Lipase-catalyzed degradation of polyesters in organic solvents. A new methodology of polymer recycling using enzyme as catalyst, *Biomacromolecules* **1** (2000) 3-5.
- [10] Labet, M., Thielemans, W., Synthesis of polycaprolactone: a review, *Chemical Society Reviews* **38** (2009) 3484-3504.
- [11] Barbier-Baudry, D., Brachais, L, Cretu, A., Gattin, R., Loupy, A., Stuerger, D., Synthesis of polycaprolactone by microwave irradiation – an interesting route to synthesize this polymer via green chemistry, *Environmental Chemistry Letters* **1** (2003) 19-23.
- [12] Sinha, V.R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., Trehan, A., Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview, *FS Journal of Pharmacy Research* **2** (2012) 38-45.

- [13] Chiari, C., Koller, U., Dorotka, R., Eder, C., Plasenzotti, R., Lang, S., et al., A tissue engineering approach to meniscus regeneration in a sheep model, *Osteoarthritis and Cartilage* **14** (2006) 1056-65.
- [14] Abedalwafa, M., Wang, F., Wang L., Li, Ch., Biodegradable poly-ε-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: a review, *Reviews on Advanced Materials Science* **34** (2013) 123-140.
- [15] Azevedo H. S., Peis, R. L., Understanding the enzymatic degradation of biodegradable polymers and strategies to control their degradation rate, u: Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine, USA, CRC Press, 12 (2005) 177-201.
- [16] Šubarić, D., Babić, J., Ačkar, Đ., Modificiranje škroba radi proširenja primjene, *Radovi Zavoda za znanstveni i umjetnički rad u Požegi*, **1** (2012) 247-258.
- [17] <https://en.wikipedia.org/wiki/Cellulose#Hemicellulose> (pristup 31. kolovoza 2016.)
- [18] Solomons, T. W. G., Fryhle, C. B., Organic chemistry, John Wiley & Sons, Inc., USA, 2009., str. 1085.; 1094.; 1116-1119.
- [19] Ma, L., Gao, C., Mao, Z., Zhou, J., Shen, J., Hu, X., Han, C., Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering, *Biomaterials* **24** (2003) 4833-4841.
- [20] Geiger, M., Li, R. H., Friess, W., Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2, *Advanced Drug Delivery Reviews* **55** (2003) 1613-1629.
- [21] Chen, J.-P., Chang, G.-Y., Chen, J.-K., Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects* **313-314** (2008) 183-188.
- [22] Wang, X. H., Li, D. P., Wang, W. J., Feng, Q. L., Cui, F. Z., Xu, Y. X., Song, X. H., van der Werf, M., Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers, *Biomaterials* **24** (2003) 3213-3220.
- [23] Olde Damink, L. H. H., Dijkstra, P J., van Luyn, M. J. A., van Wachem, P. B., Nieuwenhuis, P., Feijen, J., In vitro degradation of dermal sheep collagen cross-linked using a watersoluble carbodiimide, *Biomaterials* **17** (1996) 679-664.
- [24] Lazarus, G. S., Daniels, J. R., Brown, R. S., Bladen, H. A., Fullmer, H. M., Degradation of collagen by a human granulocyte collagenolytic system, *The Journal of Clinical Investigation* **47** (1968) 2622-2629.
- [25] Rinaudo, M., Chitin and chitosan: Properties and applications, *Progress in Polymer Science* **31** (2006) 603-632.

- [26] Ratajska, M., Wisniewska-Wrona, M., Strobin, G., Struszczyk, H., Boryniec, S., Ciechanska, D., Studies on the Biodegradation of Microcrystalline Chitosan in Aqueous Medium, *Fibres & Textiles* **1** (2003) 59-63.
- [27] Yang, B., Li, X., Shi, S., Kong, X., Guo, G., Huang, M., Luo, F., Wei, Y., Zhao, X., Qian, Z., Preparation and characterization of a novel chitosan scaffolds, *Carbohydrate Polymers* **80** (2010) 860-865.
- [28] Tomihata, K., Ikada, Y., *In vitro* and *in vivo* degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives, *Biomaterials* **18** (1997) 567-575.
- [29] Wisniewska-Wrona, M., Niekraszewicz, A., Ciechanska, D., Pospieszny, H., Orlikowski, L. B., Biological properties of chitosan degradation products, *Polish Chitin Society* **12** (2007) 149-156.
- [30] Muzzarelli, R. A. A., Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone, *Carbohydrate Polymers* **76** (2009) 167-182.
- [31] Kean, T., Thanou, M., Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan, *Advanced Drug Delivery Reviews* **62** (2010) 3-11.
- [32] Wedmore, I., McManus, J. G., Pusateri, A. E., Holcomb, J. B., A Special Report on the Chitosan-based Hemostatic Dressing: Experience in Current Combat Operations, *The Journal of Trauma, Injury, Infection, and Critical Care* **3** (2006) 655-658.
- [33] Zhu, J.-H., Wang, X.-W., Ng, S., Quek, C.-H., Ho, H.-T., Lao, X.-J., Yu, H., Encapsulating live cell with water-soluble chitosan in physiological conditions, *Journal of Biotechnology* **117** (2005) 355-365.
- [34] Rinaudo, M., Pavlov, G. Desbrieres, J., Solubilization of chitosan in strong acid medium, *International Journal of Polymer Analysis and Characterization* **5** (1999) 267-276.
- [35] Correa, J. U., Elango, N., Polacheck, I., Cabib, E., Endochitinase, a Mannan-associated Enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*, *The Journal of Biological Chemistry* **3** (1982) 1392-1397.
- [36] Sigma-Aldrich, Inc., Product Information: Lysozyme from chicken egg white, Catalog No. **L6876**
- [37] <https://en.wikipedia.org/wiki/Lysozyme> (pristup 10. kolovoza 2016.)
- [38] Han, T., Nwe, N., Furuike, T., Tokura, S., Tamura, H., Methods of *N*-acetylated chitosan scaffolds and its *in vitro* biodegradation by lysozyme, *Journal Biomedical Science and Engineering* **5** (2012) 15-23.
- [39] Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., Zou, X., Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles, *Carbohydrate Research* **339** (2004) 2693-2700.

- [40] Duarte, M. L., Ferreira, M. C., Marvao, M., R., Rocha, J., An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy, *International Journal of Biological Macromolecules* **31** (2002) 1-8.
- [41] Harish Prashanth, K.V., Kittue, F.S., Tharanathan, R.N. Solid state structure of chitosan prepared under different *N*-deacetylating conditions, *Carbohydrate Polymers* **50** (2002) 27-33.