

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Matea D. Korica

**DOBIJANJE BIOAKTIVNIH
NANOSTRUKTURNIH MATERIJALA NA BAZI
CELULOZE I HITOZANA**

doktorska disertacija

Beograd, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Matea D. Korica

**OBTAINING OF BIOACTIVE
NANOSTRUCTURED MATERIALS BASED ON
CELLULOSE AND CHITOSAN**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020.

Mentor:

dr. Mirjana Kostić, red. prof.

Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Članovi komisije:

dr. Kovička Asanović, van. prof.

Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

dr. Biljana Dojčinović, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju,

Institut od nacionalnog značaja

dr. Katarina Mihajlovska, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Datum odbrane: _____

Doktorska disertacija urađena je u laboratorijama Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu, Hemijskog fakulteta u Beogradu, Univerziteta za tehnologiju u Gracu, Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju u Beogradu, i Instituta za inženjerstvo i dizajn materijala Mašinskog fakulteta u Mariboru. Rad na doktorskoj disertaciji proistekao je iz rada na projektu osnovnih istraživanja pod nazivom „Funkcionalizacija, karakterizacija i primena celuloze i derivata celuloze“ i rada na projektu bilateralne saradnje sa Republikom Slovenijom pod nazivom "Dobijanje antimikrobnih vlakana permanentnim vezivanjem polisaharida na oksidisana celulozna vlakna" finansiranih od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, kao i studijskih boravaka na Institutu za inženjerstvo i dizajn materijala Mašinskog fakulteta u Mariboru stipendiranih od strane Srednjeevropskog programa razmene za univerzitetske studije (Central European Exchange Programme for University Studies).

Posebno se zahvaljujem mentorima, dr Mirjani Kostić, red. prof. Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu, i dr Zdenki Peršin, doc. Mašinskog fakulteta u Mariboru, na ukazanom poverenju, podršci, stručnim savetima, idejama i pomoći tokom svih faza izrade ove doktorske disertacije i mog sveobuhvatnog naučno-istraživačkog usavršavanja. Prof. Kostić veliko hvala na šansi koju mi je pružila odabравši me za svog doktoranta i saradnika na projektu „Funkcionalizacija, karakterizacija i primena celuloze i derivata celuloze“ čime mi je otvorila vrata sveta nauke i usmerila moj profesionalni život u pravcu koji smatram privilegijom. Na žalost dr Peršin nije mogla ostati do samog kraja izrade ove disertacije jer više nije zaposlena na Mašinskom fakultetu Univerziteta u Mariboru.

Zahvaljujem se dr Lidiji Fras Zemljič, prof. Mašinskog fakulteta u Mariboru na podršci, stručnim savetima, idejama i pomoći tokom faza izrade doktorske disertacije realizovanih u okviru studijskih boravaka na Institutu za inženjerstvo i dizajn materijala Mašinskog fakulteta u Mariboru.

Zahvaljujem se dr Koviljki Asanović, van. prof. Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu, na stručnim savetima prilikom finalizacije doktorske disertacije i učešću u Komisiji.

Zahvaljujem se dr Katarini Mihajlovski, naučnom saradniku Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu, na stručnoj pomoći prilikom analiza antimikrobnosti, savetima prilikom finalizacije doktorske disertacije i učešću u Komisiji.

Zahvaljujem se dr Biljani Dojčinović, naučnom savetniku Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju u Beogradu, na stručnoj pomoći prilikom analiza ICP-OES, savetima prilikom finalizacije doktorske disertacije i učešću u Komisiji.

Zahvaljujem se na stručnoj pomoći prilikom analiza dr Snežani Trifunović, naučnom saradniku Hemijskog fakulteta u Beogradu (elementalna analiza), dr Tanji Nikolić, prof. struk. stud. Akademije strukovnih studija Južna Srbija (SEM) i dr Davidu Reishoferu naučnom saradniku Univerziteta za tehnologiju u Gracu (AFM).

Zahvaljujem se dr Đorđu Veljoviću, doc. Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu, dr Rupertu Karglu, doc. Mašinskog fakulteta u Mariboru, dr Mateju Bračiću, naučnom saradniku Mašinskog fakulteta u Mariboru i dr Stefanu Spirku, van. prof. Univerziteta za tehnologiju u Gracu, na iskrenom prijateljstvu, podršci i pomoći oko realizacije pojedinih analiza koje su upotrebljene za izradu doktorske disertacije.

Zahvaljujem se svim profesorima i kolegama sa Katedre za tekstilno inženjerstvo Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu na podršci tokom izrade doktorske disertacije. Veliko hvala dr Jovani Milanović, višem naučnom saradniku Inovacionog centra Tehnološko-metalurškog fakulteta u

Beogradu, na nesebično podeljenom iskustvu i pomoći oko mojih početnih izvođenja TEMPO oksidacije celuloze, kojom sam kasnije započela rad na doktorskoj disertaciji.

Neizmernu zahvalnost za bezgraničnu podršku i razumevanje tokom izrade doktorske disertacije dugujem svojoj porodici. Uspešnim završetkom ovog rada htela bih na ovaj način donekle da im se odužim.

Draga mama, posebno tebi koja si bila moja najveća podrška, oslonac i saveznik tokom čitavog života. Hvala ti što me nisi učila da verujem da sam najbolja, najlepša i najpametnija, već da verujem u sebe, u svoje snove i da na tom putu ne smem posustati pred izazovima koje nam život svakodnevno nosi.

“Želite mnogo, težite smelo i daleko i visoko, jer visoki ciljevi otkrivaju i umnogostručavaju snage u nama.

Često pomišljajte da je život jači i svet bogatiji nego što mi to u svakom pojedinom trenutku možemo da sagledamo,

i ne gubite iz vida da u svakom od nas ima nepoznatih mogućnosti da u hodu stičemo snage.”

(Znakovi pored puta, Ivo Andrić)

Matea Korica

DOBIJANJE BIOAKTIVNIH NANOSTRUKTURNIH MATERIJALA NA BAZI CELULOZE I HITOZANA

REZIME

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je dobijanje bioaktivnih nanostrukturnih materijala na bazi regenerisane celuloze (RC), TEMPO oksidisanih celuloznih nanofibrila (TOCN) i hitozana (CS).

Istraživanja sorpcionih svojstava ultra-tankih filmova na bazi RC i TOCN, primenom kvarc-kristal mikrovage sa praćenjem disipacije (QCM-D), omogućila su razumevanje njihovih interakcija sa vodom, CS i proteinima, kao i određivanje parametara procesa za dobijanje bioaktivnih nanostrukturnih materijala (filmova i tkanina) na bazi RC, TOCN i CS. Dobijeni nanostrukturni ultra-tanki filmovi, s obzirom na njihovu multifunkcionalnost (visok kapacitet sorpcije vode, protein-odbijajuća i antibakterijska svojstava), predstavljaju materijale koji mogu naći primenu kao obloge u terapiji rana.

Tekstilni materijali sa antibakterijskim i antioksidativnim svojstvima dobijeni su funkcionalizacijom viskozne tkanine CS, nanočesticama hitozana (NCS) i nanočesticama hitozana sa inkorporiranim jonima cinka (NCS+Zn). U cilju poboljšanja antibakterijskih, antioksidativnih svojstava, kao i njihove postojanosti na pranje, viskozne tkanine su pre funkcionalizacije pred-tretirane naslojavanjem sa TOCN i TEMPO oksidacijom radi uvođenja karboksilnih i aldehidnih grupa pogodnih za ireverzibilno vezivanje CS, NCS i NCS+Zn. Uticaj pred-tretmana na vezivanje CS, NCS i NCS+Zn, hemijska, elektrokinetička, morfološka, sorpciona, mehanička i bioaktivna svojstva pred-tretiranih i hitozanom funkcionalizovanih tkanina ispitan je primenom FTIR, ICP-OES, SEM i elementalne analize, merenjima zeta potencijala, kapilarnosti, sadržaja vlage, prekidne jačine, antibakterijskih i antioksidativnih svojstava. Postojanost na pranje viskoznih tkanina funkcionalizovanih hitozanom praćena je kroz promene u sadržaju hitozana i cinka, elektrokinetičkim, antibakterijskim i antioksidativnim svojstvima nakon višestrukih ciklusa pranja. Sa oba pred-tretmana postignuto je poboljšanje adsorpcije CS, NCS i NCS+Zn, kao i antibakterijskih svojstva funkcionalizovanih materijala koja su postojana na pranje. Sve dobijene tkanine pokazale su dobra antioksidativna svojstva, bez značajnog pogoršanja nakon višestrukih ciklusa pranja. S obzirom na postignuta antibakterijska i antioksidativna svojstva, viskozne tkanine funkcionalizovane CS, NCS i NCS+Zn mogu naći primenu kao medicinski tekstilni materijali u prevenciji i terapiji rana.

Ključne reči: celuloza, TEMPO oksidisani celulozni nanofibrili, hitozan, nanočestice hitozana, nanočestice hitozana sa inkorporiranim jonima cinka, ultra-tanki filmovi, viskozna tkanina, TEMPO oksidacija, naslojavanje sa TEMPO oksidisanim celuloznim nanofibrilima, bioaktivni nanostrukturni materijali

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Tekstilno inženjerstvo

OBTAINING OF BIOACTIVE NANOSTRUCTURED MATERIALS BASED ON CELLULOSE AND CHITOSAN

ABSTRACT

The aim of this doctoral dissertation is obtaining of bioactive nanostructured materials based on regenerated cellulose (RC), TEMPO oxidized cellulose nanofibrils (TOCN) and chitosan (CS).

The research on the sorption properties of ultra-thin films based on RC coated with TOCN, by using a quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D), helped us to understand their interactions with water, CS, and proteins, and to determinate the parameters of the processes for obtaining of bioactive nanostructured materials (films and fabrics) based on RC, TOCN and CS. Obtained nanostructured ultra-thin films, thanks to their multifunctionality (high water absorbance capacity, protein-repellence and antimicrobial properties), represent materials which could be applicable as dressings in wound therapy.

Textile materials with antibacterial and antioxidative properties were obtained by functionalization of viscose fabrics with CS, chitosan nanoparticles (NCS) and chitosan nanoparticles with embedded zinc ions (NCS+Zn). To improve antibacterial, antioxidative properties, as well as their washing durability, viscose fabrics were pre-treated, before functionalization, by coating with TOCN and TEMPO oxidation in order to introduce carboxyl and aldehyde groups suitable for irreversible attachment of CS, NCS and NCS+Zn. The influence of pre-treatments on CS, NCS and NCS+Zn binding, chemical, electrokinetic, morphological, sorption, mechanical, and bioactive properties of pre-treated and chitosan functionalized viscose fabrics were evaluated by FTIR, ICP-OES, SEM and elemental analysis, measurements of zeta potential, capillarity, moisture sorption, breaking strength, antibacterial and antioxidative properties. The washing durability of chitosan functionalized viscose fabrics was monitored through changes in the chitosan and zinc content, electrokinetic, antibacterial and antioxidative properties after multiple washing. With both pre-treatments improved CS, NCS and NCS+Zn adsorption, as well as washing durable antibacterial properties of functionalized materials, were achieved. All obtained fabrics have shown good antioxidative properties, without significant deterioration after multiple washing. Based on achieved antibacterial and antioxidative properties, viscose fabrics functionalized with CS, NCS and NCS+Zn may find application as medical textile materials in wound prevention and therapy.

Key words: *cellulose, TEMPO oxidized cellulose nanofibrils, chitosan, chitosan nanoparticles, chitosan nanoparticles with embedded zinc ions, ultra-thin films, viscose fabric, TEMPO oxidation, coating with TEMPO oxidized cellulose nanofibrils, bioactive nanostructured materials*

Scientific field: Technological engineering

Scientific subfield: Textile engineering

Nomenklatura

ABTS- 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)

AFM- mikroskopija atomskih sila

BC- bakterijska celuloza

BSA- goveđi serumski albumin

CS- hitozan

engl.- engleski

FTIR- infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

ICP-OES- induktivno kuplovana plazma sa optičkom emisionom spektrometrijom

MFC- mikrofibrilisana celuloza

NCS- nanočestice hitozana

NCS+Zn- nanočestice hitozana sa inkorporiranim jonima cinka

NFC- nanofibrilisana celuloza

NTU- nefelometrijska jedinica mutnoće (*engl.* Nephelometric Turbidity Units)

RC- regenerisana celuloza

ROS- reaktivne kiseonične vrste

SEM- skenirajuća elektronska mikroskopija

SP- stepen polimerizovanja

TEM- transmisiona elektronska mikroskopija

TEMPO- 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil radikal

TOCN- TEMPO oksidisani celulozni nanofibrili

QCM-D- kvarc-kristal mikrovaga sa praćenjem disipacije

SADRŽAJ:

Uvod.....	1
I TEORIJSKI DEO	
1. Celuloza	4
1.1. Molekulska struktura celuloze.....	6
1.2. Nadmolekulska struktura celuloze	9
1.3. Celuloza kao nosač bioaktivne supstance	10
1.3.1. Metode imobilizacije bioaktivnih supstanci na celulozne nosače	11
1.3.2. TEMPO oksidacija celuloze u cilju imobilizacije bioaktivnih supstanci	14
1.3.3. Naslojavanje celuloze sa TEMPO oksidisanim celuloznim nanofibrilima u cilju imobilizacije bioaktivnih supstanci	18
2. Nanofibrilisana celuloza	19
2.1. Dobijanje nano- i mikrofibrilisane celuloze.....	21
2.2. TEMPO oksidisani celulozni nanofibrili.....	27
3. Hitozan.....	32
3.1. Molekulska struktura hitozana	34
3.2. Fizičko-hemijska svojstva hitozana.....	35
3.3. Biološka svojstva hitozana	39
3.4. Nanočestice hitozana.....	42
3.5. Potencijal cinka i njegovih kompleksa sa hitozanom u prevenciji i terapiji rana	44
4. Bioaktivni materijali na bazi celuloze i hitozana za prevenciju i terapiju rana	48
II EKSPERIMENTALNI DEO	
5. Eksperimentalni materijal.....	53
5.1. Celulozni supstrati.....	53
5.2. Hemikalije	53
5.3. Indikatorski mikroorganizmi i hranljive podloge.....	54
6. Postupci dobijanja nanostrukturnih materijala na bazi celuloze i hitozana.....	55
6.1. Dobijanje disperzija na bazi TOCN	55
6.2. Postupci dobijanja disperzija nanočestica hitozana sa i bez inkorporiranih jona cinka.....	55
6.3. Postupci dobijanja ultra-tankih filmova na bazi celuloze, TOCN i hitozana.....	56
6.4. Pred-tretmani viskoznih tkanina.....	58

6.5.	Funkcionalizovanje viskoznih tkanina hitozanom i nanočesticama hitozana	59
7.	Metode karakterizacije.....	61
7.1.	Određivanje molekulske mase TEMPO oksidisanih pamučnih vlakana i TOCN.....	61
7.2.	Određivanje sadržaja karboksilnih i karbonilnih grupa u celulozi.....	61
7.3.	Određivanje naelektrisanja TOCN, hitozana i njihove amfoterne smeše u zavisnosti od pH..	62
7.4.	Određivanje mutnoće TOCN disperzija.....	62
7.5.	Određivanje zeta potencijala, veličine čestica i indeksa polidisperznosti TOCN, NCS sa i bez inkorporiranih jona cinka	62
7.6.	FTIR analiza	63
7.7.	Elementalna analiza.....	63
7.8.	ICP-OES analiza.....	63
7.9.	Merenje zeta potencijala.....	64
7.10.	SEM analiza.....	64
7.11.	AFM analiza	65
7.12.	Kvarc-kristal mikrovaga sa praćenjem disipacije (QCM-D).....	65
7.12.1.	Određivanje sadržaja vode.....	66
7.12.2.	Određivanje adsorpcije hitozana.....	67
7.12.3.	Određivanje adsorpcije proteina	67
7.13.	Određivanje sorpcionih svojstava.....	68
7.13.1.	Određivanje mase sorbovane tečnosti i ugla kvašenja metodom kapilarnosti.....	68
7.13.2.	Određivanje sadržaja vlage	69
7.14.	Određivanje prekidne sile.....	70
7.15.	Određivanje antibakterijske aktivnosti	70
7.16.	Određivanje antioksidativne aktivnosti (ABTS metoda).....	70

III REZULTATI I DISKUSIJA

8.	Dobijanje ultra-tankih filmova na bazi celuloze, TOCN i hitozana	72
8.1.	Strukturne i hemijske karakteristike TEMPO oksidisanih vlakana pamuka i TOCN.....	72
8.1.1.	Molekulska masa i sadržaj funkcionalnih grupa TEMPO oksidisanih vlakana pamuka i TOCN... ..	72
8.1.2.	Morfologija površine TEMPO oksidisanih vlakana pamuka i TOCN.....	74
8.1.3.	Zeta potencijal, veličina čestica i indeks polidisperznosti TOCN	76
8.1.4.	Sadržaj funkcionalnih grupa i naelektrisanje amfoterne smeše na bazi TOCN i hitozana u zavisnosti od pH	77

8.2.	Sorpciona svojstva ultra-tankih filmovi na bazi celuloze i TOCN	78
8.2.1.	Kapacitet sorpcije vode ultra-tankih celuloznih filmova	78
8.2.2.	Kapacitet adsorpcije hitozana ultra-tankih celuloznih filmova.....	80
8.3.	Struktura površine ultra-tankih filmova na bazi celuloze, TOCN, hitozana i amfoterne smeše na bazi TOCN i hitozana	82
8.4.	Bioaktivnost ultra-tankih filmova na bazi celuloze, TOCN i hitozana	83
8.4.1.	Protein-odbijajuća svojstva	83
8.4.2.	Antibakterijska svojstva.....	86
9.	Dobijanje bioaktivnih nanostrukturnih materijala na bazi viskoze i hitozana.....	88
9.1.	Karakterizacija pred-tretiranih viskoznih tkanina	88
9.1.1.	Hemijska i elektrokinetička svojstva pred-tretiranih viskoznih tkanina.....	88
9.1.2.	Morfološke karakteristike pred-tretiranih viskoznih tkanina.....	92
9.1.3.	Sorpciona i mehanička svojstva pred-tretiranih viskoznih tkanina	93
9.2.	Dobijanje viskoznih tkanina funkcionalizovanih hitozanom	95
9.2.1.	Hemijska i elektrokinetička svojstva viskoznih tkanina funkcionalizovanih hitozanom .	95
9.2.2.	Morfološke karakteristike viskoznih tkanina funkcionalizovanih hitozanom	98
9.2.3.	Sorpciona i mehanička svojstva viskoznih tkanina funkcionalizovanih hitozanom.....	98
9.2.4.	Antibakterijska svojstva viskoznih tkanina funkcionalizovanih hitozanom.....	100
9.2.5.	Antioksidativna svojstva viskoznih tkanina funkcionalizovanih hitozanom.....	101
9.2.6.	Postojanost na pranje viskoznih tkanina funkcionalizovanih hitozanom	102
9.3.	Karakterizacija viskoznih tkanina funkcionalizovanih NCS sa i bez inkorporiranih jona cinka... ..	107
9.3.1.	Zeta potencijal i veličina čestica NCS sa i bez inkorporiranih jona cinka.....	107
9.3.2.	Hemijska i elektrokinetička svojstva viskoznih tkanina funkcionalizovanih NCS sa i bez inkorporiranih jona cinka.....	110
9.3.3.	Morfološke karakteristike viskoznih tkanina funkcionalizovanih NCS sa i bez inkorporiranih jona cinka.....	113
9.3.4.	Sorpciona i mehanička svojstva viskoznih tkanina funkcionalizovanih NCS sa i bez inkorporiranih jona cinka.....	114
9.3.5.	Antibakterijska svojstva viskoznih tkanina funkcionalizovanih NCS sa i bez inkorporiranih jona cinka.....	117
9.3.6.	Antioksidativna svojstva viskoznih tkanina funkcionalizovanih NCS sa i bez inkorporiranih jona cinka.....	117

9.3.7. Postojanost na pranje viskoznih tkanina funkcionalizovanih NCS sa i bez inkorporiranih jona cinka.....	119
10. Zaključak	129
Literatura.....	131

Uvod

Svet se u poslednje vreme orijentiše ka ekološkim i održivim hemijskim tehnologijama, zbog čega značaj bioobnovljivih resursa, kao što je celuloza, postaje sve veći¹. Brojna područja primene materijala na bazi native i/ili regenerisane celuloze, uz određene modifikacije, mogu se veoma proširiti. Veliki potencijal regenerisane celuloze u izradi bioaktivnih materijala leži u njenoj molekulskoj strukturi, koja pruža odlične mogućnosti za dizajn biokompatibilnih i bioaktivnih materijala². Dobijanje bioaktivnog materijala je kompleksan proces koji uključuje predviđanje efikasnosti datog proizvoda, kontrolisanje kinetike i difuzije bioaktivne supstance i određivanje optimalne koncentracije koja treba da se primeni na lokalnom području. Efikasnost bioaktivnog materijala zavisi od vrste, forme bioaktivne supstance u njemu, ali i od ostalih svojstava samog materijala, odnosno nosača bioaktivne supstance³.

Ireverzibilno vezivanje bioaktivnih supstanci za celulozni nosač je od izuzetne važnosti za neke primene, posebno kada bioaktivnost materijala treba da bude trajna ili da postoji samo na graničnoj površini sa biološkim medijumom⁴. Funkcionalne grupe celuloze, kao što su karboksilne i aldehidne, doprinose ireverzibilnom vezivanju katjonskih bioaktivnih supstanci. Konvencionalni postupci modifikovanja celuloze u cilju uvođenja veće količine funkcionalnih grupa, kao potencijalnih mesta za ireverzibilno vezivanje katjonskih bioaktivnih supstanci, uglavnom se baziraju na hemijskim reakcijama oksidacije, esterifikacije i sličnih reakcija gde se menja struktura celuloze što neretko dovodi do značajnog narušavanja njene nadmolekulske strukture i pogoršanja drugih, posebno fizičko-mehaničkih svojstava krajnjih bioaktivnih materijala^{5, 6, 7}.

Nanotehnologije su danas implementirane u skoro sve savremene tehnologije koje su orijentisane ka postizanju visokog kvaliteta, efikasnosti i tržišnog potencijala. U dizajnu i proizvodnji savremenih bioaktivnih materijala, nanofibrilisana celuloza privlači veliku pažnju zbog svojih izvanrednih fizičkih svojstava, posebne hemije površine i odličnih bioloških svojstava (biokompatibilnost, biorazgradljivost i niska toksičnost)^{8, 9, 10, 11}. Nanofibrilisana celuloza je materijal izolovan iz native celuloze, pogodan za modifikaciju različitih materijala kako bi im se poboljšala postojeća ili dala potpuno nova svojstva⁹. Od različitih postupaka koji se koriste za dobijanje nanofibrilisane celuloze, postupak koji se zasniva na kombinovanju selektivne oksidacije nitroksil radikalima i ultrazvučne dezintegracije spada u postupke koji najviše obećavaju^{10, 11}. Oksidacija nitroksil radikalima je veoma efikasna metoda za uvođenje funkcionalnih grupa u polisaharide velike molekulske mase. Iz serije nitroksil radikala najveću primenu ima 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil, poznat kao TEMPO radikal. Za oksidaciju koja je katalizovana TEMPO radikalom uobičajen je naziv TEMPO oksidacija¹². TEMPO oksidacijom celuloznih vlakana i naknadnim mehaničkim i/ili ultrazvučnim tretmanima dobija se nanofibrilisana celuloza sa povećanim sadržajem karboksilnih i aldehidnih grupa, takozvani TEMPO oksidisani celulozni nanofibrili (TOCN)¹⁰. Naslojavanjem TOCN na celulozni supstrat dobija se pogodan nanostrukturni nosač za ireverzibilno vezivanje katjonskih bioaktivnih supstanci, a bez narušavanja njegovih mehaničkih svojstava prouzrokovanih hemijskim modifikacijama.

U oblasti dobijanja novih bioaktivnih materijala danas su istraživanja usmerena ka funkcionalizaciji celuloznih nosača upotrebom netoksičnih, biorazgradivih i ekološki prihvatljivih bioaktivnih supstanci koje uključuju alternativne i do sada manje korišćene polisaharide i njihove derivate¹³. Hitozan je polikatjon, prirodni amino polisaharid koji ima višefunkcionalna svojstva i širok spektar primena u zaštiti zdravlja i medicini. Sa stanovišta bioaktivnih materijala namenjenih za primenu u prevenciji i terapiji rana, hitozan poseduje brojna poželjna svojstva kao što su antimikrobna, antivirusna,

hemostatska, niska imunogenost, podsticanje proliferacije fibroblasta, sinteze kolagena, angažmana integrina, ekspresije citokina i faktora rasta koji ubrzavaju zarastanje rana i angiogenezu⁴.

Nanotehnologije su u poslednje vreme uključene i u poboljšanje i proširenje spektra bioaktivnih svojstava hitozana kao bioaktivne supstance, a u cilju dobijanja bioaktivnih materijala poboljšanih svojstava, što se ogleda u primeni hitozana u formi nanočestica, kao i u formi nanočestica sa inkorporiranim dodatnim bioaktivnim supstancama¹⁴. Novija istraživanja pokazala su prednost korišćenja nanočestica hitozana u odnosu na hitozan u masi u smislu poboljšanja antibakterijskih svojstava. Pored toga, trenutno se ulažu napore kako bi se sintetizovali hibridi nanočestica hitozana i jona metala radi povezivanja helacionog kapaciteta hitozana prema jonima metala i antibakterijskih svojstava jona metala. Helacijom jona metala povećava se gustina pozitivnog naelektrisanja nanočestica hitozana što bi trebalo da dovede do njihove poboljšane adsorpcije na negativno naelektrisane površine bakterijskih ćelija i inhibicije rasta bakterijskih ćelija¹⁵. Cink je metal čiji joni pokazuju izuzetna antibakterijska svojstva. Na osnovu kliničkih ispitivanja, potvrđeno je i da su efikasno antiseptičko sredstvo koje ne izaziva štetne efekte niti prolongiranje procesa zarastanja rana, naročito u slučaju hroničnih i inficiranih rana, kao i opekotina¹⁶.

Predmet rada ove doktorske disertacije bio je dobijanje bioaktivnih nanostrukturnih materijala na bazi regenerisane celuloze (RC), TOCN i hitozana (CS). U prvom delu doktorske disertacije posebna pažnja je posvećena dobijanju TOCN oksidacijom pamučnih vlakana, kao polazne sirovine, u sistemu TEMPO/NaBr/NaClO na pH 10,5, uz njihovu naknadnu fibrilaciju ultrazvučnom dezintegracijom. Nakon toga, metodom rotirajućeg diska dobijeni su dvoslojni ultra-tanki filmovi na bazi RC i TOCN. Primenom kvarc-kristal mikrovage sa praćenjem disipacije (QCM-D), na modelu ultra-tankog filma, detaljno su istražena njihova sorpciona svojstva, interakcije sa CS, kao i proteinima kako bi se stekao uvid u njihove interakcije sa biološkim medijumom. Morfologija površine ultra-tankih filmovi na bazi RC i TOCN pre i posle adsorpcije CS okarakterisana je mikroskopijom atomskih sila (AFM). Bioaktivnost dobijenih filmova na bazi RC, TOCN i CS okarakterisana je određivanjem njihovih protein-odbijajućih svojstava *in situ* u kontinualnom toku goveđeg serumskog albumina (BSA) primenom QCM-D i određivanjem njihovih antibakterijskih svojstava *in vitro* prema *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Sprovedena istraživanja na modelu ultra-tankog filma bila su ključna za razumevanje depozicije CS na površine RC naslojene sa TOCN, kao i za naknadno dobijanje bioaktivnih filmova na bazi RC, TOCN i CS i bioaktivnih tkanina na bazi regenerisanih, odnosno hemijskih celuloznih vlakana, TOCN i CS, kao i nanočestica hitozana (NCS) i nanočestica hitozana sa inkorporiranim jonima cinka (NCS+Zn).

Tekstilni materijali sa antibakterijskim i antioksidativnim svojstvima dobijeni su funkcionalizacijom viskozne tkanine sa: CS, NCS i NCS+Zn. U cilju poboljšanja ovih svojstava kao i njihove postojanosti na pranje, pre funkcionalizacije sa CS, NCS i NCS+Zn, u strukturu viskozne tkanine uvedene su, sa dva različita pred-tretmana: naslojavanjem sa TOCN i TEMPO oksidacijom, karboksilne i aldehidne grupe kao pogodna mesta za ireverzibilno vezivanje hitozana i nanočestica hitozana.

Uticao oba pred-tretmana na vezivanje CS, NCS i NCS+Zn, hemijska, elektrokinetička, morfološka, sorpciona, i mehanička svojstva pred-tretiranih i CS, NCS i NCS+Zn funkcionalizovanih tkanina ispitan je pomoću infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (FTIR), elementalne analize, induktivno kuplovane plazme sa optičkom emisijom spektrometrijom (ICP-OES), elektronske mikroskopije (SEM), merenjima zeta potencijala, kapilarnosti, sadržaja vlage i prekidne jačine. Bioaktivnost nemodifikovane i pred-tretiranih tkanina funkcionalizovanih sa CS, NCS i NCS+Zn okarakterisana je određivanjem njihovih antibakterijskih i antioksidativnih svojstava. Antibakterijska svojstva određena su *in vitro* prema *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*, a

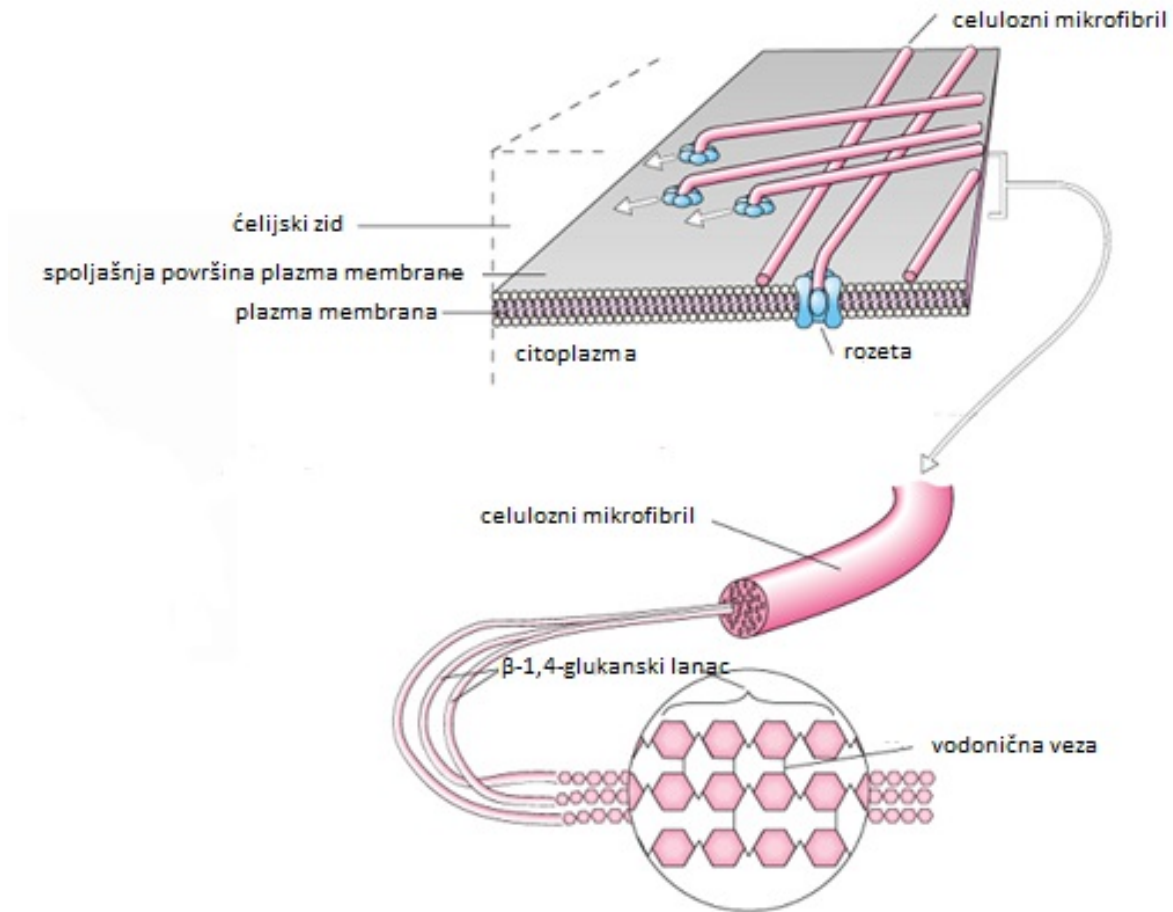
antioksidativna svojstva preko inhibicije 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) tzv. ABTS radikala. Imajući u vidu da u procesu pranja uglavnom dolazi do otpuštanja izvesne količine bioaktivne supstance sa tekstilnog materijala i da ukoliko koncentracija bioaktivne supstance padne ispod određenog nivoa, dolazi do gubitka bioaktivnosti tekstilnog materijala, postojanost na pranje bioaktivnog tekstilnog materijala ključan je parametar za ocenu uspešnosti funkcionalizacije i dužinu upotrebe bioaktivnog tekstilnog materijala. Postojanost na pranje nemodifikovane i pred-tretiranih tkanina funkcionalizovanih sa CS, NCS i NCS+Zn praćena je kroz promene u sadržaju hitozana i cinka, elektrokinetičkim, antibakterijskim i antioksidativnim svojstvima nakon višestrukih ciklusa pranja.

I TEORIJSKI DEO

1. Celuloza

Celuloza je najrasprostranjeniji organski polimer koji doprinosi ukupnoj godišnjoj proizvodnji biomase oko $1,5 \times 10^{12}$ tona. Hemijski sastav, struktura i morfologija celuloze vekovima su bile nepoznate. Smatra se da je moderna istorija hemije celuloze počela 1838. godine kada je francuski naučnik *Anselme Payen* otkrio da su ćelijski zidovi skoro svih biljaka izgrađeni od iste supstance, kojoj je dao naziv *celuloza*. Zbog svog ogromnog industrijskog značaja i potencijala za brojne inovativne primene u budućnosti, celuloza se u pogledu svojih fizičkih i hemijskih svojstava i danas vrlo temeljno proučava^{17, 18, 19}

Smatra se da je celuloza gotovo neiscrpnim izvor sirovina, kako za industrije tekstila i papira, tako i za celokupnu hemijsku industriju. U najvećem obimu celuloza se pojavljuje u ćelijskim zidovima biljaka, ali može se naći i kod nekih ameba, morskih organizama-protihordata (*tunicin* celuloza), algi (*Valonia*, *Chladophora*, *Rizoclonium*, *Microdictyon*), bakterija (*Acetobacter xylinum*) i gljiva. Celuloza u biljkama nastaje u procesu fotosinteze od CO_2 i H_2O , pod dejstvom elektromagnetnog zračenja. Tokom biosinteze celuloze dolazi do formiranja celuloznih lanaca iz monomera glukoze, formiranja fibrila iz celuloznih lanaca i orijentacije fibrila u ćelijskom zidu. Kompleks enzima celuloza-sintetaza, tzv. terminalni kompleks ili rozeta ima glavnu ulogu u biosintezi celuloze. Rozeta katalizuje vezivanje glukoze za neredukujući kraj molekula produžavajući lanac celuloze. Svaka rozeta ima 6 subjedinica, a svaka se sastoji od 6 enzima koji proizvode 6 glukoznih lanaca međusobno povezanih vodoničnim vezama u celulozni mikrofibril, prečnika 2-3 nm i dužine nekoliko desetina mikrona. Rozete se nalaze unutar spoljne ćelijske membrane, tako da se celulozni lanci formiraju direktno u ćelijskom zidu (Slika 1.). Sve rozete istovremeno sintetizuju paralelne celulozne lance koji napuštajući rozete spontano kristališu u paralelnu strukturu celuloze I^{20, 21}.



Slika 1. Biosinteza celuloze u čelijskom zidu biljaka²²

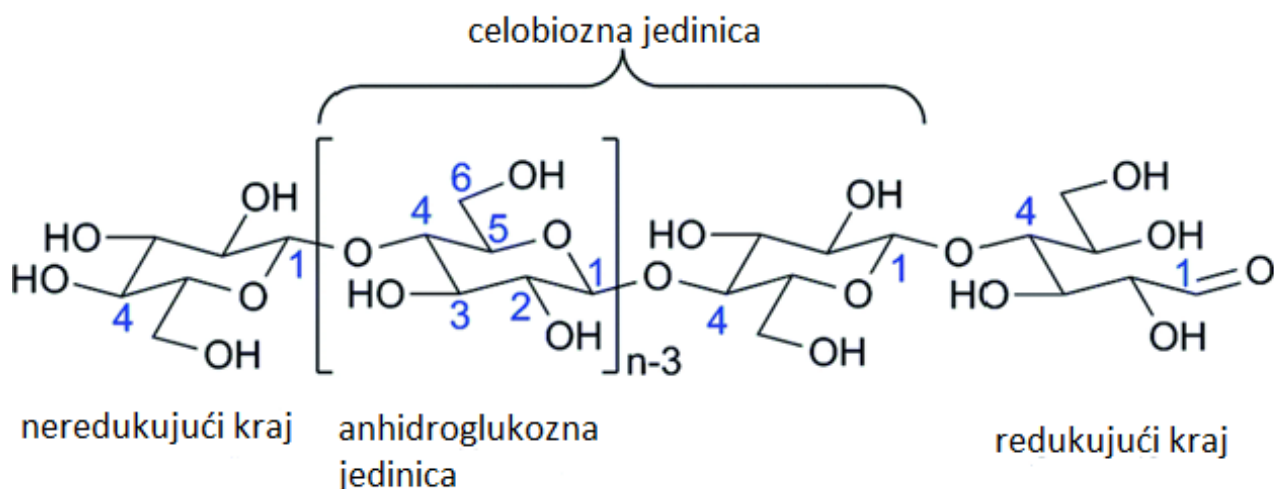
Biosintetizovani molekuli celuloze udružuju se u mikrofibrile dužine nekoliko mikrometara. Svaki mikrofibril se može smatrati fleksibilnim lancem celuloznih kristalita povezanih u pravcu ose mikrofibrila nesređenim amorfnim oblastima. Uređene oblasti čine celulozni lanci koji su stabilizovani jakom i kompleksnom mrežom vodoničnih veza i podsećaju na nanokristalne šipke. Nadalje, mikrofibrili se udružuju u fibrile koji formiraju čelijski zid čija se debljina povećava sa rastom biljke¹¹ (Slika 2.). Celuloza se u biljkama nalazi u kombinaciji sa većim sadržajem hemiceluloza, lignina, pentoza i ostalim pratećim supstancama. S tim u vezi, važno je istaći da je pamuk biljni izvor najvećeg sadržaja, odnosno čistoće celuloze (95-98%)²³.



Slika 2. Od biljnog izvora celuloze do celuloznih molekulskih lanaca, modificirano iz²⁴

1.1. Molekulska struktura celuloze

Celuloza ($C_6H_{10}O_5$)_n je polidisperzni linearni polimer poli-β(1,4)-D-glukoze sa sindiotaktnom konfiguracijom (Slika 3.). Povezivanje molekula D-glukoze β-glikozidnom vezom između C1 i C4 omogućava linearno prostiranje makromolekula celuloze. Pored toga, β-glikozidna veza određuje njena svojstva i konfiguraciju. Svaka druga glukozidna jedinica u celuloznom lancu zarotirana je za 180° u ravni, a dve susedne glukozidne jedinice čine disaharid celobiozu. S obzirom na to da se hidroksilne grupe na C6 atomu dve susedne glukozidne jedinice nalaze u *trans* položaju, celuloza je svrstana u sindiotaktne stereoregularne polimere¹⁸.

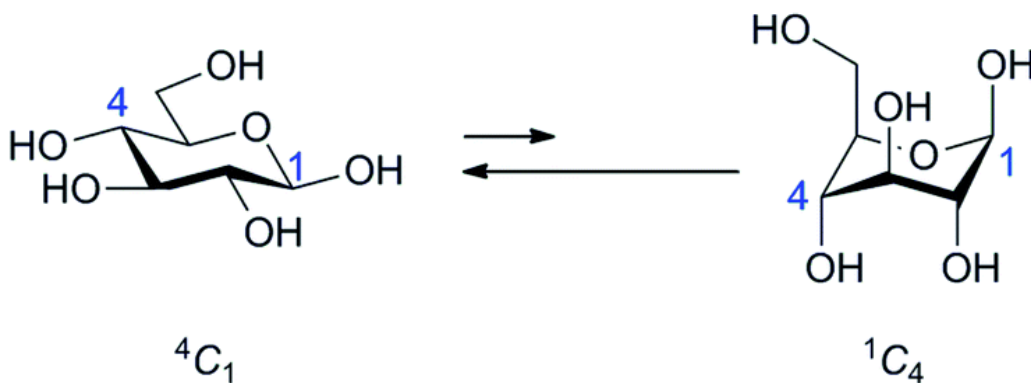


Slika 3. Molekulska struktura celuloze (*n* - stepen polimerizovanja)¹⁸

Stepen polimerizovanja (n) izražava se kao broj glukozidnih jedinica koje čine lanac i određuje dužinu lanca. Prosečna vrednost n ne zavisi samo od porekla celuloze, nego i od tretmana koji su korišćeni za njeno izolovanje. Na primer, celuloza iz drvene pulpe ima prosečnu vrednost n između 300 i 1700. U slučaju pamuka i drugih biljnih vlakana, vrednosti n se kreću od 800 do 10 000. Slične vrednosti su zabeležene i za bakterijsku celulozu¹⁸.

Celuloza se može kvantitativno razgraditi do D-glukoze dejstvom kiselina i celulazom katalizovanom hidrolizom. Između monomera glukoze i celuloze postoji ključna razlika, koja zavisi od broja glukozidnih jedinica tj. n , a podrazumeva rastvorljivost. Glukoza je rastvorljiva u vodi, dok je celuloza nerastvorljivi polimer sa krutom mrežom vodoničnih veza²¹.

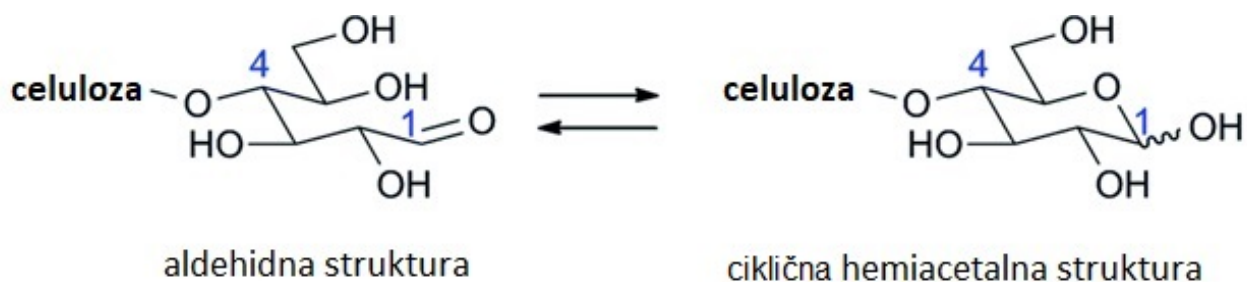
Svaki glukozidni prsten usvaja 4C_1 konformaciju stolice (Slika 4.). Pošto su svi supstituenti prstena i sve glikozidne veze u ekvatorijalnoj ravni, ova konformacija obezbeđuje manje *Van derWaals*-ovih i sternih smetnji među njima. To je najstabilnija i termodinamički najpoželjnija konformacija¹⁸.



Slika 4. Konformacije β -D-glukozidnog prstena¹⁸

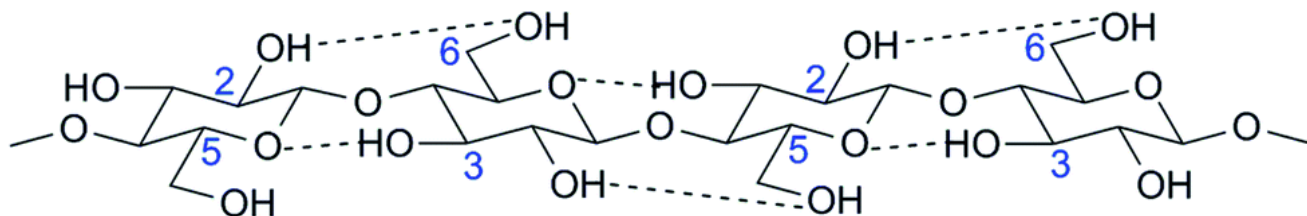
Na glukozidnom ostatku celuloze nalaze se dve sekundarne (na C2 i C3 atomu) i jedna primarna (na C6 atomu) hidroksilna grupa. Sekundarne hidroksilne grupe ispoljavaju kiseli karakter i u znatnom stepenu disosuju, naročito hidroksilne grupe na C2 atomu. Prema polarnosti (ili reaktivnosti) u vodi, hidroksilne grupe se mogu poređati u sledeći niz: C2-OH > C6-OH > C3-OH. Bez obzira na izvesne razlike u karakteru, sve tri hidroksilne grupe glukozidnih ostataka sposobne su za tipične reakcije OH grupa kao što je eterifikovanje, esterifikovanje, hidroliza, oksidacija i piroliza²¹.

Glukozidni ostaci na krajevima razlikuju se od onih unutar lanca što omogućava njegovo usmeravanje. Glukozidni ostatak na desnom (redukujućem) kraju ima aldehidnu grupu skrivenu u poluacetalnom obliku (Slika 5.), a glukozidni ostatak na levom (neredukujućem) kraju ima četiri hidroksilne grupe koje su po reaktivnosti identične sa hidroksilnim grupama na ostalim glukozidnim ostacima¹⁸.



Slika 5. Krajnji glukozidni ostatak na redukujućem kraju¹⁸

Prisustvo hidroksilnih grupa, zajedno sa atomima kiseonika iz glukopiranoznog prstena, i glikozidne veze, omogućava formiranje različitih intra- i inter- molekularnih vodoničnih veza što je jedan od najznačajnijih faktora koji utiče na svojstva celuloze²³. Dok su intra-molekulske vodonične veze delimično odgovorne za linearnost i krutost polimernog lanca, inter-molekulske vodonične veze rezultiraju stvaranjem kristalnih sekvenci i drugih oblika nadmolekulske strukture. Smatra se da celuloza ima dve različite intra-molekulske vodonične veze (Slika 6.), jednu između OH-C3 i O-C5 susednog prstena i drugu između OH-C6 i OH-C2 kada je hidroksimetil grupa na poziciji C6 u trans-*goš* (*tg*) konformaciji¹⁸.



Slika 6. Intra-molekulske veze u celulozi¹⁸

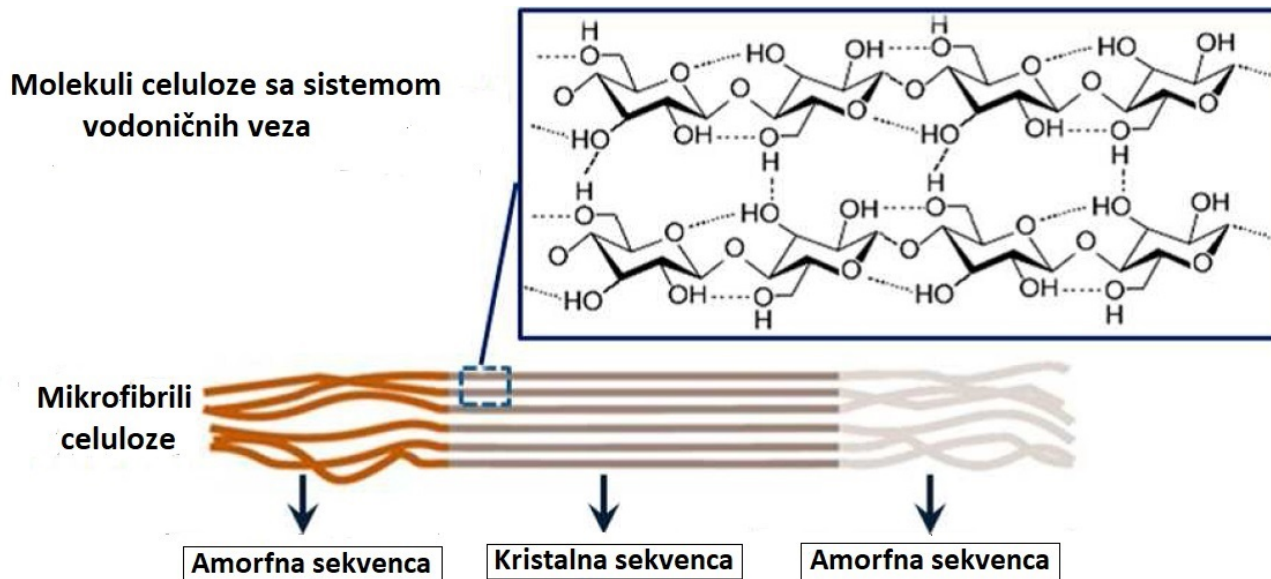
Prema prostornom rasporedu, konformaciji i obliku makromolekula, celuloza je polukrut makromolekul. Ciklična struktura glukozidnih jedinica kao i prisustva polarnih hidroksilnih grupa u njima uzrok su povećane krutosti makromolekula celuloze. Glukozidna jedinica može da zauzme 8 energetski povoljnih konformacionih položaja „stolice” i „kade”. Linearno prostiranje, konformacija i uvijanje makromolekula celuloze oko ose simetrije drugog reda određeno je β -1,4-glikozidnom vezom. Svaka glikozidna veza (C1-O1 i O1-C4) karakteriše se torzionim uglovima φ (-25°) i ψ (146°) što omogućava formiranje intra-molekulske vodonične veze O-C5---H-O-C3 koja dovodi do uvijanja makromolekula celuloze²⁵.

Molekulska struktura celuloze ima ključan uticaj na njena svojstva poput hidrofilnosti, hiralnosti, degradabilnosti i široke hemijske raznovrsnosti koju inicira visoka donorska reaktivnost OH grupa. Molekulska struktura celuloze takođe je osnova za uspostavljanje mreže intra- i inter- vodoničnih veza, koje celulozi omogućavaju da formira složenu nadmolekulsku strukturu. Prema tome, svojstva celuloze su takođe određena i hijerarhijom u nadmolekularnoj strukturi i organizaciji, što će u narednom poglavlju biti detaljno razmatrano²¹.

1.2. Nadmolekulska struktura celuloze

Intermolekulske vodonične veze doprinose pakovanju spiralno uvijenih celuloznih makromolekula, što omogućava obrazovanje kristalnih sekvenci. Makromolekuli su obično duži od kristalnih sekvenci. Jedan makromolekul može da se prostire kroz dve susedne kristalne sekvence, prolazeći kroz amorfne, i na taj način da ih drži zajedno (Slika 7.). Intermolekulske vodonične veze u kristalnim sekvencama su jake što celulozu čini nerastvorljivom u vodi i mnogim rastvaračima^{26, 27}.

Pakovanje u sređene sekvence će biti narušeno ukoliko u jednom ili više celuloznih nizova dođe do promene pravca niza, pa već oformljena spirala izmeni karakteristike u jednom svom delu. Na ovaj način objašnjava se pojava i manje sređenih sekvenci tj. amornih sekvenci u celulozi²³. Amorfne sekvence se nalaze unutar i između fibrila i sastoje se iz savijenih delova i krajeva makromolekula. U amornim sekvencama se zbog velike udaljenosti među makromolekulima uspostavlja manji broj intermolekulskih vodoničnih veza što omogućava makromolekulima da formiraju vodonične veze sa drugim molekulima kao što je voda i dovodi do bubrenja celuloze. Navedena pojava odgovorna je za higroskopna i hidrofilna svojstva celuloze²⁶.



Slika 7. Kristalne i amorfne sekvence celuloze²⁸

Kao i kristalne, amorfne sekvence imaju veliki uticaj na skoro sva hemijska i fizička svojstva celuloznih materijala. Interakcije između čvrstih celuloznih materijala i vode, reaktivnih ili adsorptivnih supstanci dešavaju se prvo u amornim područjima i na površinama kristala. Kako u hemijskom, tako i u mehaničkom pogledu, amorfne sekvence predstavljaju tzv. slaba mesta jer ona najlakše bubre i hemijski reagensi u njih najlakše prodiru. Mnoga svojstva poput gipkosti, jačine i elastičnosti, kao i otpornosti vlakana prema hemikalijama, zavise od procentnog udela amornih i kristalnih sekvenci tj. stepena kristalnosti²⁵.

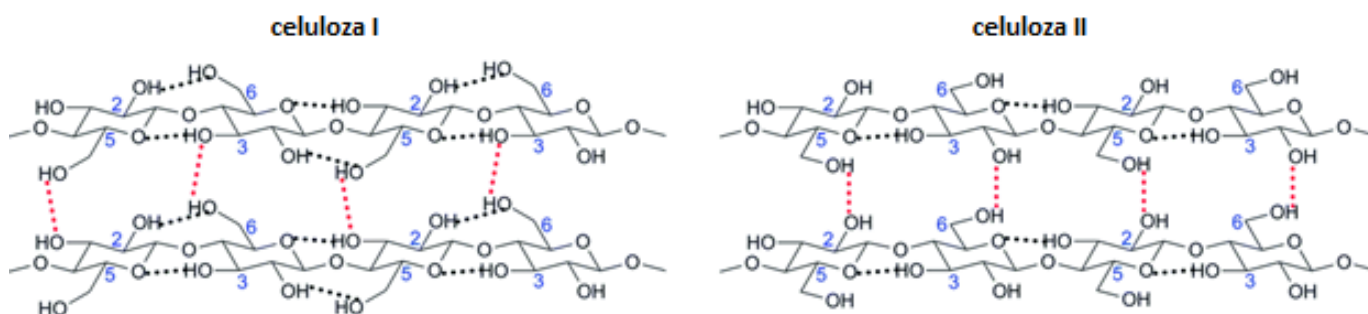
Prisustvo kristalnih područja dokazano je rentgenografskim metodama. Kristalna struktura celuloze može se podeliti na:

- kristalnu strukturu native celuloze (celuloza I),
- kristalnu strukturu regenerisane celuloze (celuloza II) i

- kristalne strukture celuloze III, IV i V, koje se dobijaju modifikovanjem celuloze I i II²⁵.

U prirodi se celuloza nalazi u obliku celuloze I. Celuloza I je najrasprostranjenija kristalna forma celuloze. Javlja se u dva alomorfna oblika I_α i I_β, koja se pojavljuju zajedno pri čemu je jedan uvek dominantniji u zavisnosti od porekla celuloze. Alomorfan oblik I_α javlja se kao skoro čistokristalna forma i dominira kod nekih vrsta algi i bakterija, alomorfan oblik I_β javlja se u ćelijskim zidovima viših biljaka, kod pamuka, lana, konoplje, ramije i u drveću²⁹.

Mercerizovanjem ili rekristalizacijom celuloze I nastaje celuloza II, termodinamički najstabilniji oblik celuloze. Celuloza I i celuloza II se razlikuju po intra- i inter-molekulskim vodoničnim vezama (Slika 8.) što dovodi do različitog pakovanja makromolekula u kristalnim sekvencama: paralelnog (celuloza I) i antiparalelnog (celuloza II). Osnovna intra-molekulska vodonična veza C3-O-H---O-C5, odgovorna za krutost lanca i uvijen oblik makromolekula celuloze, je prisutna kod oba kristalna oblika. Intra-molekulska vodonična veza C2-O-H---O-C6 je prisutna samo u celulozi I (I_α i I_β). Kod celuloze I postoji C6-O-H---O-C3, a kod celuloze II C6-O-H---O-C2 inter-molekulska vodonična veza¹⁸.



Slika 8. Razlike u intra- i inter-molekulskim vodoničnim vezama kod celuloze I i celuloze II¹⁸

Celuloza III dobija se potapanjem celuloze I ili celuloze II u tečni amonijak ili organske amine i naknadnim uklanjanjem tečnog amonijaka ili organskog amina. Celuloza IV dobija se termičkim tretmanom celuloze I, II ili III. Celuloza V dobija se obradom celuloze sa jakom fosforom ili hlorovodoničnom kiselinom²⁵.

1.3. Celuloza kao nosač bioaktivne supstance

Relativno novi trend u oblasti dobijanja bioaktivnih materijala predstavljaju sistemi nosač-bioaktivna supstanca. Njihova svojstva zavise kako od svojstava nosača tako i od svojstava bioaktivne supstance. Postizanje željenih svojstava ovih sistema je kompleksan proces koji podrazumeva predviđanje njihove efikasnosti, određivanje optimalne koncentracije bioaktivne supstance koja treba da se primeni na lokalnom području i kontrolisanje njene kinetike i difuzije. Velika prednost ovih sistema ogleda se u mogućnosti regulacije trajnosti bioaktivnog dejstva bioaktivne supstance u širokom opsegu, što se postiže variranjem koncentracije bioaktivne supstance u/na nosaču, tipom veze-nosač-bioaktivna supstanca i količinom prisutne vlage³.

Polimeri imaju široku primenu kao nosači bioaktivne supstance. U poređenju sa drugim tipovima nosača, kao što su metali i keramika, polimeri obezbeđuju veće mogućnosti u kreiranju raznovrsnih kompozicija sa varijacijama strukture i svojstava³. Veliki potencijal celuloze kao nosača bioaktivne

supstance leži u njenoj biokompatibilnosti i strukturi, koji joj pružaju odlične mogućnosti za dizajn raznovrsnih bioaktivnih materijala^{18, 30}.

1.3.1. Metode imobilizacije bioaktivnih supstanci na celulozne nosače

Imobilizacijom bioaktivnih supstanci na nosače poboljšava se stabilnost njihovog dejstva, pojednostavljaju procedure njihovog recikliranja nakon upotrebe, a time i ponovna upotreba³¹. Imobilizacija je često preduslov za upotrebu bioaktivnih supstanci u industrijskoj proizvodnji jer omogućava velike uštede u odnosu na korišćenje bioaktivnih supstanci u izvornom obliku¹⁸. S druge strane, celuloza je prilično jeftina sirovina što je i s ekonomskog aspekta čini veoma pogodnim nosačem za skupe bioaktivne supstance³².

Glavni cilj procesa imobilizacije je kontrola količine vezanih bioaktivnih supstanci, njihove tercijarne strukture i orijentacije kako bi u potpunosti zadržali ili čak poboljšali svoje biološke aktivnosti^{33, 34}. Tokom imobilizacije dolazi do nasumične orijentacije i strukturne deformacije bioaktivnih molekula što može smanjiti njihovu bioaktivnost³⁵. Dakle, postupak izvođenja imobilizacije značajno može uticati na svojstva gotovih bioaktivnih materijala³⁶. Prilikom određivanja parametara imobilizacije primarno treba uzeti u obzir fizičko-hemijska i hemijska svojstva kako nosača tako i bioaktivne supstance³⁴, reproduktivnost, cenu, kao i složenost procesa imobilizacije posebno ako se planira industrijska proizvodnja bioaktivnih materijala³⁷.

Postoji više metoda koje se koriste za imobilizaciju bioaktivnih supstanci na celulozu i generalno se mogu klasifikovati u sledeće tri kategorije:

- fizičke metode, gde se bioaktivne supstance vezuju za celulozu uspostavljanjem fizičkih interakcija (npr. *Van der Waals*-ove, elektrostatičke ili hidrofobne interakcije i vodonične interakcije);
- biološke ili biohemijske metode, gde se bioaktivne supstance vezuju za celulozu usled biohemijskog afiniteta između dve komponente; i
- hemijske metode, gde se bioaktivne supstance vezuju za celulozu usled uspostavljanja kovalentnih veza¹⁸.

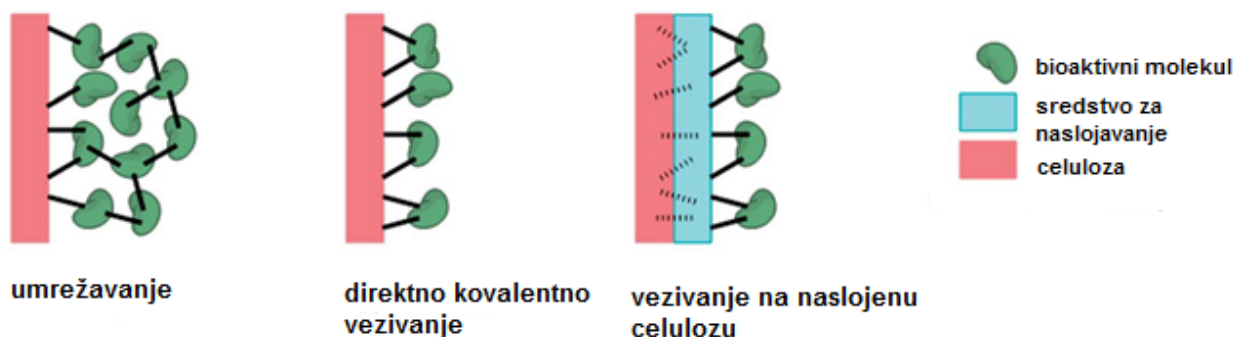
Fizičke metode imaju prednost u smislu da nisu potrebne hemijske modifikacije ni bioaktivnih supstanci ni nosača, jednostavnosti izvođenja i ekonomičnosti. Međutim, veza između bioaktivnih supstanci i nosača je slaba i privremena pa bioaktivne supstance imaju tendenciju da se otpuštaju sa nosača što rezultira postepenim gubitkom bioaktivnosti materijala³⁸. *Fras Zemljič* i sar.³⁹ fizički su vezali hitozan naprskavanjem njegovog rastvora na viskozna vlakna u formi tampona. Viskozna vlakna u formi tampona nakon imobilizacije hitozana pokazala su antibakterijsku aktivnost prema *S.aureus*. *Barbioli* i sar.⁴⁰ antimikrobne proteine lizozim i laktoferin dodali su smeši celuloznih vlakna i karboksimetil celuloze, u cilju dobijanja papira sa antimikrobnim svojstvima. U puferovanom fiziološkom rastvoru dobijeni papir desorbovao je više od 60% dodatih proteina, što ukazuje da su se proteini fizički vezali sa celuloznim vlaknima i karboksimetil celulozom. Pored toga, utvrđeno je da su desorbovani proteini zadržali svoja strukturna i antimikrobna svojstva odnosno da na njih nije uticao proces izrade papira. *Beekmann* i sar.⁴¹ metodom naprskavanja su na mrežnu strukturu na bazi bakterijske celuloze fizički vezali natrijum-diklofenak. Ovom metodom postignuto je uniformno nanošenje natrijum-diklofenaka na mrežnu strukturu na bazi bakterijske celuloze kao i njena dobra antinflamatorna svojstva.

Prednost metoda kod kojih se imobilizacija biološki aktivnih supstanci zasniva na bioafinitetu ogleda se u mogućnosti kontrolisanja orijentacije bioaktivnih supstanci, čime se omogućava potpuno zadržavanje ili čak poboljšanje njihove biološke aktivnosti u odnosu na onu u izvornom obliku. Iako nekovalentno, vezivanje zasnovano na bioafinitetu je specifično i jako što omogućava dobijanje izuzetno efikasnih bioaktivnih materijala. Ovo vezivanje istovremeno je i reverzibilno pa omogućava recikliranje bioaktivnih supstanci i njihovu ponovnu upotrebu. Nedostatak ovih metoda ogleda se u složenosti, jer obično zahtevaju uvođenje pogodnih mesta za vezivanje bioaktivnih supstanci, što se najčešće postiže primenom vezujućih domena koji imaju sposobnost da se spontano vežu na nosače⁴². Ovaj pristup imobilizacije bioaktivnih supstanci, uz upotrebu vezujućih domena, primenili su Cao i sar.⁴³ za imobilizaciju antitela na magnetne mikrosfere celuloze. Weishaupt i sar.⁴⁴ sintetizovali su bifunkcionalni peptid kombinovanjem peptida sa antimikrobnim svojstvima i peptida sa bioafinitetom prema celulozi. Na taj način sintetizovanim peptidom istovremeno su ostvarena dva efekta: njegova imobilizacija na celulozu i efikasna antibakterijska aktivnost tako funkcionalizovane celuloze prema *S.aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*.

Hemijske metode omogućavaju čvrsto, stabilno i trajno vezivanje bioaktivnih supstanci na nosače. Međutim, ove metode obično zahtevaju aktivaciju ili modifikovanje kako bioaktivnih supstanci tako i nosača, što može izazvati njihove strukturne promene kao i delimični gubitak aktivnosti bioaktivnih supstanci blokiranjem njihovih aktivnih mesta ukoliko, kao funkcionalne grupe, učestvuju u vezivanju⁴⁵. Nikolić i sar.⁴⁶ oksidisali su pamučnu pređu sa natrijum-perjodatom kako bi u nju uveli aldehidne grupe i na taj način dobili nosač za hemijsko vezivanje tripsina kovalentnom vezom između aldehidnih grupa pamučnih vlakana i amino grupa tripsina. Primenjenom metodom postignuta je maksimalna količina imobilisanog tripsina od 6,1 mg/g suve pamučne oksidisane pređe, a imobilisan tripsin na oksidisanoj pamučnoj pređi zadržao je, nakon više od 60 dana skladištenja u fiziološkom rastvoru na 4 °C i 25 °C, 90% i 72% svoje početne aktivnosti, respektivno. Chen i sar.⁴⁷ imobilisali su siloksan sulfopropilbetain na pamučnu tkaninu uspostavljanjem kovalentnih veza između silanolskih grupa siloksan sulfopropilbetaina i hidrosilnih grupa pamučnih vlakana. Pamučna tkanina nakon imobilizacije siloksan sulfopropilbetaina pokazala je dobra antimikrobna svojstva prema *S.aureus*, *E.coli* i *Candida albicans*, koja su zadržana čak i nakon 50 ciklusa pranja. Chun i sar.⁴⁸ modifikovali su trimetoprim i sulfametoksazol tako da mogu da ostvare reakcije karakteristične za reaktivne boje i na taj način ih kovalentno vezali za pamučnu tkaninu. Dobijene tkanine pokazale su dobra antibakterijska svojstva prema *S.aureus* i *Klebsiella pneumoniae*, postojana i do 10 ciklusa pranja. Nogueira i sar.⁴⁹ modifikovali su pamučnu tkaninu sa *N,N*-karbonildimidazolom kako bi njene hidroksilne grupe preveli u imidazol-karbamatne grupe i time omogućili kovalentno vezivanje između imidazol-karbamatnih grupa pamuka i amino grupa L-cisteina. Nakon imobilizacije L-cisteina, dobijena tkanina pokazala je dobra antibakterijska svojstva prema *K.pneumoniae* i *S.aureus*. Durand i sar.⁵⁰ su na membrane od nanofibrilisane celuloze pred-tretirane enzimima kovalentno vezali ciprofloksacin i na taj način postigli njihovu efikasnu antibakterijsku aktivnost postojanu tokom nekoliko dana.

Hemijske metode imobilizacije bioaktivnih supstanci na celulozu se mogu podeliti na tri grupe (Slika 9.):

- umrežavanjem,
- direktnim kovalentnim vezivanjem i
- vezivanjem na naslojenu celulozu¹⁸.



Slika 9. Hemijski pristup imobilizacije bioaktivnih supstanci na celulozu: umrežavanjem, direktnim kovalentnim vezivanjem, vezivanjem na naslojenu celulozu¹⁸

Od pomenutih metoda hemijske imobilizacije umrežavanje je prilično atraktivno zbog jednostavnosti izvođenja. Podrazumeva jednostepeni postupak koji se sastoji od ostvarivanja veze između celuloze i bioaktivnih supstanci preko sredstava za umrežavanje. Glutaraldehyd je trenutno najpoznatiji bifunkcionalni umreživač^{51, 52, 53, 54, 55}.

Ova metoda ima prednost u imobilizaciji velike količine bioaktivnih molekula. Bi- ili multifunkcionalni umreživači kovalentno vezuju bioaktivne supstance kako za celulozu tako i međusobno, što dovodi do formiranja velike trodimenzionalne strukture. Pošto se bioaktivne supstance nasumično vezuju jedne za druge, količina imobilisanih bioaktivnih supstanci varira i proces vezivanja nije reproduktivan. Raspodela i orijentacija imobilisanih bioaktivnih supstanci je takođe nasumična, kao i broj i lokacija vezujućih mesta unutar bioaktivnih supstanci. Sve ovo može ukrotiti strukturu, pa čak i blokirati aktivna mesta bioaktivne supstance, što na kraju može da rezultira velikim gubitkom njene aktivnosti^{37, 56, 57}.

Direktno kovalentno vezivanje je najpostojanija metoda imobilizacije. Funkcionalne grupe bioaktivnih supstanci i celuloze se povezuju kovalentnim vezama⁵⁶. Međutim, ukoliko u vezivanju učestvuje više mesta jednog bioaktivnog molekula njegova fleksibilnost i aktivnost može biti smanjena^{34, 58, 59}. Aktivnost bioaktivne supstance može biti smanjena i ako njeno bioaktivno mesto učestvuje u vezivanju¹⁸. Hidroksilne grupe glukozidnih jedinica su nosioci hemijske aktivnosti celuloze, pri čemu primarna hidroksilna grupa na C6 atomu predstavlja najreaktivnije mesto, daleko reaktivnije od sekundarnih na C2 i C3²⁷. Međutim, hidroksilne grupe ne mogu da formiraju kovalentne veze sa svim grupama, kao što su npr. amino grupe, pa je u nekim slučajevima neophodna aktivacija ili modifikacija celuloze kako bi se ostvarila mogućnost za uspostavljanje kovalentne veze sa određenim grupama bioaktivnih supstanci¹⁸.

Imobilizacija bioaktivnih supstanci na naslojenu celulozu se može smatrati varijantom direktnog kovalentnog vezivanja i može biti opisana kao polikovalentna. Bioaktivne supstance se kovalentno vezuju za celulozu, ali preko sredstva za naslojavanje. Na ovaj način se na površinu celuloze uvode velike količine funkcionalnih grupa neophodnih za kovalentno vezivanje bioaktivnih supstanci. S obzirom na mogućnost desorpcije sredstva za naslojavanje sa celuloze, vezivanje nakon naslojavanja celuloze je do sada manje korišćena metoda od klasičnog kovalentnog vezivanja¹⁸. Za naslojavanje celuloze mogu se koristiti različiti polimeri, pri čemu su do sada uglavnom korišćeni polisaharidi poput hitozana i karboksimetil celuloze koji za vezivanje bioaktivnih supstanci obezbeđuju amino i karboksilne grupe, respektivno^{51, 52, 54, 60}.

Imajući u vidu da veliki potencijal celuloze kao nosača bioaktivne supstance i dobijanje bioaktivnih materijala potiče od njene strukture koja pruža odlične mogućnosti za dizajn biokompatibilnih, bioaktivnih i materijala visokih performansi, ali i predmet rada i cilj ove doktorske disertacije, u narednim poglavljima posebno će biti obrađena TEMPO oksidacija celuloze u cilju uvođenja novih funkcionalnih grupa i imobilizacije bioaktivnih supstanci, u ovom radu konkretno hitozana, ali i kao pred-tretman u procesu dobijanja nanofibrilisane celuloze.

1.3.2. TEMPO oksidacija celuloze u cilju imobilizacije bioaktivnih supstanci

U poslednje vreme oksidacija katalizovana nitroksil radikalima poput 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPO) radikala postala je veoma značajna metoda za prevođenje primarnih alkoholnih grupa u odgovarajuće aldehidne i karboksilne grupe materijala na bazi celuloze. Uobičajeni naziv za oksidaciju katalizovanu TEMPO radikalom je TEMPO oksidacija¹². TEMPO oksidisani materijali na bazi celuloze, koji se odlikuju povećanim sadržajem karboksilnih i aldehidnih grupa, pokazali su se kao veoma pogodni nosači za imobilizaciju bioaktivnih supstanci u cilju dobijanja bioaktivnih materijala^{61, 62, 63, 64}.

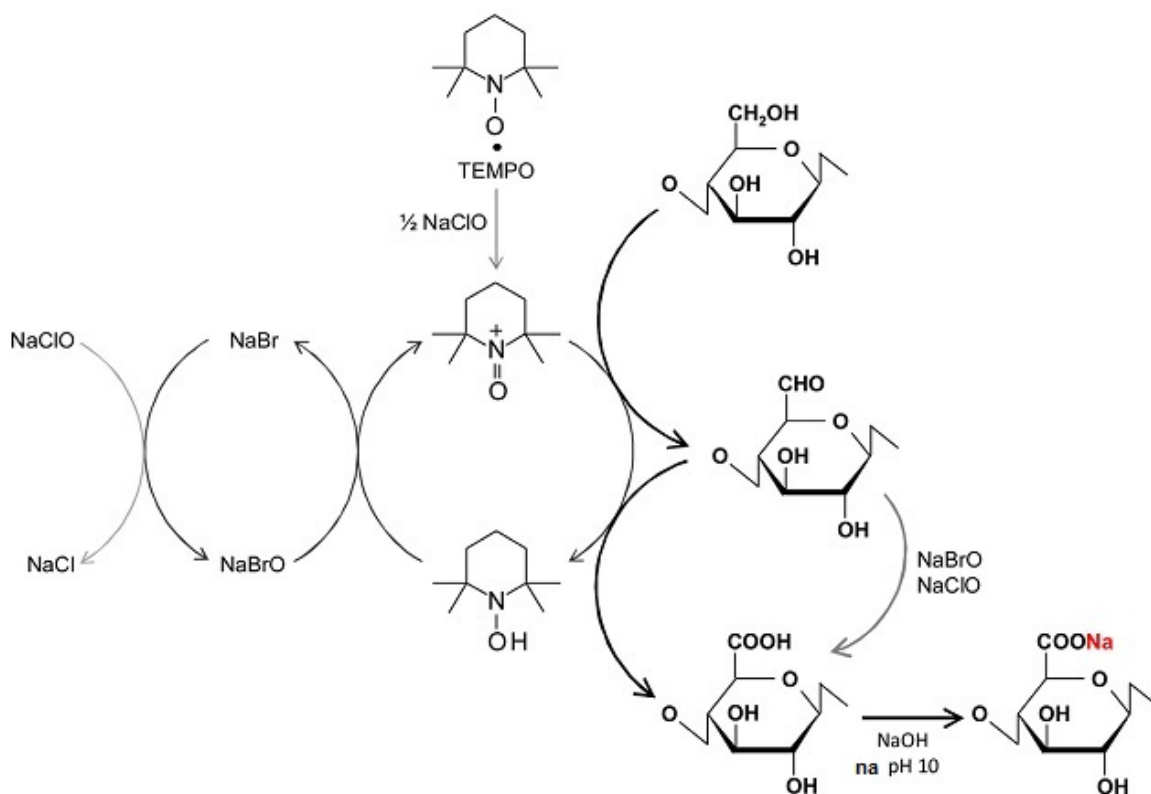
TEMPO oksidacija alkohola u aldehide i ketone prvi put je predstavljena 1983. godine od strane *Semmelhack* i sar.⁶⁵. 1995 godine *de Nooy* i sar.⁶⁶ prvi su sproveli TEMPO oksidaciju na polisaharidima, u alkalnoj sredini (pH 10), sobnoj temperaturi i u prisustvu NaBr i NaClO, primenjenih kao ko-katalizatora i primarnog oksidansa, respektivno. U navedenoj studiji pokazali su da tokom TEMPO oksidacije dolazi do selektivne oksidacije C6 primarnih hidroksilnih grupa skroba, pulana i dekstrana do C6 natrijum-karboksilatnih grupa.

Saito i *Isogai* objavili su seriju radova o TEMPO oksidaciji nativne celuloze. U njihovim istraživanjima pokazano je da se TEMPO oksidacijom sprovedenom u sistemu TEMPO/NaClO/NaBr u alkalnoj sredini (pH 10,5) uvode značajne količine aldehidnih i karboksilnih grupa u celulozu, uz očuvanje morfologije i kristalnosti celuloznih uzoraka^{5, 67}.

TEMPO oksidacija celuloze rađena je u alkalnoj sredini jer je utvrđeno da:

- pri nižim vrednostima pH hipohlorit postaje isuviše agresivan,
- pri nižim vrednostima pH postoji mogućnost da dođe i do neselektivne oksidacije i
- pri nižim vrednostima pH opada reaktivnost TEMPO radikala²³.

Mehanizam TEMPO oksidacije u alkalnoj sredini prikazan je na Slici 10.

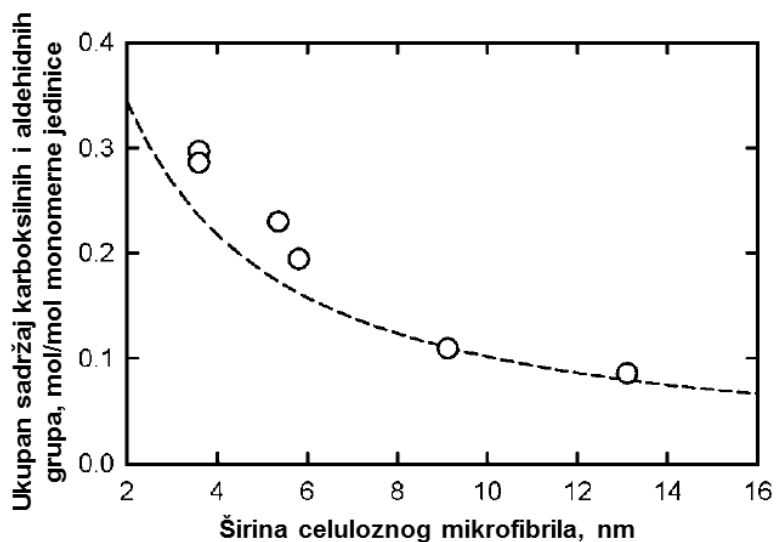


Slika 10. Mehanizam oksidacije C6 primarnih hidroksilnih grupa celuloze u sistemu TEMPO/NaClO/NaBr u alkalnim uslovima pri $\text{pH } 10^{12}$

Ispitivanja urađena nuklearnom magnetnom rezonancom pokazala su da se TEMPO oksidacijom ne narušavaju kristalna područja celuloze, odnosno da se uvedene karboksilne grupe TEMPO oksidisane celuloze uglavnom nalaze na površini kristalnih i u amorfnim područjima⁶⁷.

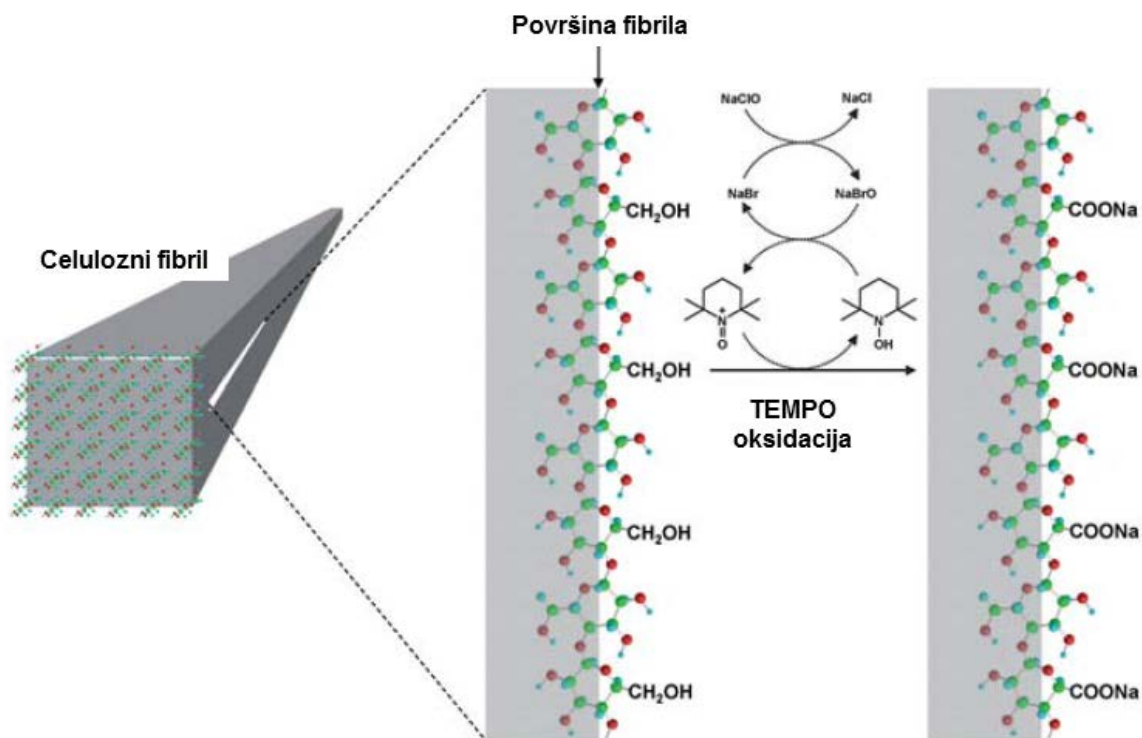
Kada su različiti izvori native celuloze, koji imaju različite širine mikrofibrila, tretirani sa NaClO u višku tokom TEMPO oksidacije, formiran maksimalni sadržaj C6 oksidovanih grupa (karboksilnih i aldehidnih) zavisio je od debljine kristala/mikrofibrila celuloze I¹⁰.

Odnos između debljine mikrofibrila različitih izvora native celuloze i izračunatog sadržaja C6 primarnih hidroksilnih grupa prisutnih na površini mikrofibrila ili eksperimentalno dobijenog maksimalnog sadržaja C6 oksidovanih grupa je grafički prikazani na Slici 11. Isprekidana linija prikazuje odnos između debljine mikrofibrila i sadržaja C6 primarnih hidroksilnih grupa prisutnih na površini kristala celuloze I, a izračunata je iz vrednosti širine kristala celuloze I određene metodom difrakcije X-zraka¹⁰.



Slika 11. Odnos između debljine mikrofibrila različitih nativnih celuloza i ukupnog sadržaja karboksilnih i aldehidnih grupa¹⁰

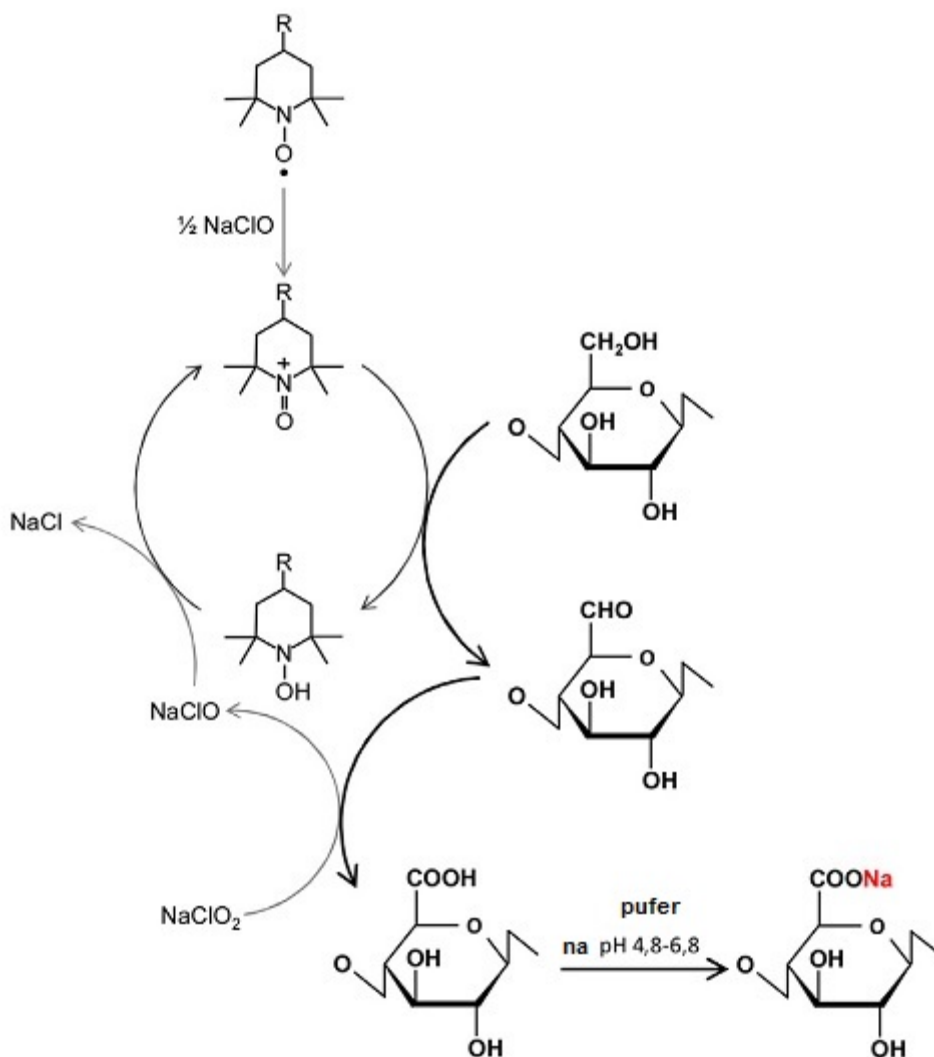
Rezultati prikazani na Slici 11. pokazuju da su izračunate količine površinskih C6 primarnih hidroksilnih grupa u dobroj saglasnosti sa eksperimentalno određenim ukupnim sadržajem C6 oksidovanih grupa; manje širine mikrofibrila nativne celuloze rezultiraju većim sadržajem oksidisanih grupa formiranih na površini mikrofibrila tokom TEMPO oksidacije. S tim u vezi, TEMPO oksidacija selektivno konvertuje C6 primarne hidroksilne grupe prisutne na površini kristala celuloznih mikrofibrila u natrijum-karboksilatne grupe preko aldehidnih intermedijara pri čemu se svaka druga glukozidna jedinica celuloznog lanca na površini mikrofibrila konvertuje u C6 natrijum-karboksilatne grupe (Slika 12.). Stoga, može se reći da je TEMPO oksidacija vrsta regiosektivne modifikacije površine kristala mikrofibrila nativne celuloze i da omogućava formiranje anjonskih karboksilnih grupa na površini mikrofibrila pri veoma velikoj gustini¹⁰.



Slika 12. Šematski prikaz oksidacije C6 primarnih hidroksilnih grupa prisutnih na površini mikrofibrila nativne celuloze u C6 karboksilne grupe upotrebom TEMPO/NaClO/NaBr sistema¹⁰

TEMPO oksidacija izvođena u sistemu TEMPO/NaBr/NaClO u vodi na sobnoj temperaturi i pH 10 dovodi do značajne depolimerizacije molekula celuloze⁶⁸. Alternativni pristup izvođenja TEMPO oksidacije podrazumeva sistem TEMPO/NaClO/NaClO₂ u vodi na povišenim temperaturama i slabo kiselim ili neutralim uslovima. U ovom sistemu, izbegnuta je depolimerizacija celuloze reakcijom β -eliminacije koja se odvija u alkalnoj sredini¹².

Mehanizam TEMPO oksidacije u sistemu TEMPO/NaClO/NaClO₂ u slabo kiseloj ili neutralnoj sredini prikazan je na Slici 13.



Slika 13. Mehanizam oksidacije C6 primarnih hidroksilnih grupa celuloze u sistemu TEMPO/NaClO/NaClO₂ u puferu na pH 4,8-6,8¹²

1.3.3. Naslojavanje celuloze sa TEMPO oksidisanim celuloznim nanofibrilima u cilju imobilizacije bioaktivnih supstanci

Najnovija istraživanja ukazuju na veliki potencijal naslojavanja materijala sa TEMPO oksidisanim celuloznim nanofibrilima za inovativne primene^{69, 70}. Do sada TEMPO oksidisani celulozni nanofibrili nisu korišćeni za naslojavanje materijala na bazi celuloze, a u cilju efikasne imobilizacije bioaktivnih supstanci. S obzirom da je u ovoj doktorskoj disertaciji rađeno na dobijanju TEMPO oksidisanih celuloznih nanofibrila i njihovom naslojavanju na materijale na bazi celuloze radi poboljšane imobilizacije bioaktivnih supstanci, uvođenjem velike količine funkcionalnih grupa na njihovu površinu, u narednom poglavlju će posebna pažnja biti posvećena dosadašnjim dostignućima u dobijanju i primeni TEMPO oksidisanih celuloznih nanofibrila.

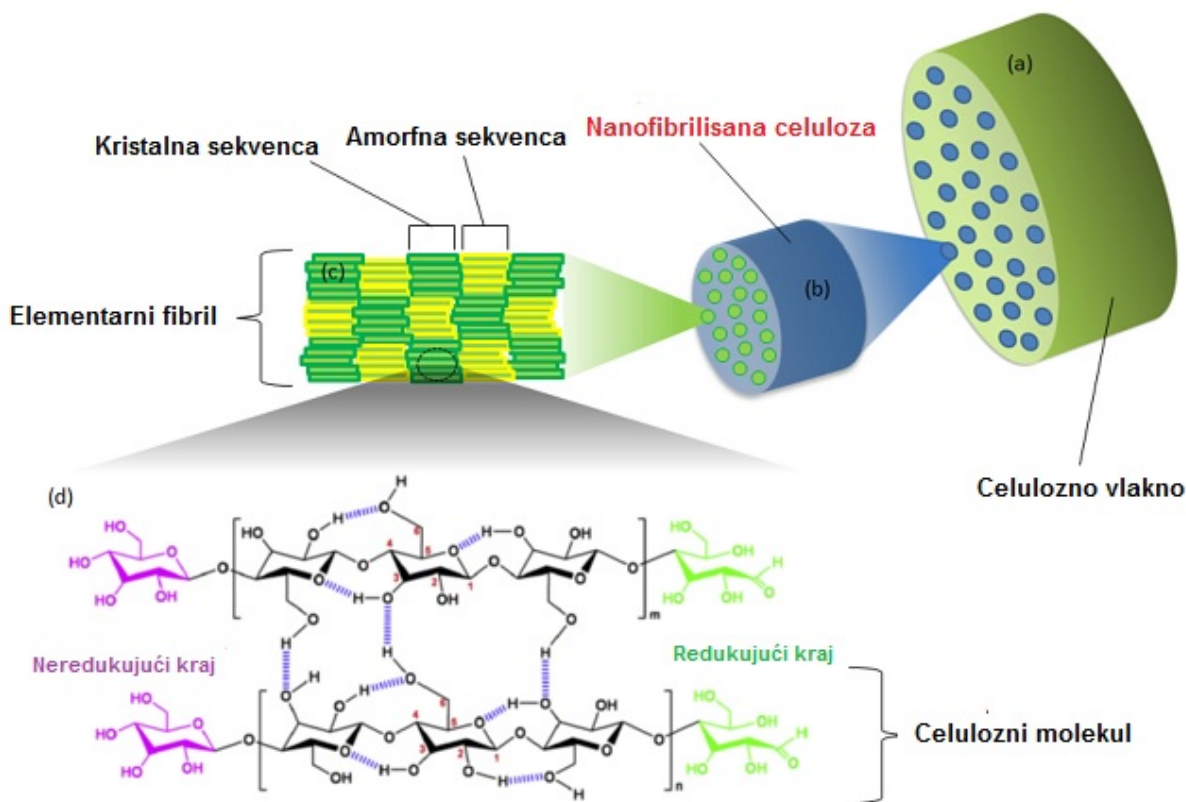
2. Nanofibrilisana celuloza

Nanotehnologije su od velikog značaja u skoro svim savremenim industrijama koje su orijentisane na postizanje visokog kvaliteta, efikasnosti i unapređenja tržišnog potencijala. Veliko interesovanje za nanomaterijale leži u činjenici da oni imaju poboljšana svojstva u poređenju sa istim materijalima većih dimenzija čestica što je posledica njihove povećane specifične površine i novih kvantnih efekata koje materijal stiče ukoliko je nanometarskih dimenzija. Očekuje se da će u bliskoj budućnosti nanotehnologija biti pokretač globalnog ekonomskog rasta i razvoja. Već danas ovo široko i multidisciplinarno polje nagoveštava nove, interesantne mogućnosti, kao i materijale, uređaje i sisteme koji mogu biti, projektovani, proizvedeni i ispitani u nano dimenzijama⁷¹.

Povećana potražnja za materijalima visokih performansi sa prilagodljivim mehaničkim i fizičkim svojstvima čini nanofibrilisanu celulozu najatraktivnijim obnovljivim materijalom za napredne primene. Na jedinstven način, nanofibrilisana celuloza kombinuje važna svojstva celuloze kao što su hidrofилnost, različite mogućnosti hemijskog modifikovanja i formiranje semikristalne vlaknaste strukture sa specifičnim karakteristikama nanodimenzionih materijala koje su uglavnom posledica njihove velike specifične površine⁹.

Postoji duga istorija korišćenja hemijski i mehanički modifikovane celuloze kao i celuloznih vlakana u različitim oblastima, od proizvodnje papira i tekstila, pa sve do "high-tech" materijala poput "flat panel" komponenata u ekranima sa tečnim kristalima, šupljih vlakana za hemodijalizu, komponenata lekova i aditiva. Trenutno je velika pažnja posvećena izolaciji, karakterizaciji, i pronalaženju primena celuloze u obliku nanofibrila. Nove metode za njihovo dobijanje se kreću od enzimskih, hemijskih i fizičkih tretmana kako bi se izolovali iz drveta i drugih izvora celuloze, pa do proizvodnje celuloznih nanofibrila iz glukoze od strane bakterija^{9, 10, 11, 72}. Tako izolovani celulozni materijali prečnika 5-30 nm i odnosa dužina/širina > 50 generalno se nazivaju nanofibrilisana celuloza, dok se celulozni materijali prečnika 10-100 nm i dužine 0,5-50 μm nazivaju mikrofibrilisana celuloza⁷³. Ranije su u literaturi za ovakve celulozne nanomaterijale bili, ravnopravno i bez jasne definicije, upotrebljavani različiti termini poput nanofibrilisana celuloza (NFC), mikrofibrilisana celuloza (MFC), nanofibrili i mikrofibrili⁷⁴, što je, nažalost, dovelo do nejasnoća i nesporazuma. Ovaj problem rešen je u skorije vreme tako što je Tehničko udruženje celulozne i papirne industrije (TAPPI) jasno definisalo standardne termine i dalo definicije za celulozne nanomaterijale na osnovu njihovih dimenzija (TAPPI WI 3021)⁷³. Da bi se izbegli dodatni nesporazumi, u daljem tekstu biće preuzimani termini onako kao su navedeni u korišćenoj literaturi.

Celuloza je proizvod biosinteze biljaka, životinja ili bakterija, dok se opšti pojam "nanofibrilisana celuloza" (NFC) odnosi na izolovane ili obrađene celulozne materijale koji su definisani nano dimenzijama strukturnih elemenata¹¹. Smatra se da se 36 pojedinačnih molekula celuloze u biomasi spaja u veće jedinice poznate kao elementarni fibrili ili mikrofibrili, koji se pakuju u veće jedinice koje se nakon fibrilacije vlakana nazivaju nanofibrilisana celuloza. Nanofibrilisana celuloza se sastoji od agregata celuloznih mikrofibrila (Slika 14.) i može da se posmatra kao celulozni materijal povećanog udela celuloze, koji je umereno degradiran i kojem je značajno povećana specifična površina, dobijen homogenizacionim procesima⁷⁵.



Slika 14. Od izvora celuloze do molekula celuloze, sa naglaskom na nanofibrilisanu celulozu: celulozno vlakno (a), nanofibrilisana celuloza (b), elementarni fibril (c), celulozni molekul (d)⁷⁶

Nanofibrilisana celuloza se, za razliku od celuloznih nanokristala, sastoji kako od kristalnih tako i od amornih delova, što uz veoma veliki odnos dužina/širina nanofibrilisane celuloze omogućava preplitanje nanofibrila i formiranje mrežastih struktura. Nanofibrilisana celuloza se može dobiti mehaničkom dezintegracijom celuloznih materijala bez korišćenja procesa hidrolize⁷⁷.

Turbak i sar.⁷⁸ prvi su patentirali postupak proizvodnje mikrofibrilisane celuloze mehaničkom dezintegracijom. U tom procesu, suspenzija vlakana izolovanih iz drveta prolazi nekoliko puta kroz uski otvor pod visokim pritiskom formirajući viskozni gel. Ova jeftina i nova vrsta celuloze već je iskorišćena za primene kao što su veziva za papir i modifikatori viskoznosti.

Pomenuti patent podstakao je mnoge značajne istraživačke studije sa fokusom kako na optimizaciju mehaničkog postupka, tako i na analizu novostečenih svojstava celuloznog materijala i njegovu primenu^{79, 80, 81}.

Prva sirovina korišćena za proizvodnju MFC je bila drvo, što su objavili *Herik* i sar.⁸². Drvena masa se dezintegriše više puta u homogenizatoru pod visokim pritiskom u cilju dobijanja viskoznog vodenog gela pri veoma niskim koncentracijama MFC (između 2 i 7%), što je jedna od dve glavne karakteristike takvog nanomaterijala. Druga karakteristika se odnosi na sposobnost MFC da formira transparentni film kada se osuši. Oba ova ključna svojstva povezana su sa njegovom velikom specifičnom površinom (koja je najmanje deset puta veća nego kod celuloznih vlakana) i izraženom sposobnošću vezivanja vodoničnim vezama¹¹.

2.1. Dobijanje nano- i mikrofibrilisane celuloze

Celuloza je prisutna u drvetu ili biljkama u kombinaciji sa hemicelulozom i ligninom koji se uglavnom uklanjaju različitim metodama kuvanja i beljenja pre proizvodnje nano- i mikrofibrilisane celuloze. Postupci za njihovo dobijanje obično uključuju nekoliko operacija, npr. sukcesivnu rafinaciju, enzimsku hidrolizu, ponovnu rafinaciju i na kraju homogenizaciju; TEMPO oksidaciju, zatim blendiranje ili homogenizaciju, karboksimetilovanje ili kvaternizaciju, i zatim homogenizaciju¹¹.

*Siro i Plackett*⁷⁵ su objavili pregled postupaka proizvodnje i svojstava MFC, u kom su korišćene tretmane generalno podelili na:

- čisto mehaničke tretmane i
- i postupke sa pred-tretmanima.

Proizvodni proces je kombinacija različitih operacija, čijim variranjem se dobijaju različite vrste fibrilisane celuloze koje se razlikuju u morfologiji (naročito u dimenzijama nanofibrila i količini zaostalih mikroskopskih fragmenata vlakana), hemiji površine, kristalnosti, stepenu polimerizovanja, itd⁸³.

Upotrebom samo mehaničkih tretmana se proizvodi materijal koji je nehomogen i koji može da sadrži veliki udeo slabo fibrilisanih frakcija, dok proizvodnja fibrila homogenih dimenzija može da zahteva velike troškove, uključujući troškove koji se odnose na pred-tretman i veliku potrošnju energije neophodnu za mehaničke tretmane¹¹.

Mehanički tretmani

Suva celulozna pulpa može da se dezintegriše do sitnih fragmenata korišćenjem mehaničkih tretmana. Ipak, oni obično dovode do sečenja vlakana, umesto njihovog razdvajanja do elementarnih fibrila. Shodno tome, dobija se fibrilisana celuloza niskog stepena polimerizovanja, kristalnosti i odnosa dužina/širina, što dalje rezultira relativno slabim mehaničkim svojstvima nanomaterijala koji su od nje izgrađeni. Cilj ovih tretmana je da se premaši energija interfibrilarnih vodoničnih veza kako bi se razdvojili nanofibrili. Iz tog razloga, fibrilisana celuloza se obično proizvodi u vodenom medijumu, što doprinosi slabljenju sistema interfibrilarnih vodoničnih veza¹¹.

Rafinacija, homogenizacija (uz upotrebu homogenizatora i mikrofluidizera) i mlevenje su najčešće tehnike koje se koriste za mehaničku proizvodnju MFC. Ove tehnike su najefikasnije za razdvajanje ćelijskog zida vlakna i izolaciju MFC. Stoga, one se danas koriste za industrijsku proizvodnju MFC. U međuvremenu, proučavane su i druge metode kako bi se pronašla bolja rešenja za proizvodnju MFC¹¹.

Rafinacija

Proces rafinacije, uobičajen u industriji papira, poznat je po bubrenju i razdvajanju ćelijskih zidova vlakna u vodenom medijumu. Rafinacijom se povećava specifična površina i zapremina vlakna tj. povećava se dostupnost mikrofibrila za dalje biološke ili hemijske tretmane zbog čega se ovaj tretman obično koristi kao pred-tretman u proizvodnji NFC. Međutim, postoje i negativni aspekti rafinacije koji se odnose na smanjenje dužine vlakana sečenjem i povećanje njihove finoće⁸³.

Proučavana je i proizvodnja NFC primenom samo rafinacije. *Karande i sar.*⁸⁴ su objavili upotrebu mlina sa diskovima za dezintegraciju osušenih beljenih pamučnih vlakana suspendovanih u vodi pri

koncentraciji od 0,5 mas%. Prosečni prečnik vlakna smanjen je sa oko 25 μm na 242 nm nakon 30 prolaza kroz mlin. Dezintegracioni proces je praćen smanjenjem stepena polimerizovanja od 2720 do 740, kao i smanjenjem kristalnosti. Uprkos pokušajima da se koristi samo proces rafinacije u proizvodnji NFC, ova rasprostranjena tehnika obično omogućava dobijanje veoma heterogenog celuloznog materijala tako da se obično upotrebljava u prvim fazama proizvodnje NFC.

Homogenizacija

Homogenizacija pod visokim pritiskom se koristi za mehaničku dezintegraciju celuloznih vlakana do NFC. U te svrhe, koriste se dva tipa opreme: homogenizatori i mikrofluidizeri⁸³.

Turbak i sar.⁸⁵ su prvi primenili ovaj mehanički tretman, izveden uz korišćenje Gaulin homogenizatora koji se i dalje često koristi za proizvodnju svih vrsta mikrofibrilisane celuloze, a kao rezultat dobijeni su nanofibrili prečnika ispod 100 nm. U ovom tretmanu, celulozna suspenzija se pumpa pod visokim pritiskom i propušta kroz sklop ventila. Ventili se otvaraju i zatvaraju velikom brzinom, tako da su vlakna izložena velikom padu pritiska pri visokim silama smicanja. Ova kombinacija sila omogućava visok stepen fibrilacije celuloznih vlakana.

Homogenizatori su u širokoj upotrebi od strane mnogih istraživača za proizvodnju NFC/MFC bez pred-tretmana⁸⁶ ili sa pred-tretmanom enzimske hidrolize⁸⁷, karboksilacije⁸⁸, itd.

Alternativa Gaulin homogenizatoru je mikrofluidizer u kojem celuloza prolazi kroz tanke komore z-oblika (sa dimenzijama kanala koji su obično 200-400 μm) pod visokim pritiskom. Primenjena stopa smicanja je stoga izuzetno visoka što rezultira formiranjem veoma tankih celuloznih nanovlakana. Ova oprema se sve više koristi s obzirom da omogućava dobijanje vlakana ravnomernijih dimenzija¹¹.

Mikrofluidizeri su korišćeni za izdvajanje celuloznih nanofibrila bez biohemijskih pred-tretmana⁸⁹ ili nakon enzimske hidrolize⁹⁰, karboksimetilovanja⁹¹, itd.

Već dugo vremena glavna prepreka za komercijalni uspeh procesa homogenizacije je velika potrošnja energije koja može da dostigne 70 $\text{MWh}\cdot\text{t}^{-1}$ ⁹². Međutim, sa razvojem metoda pred-tretmana (npr. enzimskih ili oksidacionih) ova vrednost je drastično smanjena na oko 2 $\text{MWh}\cdot\text{t}^{-1}$ ⁹³. Još jedan nedostatak homogenizacije (uglavnom sa mikrofluidizerima) se ogleda u začepljenju sistema pri korišćenju dugačkih vlakana, što ostaje glavni izazov za poboljšanje tog procesa⁹⁴.

Mlevenje

Druga kategorija opreme se zasniva na postupku mlevenja. Masuko© je prvi konstruisao i prodao aparat koji koristi ovaj pristup i koji se obično naziva mlin. Princip se sastoji u degradaciji strukture ćelijskog zida usled smicajnih sila generisanih od strane brusnog kamena. Pulpa prolazi između statičkog i rotirajućeg kamena sa brzinom obrtaja oko 1500 $\text{o}\cdot\text{min}^{-1}$. Nanovlakna koja izgrađuju ćelijski zid višeslojne strukture se tako individualizuju iz pulpe¹¹.

Za razliku od procesa homogenizacije, mlevenje zahteva manje prolaza za dobijanje MFC. Međutim, ovaj proces može da degradira vlakna iz pulpe i smanji njihovu dužinu, što kasnije može da utiče na fizička svojstva MFC¹¹.

Blendiranje

Uetani i *Yano*⁹⁵ su predstavili uspešnu primenu blendera velike brzine u proizvodnji NFC sa uniformnim prečnikom od 15-20 nm od nesusene beljene celuloze iz četinarskog drveta. Analizirano je blendiranje suspenzija celuloze različitih koncentracija, različitim brzinama i u toku različitog vremena

pri čemu je pokazano da obrada suspenzije celulozne pulpe koncentracije od 0,7 mas% na 37000 o·min⁻¹ predstavlja optimalne uslove za proizvodnju NFC korišćenjem ove metode. *Chaker* i sar.⁹⁶ su pokazali da je blendiranjem suspenzije celuloze koncentracije 2 mas% tokom 20 min moguće proizvesti NFC sličnog prinosa u odnosu na suspenziju dobijenu uz upotrebu homogenizatora na 600 bar pri 10 prolaza.

Kriogeno drobljenje

Kriogeno drobljenje je metoda koja se retko koristi, predložena od strane *Dufresne* i sar.⁹⁷ koji su izveli kriogeno drobljenje šećerne repe u cilju dobijanja celulozних mikrofibrila. Kriogeno drobljenje se zasniva na drobljenju, jakim smicajnim silama, pulpe zamrznute tečnim azotom. Formirani kristali leda unutar ćelija tokom mehaničke prerade olakšavaju cepanje ćelijskih zidova i izdvajanje ćelijskih fragmenata¹¹.

Ultrazvučna dezintegracija

Ultrazvučna dezintegracija se sastoji u izlaganju tečnosti ultrazvučnim talasima (> 20 kHz) tj. naizmeničnoj smeni talasa niskog i visokog pritiska što dovodi do stvaranja i raspada kavitacionih mehurića⁸³.

Ovaj tretman stvara jake hidrodinamičke sile smicanja koje razdvajaju ćelijski zid vlakna. Neki istraživači su koristili ovu metodu za proizvodnju NFC bez pred-tretmana⁹⁸ ili posle TEMPO oksidacije⁹⁹. Celulozne suspenzije se nakon ultrazvučne dezintegracije najčešće centrifugiraju kako bi se uklonile slabo fibrilisane frakcije iz NFC⁸³.

Pred-tretmani

Proizvodnja NFC/MFC samo uz upotrebu mehaničkih tretmana zahteva visoku potrošnju energije što objašnjava odsustvo značajnijeg interesovanja za patentiranje pronalazaka baziranih na nano- i mikrofibrilisanju celulozi čak i nekoliko decenija nakon uvođenja ove vrste materijala ranih 1980-ih. Međutim, sprovedena su intenzivna istraživanja kako bi se poboljšala fibrilacija i smanjila potreba za energijom¹⁰⁰. U tom cilju, novije metode proizvodnje fibrilisane celuloze uključuju različite hemijske i biološke pred-tretmane¹¹.

Predloženo je nekoliko strategija kako bi se dobila manje kruta i manje kohezivna vlakna što bi smanjilo energiju potrebnu za fibrilaciju:

- limitiranje vodoničnih veza,
- uvođenje odbojnog naelektrisanja i
- smanjenje stepena polimerizovanja ili amorfnih oblasti između pojedinačnih fibrila celuloze¹¹.

Enzimaska hidroliza

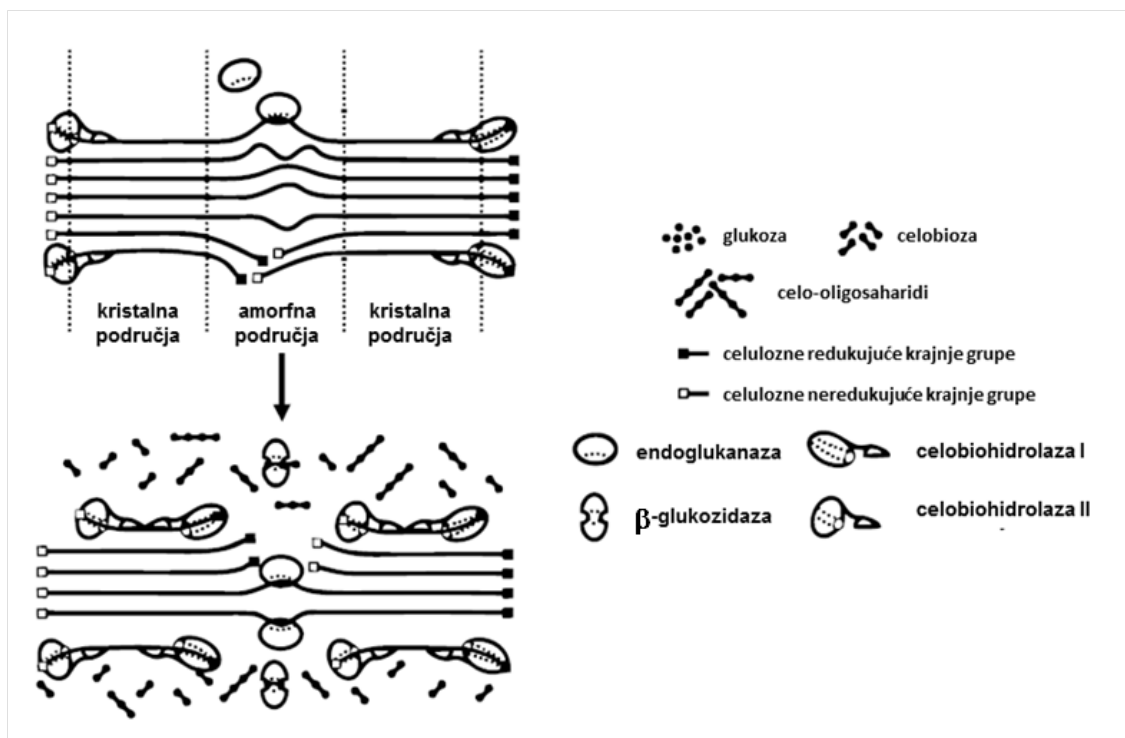
Poznato je da neki enzimi katalizuju hidrolizu celuloze i poboljšavaju njenu fibrilaciju. *Bolaski* i sar.¹⁰¹ su patentirali upotrebu celulaze u cilju poboljšanja fibrilacije celuloze u procesu proizvodnje papira. Od tada su sprovedena obimna istraživanja, od blage enzimske hidrolize, kako bi se olakšao proces prerade, do jake enzimske hidrolize radi pretvaranja celuloze u glukozu za dalju proizvodnju bioetanola¹⁰².

Gljivice su glavni mikroorganizmi koji proizvode celulaze. Generalno, celulaze se mogu podeliti u tri klase:

- endoglukanaze (endocelulaze), koje hidrolizuju amorfna područja celuloze,
- celobiohidrolaze (egzoglukanaze), koje postepeno cepaju krajeve kristalnih ili amorfni područja celuloze do disaharida (celobioze) i tetrasaharida, i
- β -glukozidaze (celobiazе), koje hidrolizuju di- i tetrasaharide do glukoze, što je prikazano na Slici 15.⁸³

U prirodnim celulazama se mogu naći najmanje dve celobiohidrolaze: celobiohidrolaze I i celobiohidrolaze II, koje napadaju redukujuće i neredukujuće krajeve celuloznog lanca, respektivno⁸³.

U procesu enzimske hidrolize, celulaze se mogu ireverzibilno vezati za lignin, stoga ga je neophodno ukloniti pre hidrolize¹⁰³.



Slika 15. Šematski prikaz uticaja različitih celulaza na celulozu⁸³

U skladu sa aktuelnim strategijama, Pääkkö i sar.⁹⁰ su dobili MFC dobro kontrolisanog prečnika u nanometarskom opsegu i visokog odnosa dužina/širina kombinovanjem enzimske hidrolize sa mehaničkim sečenjem i homogenizacijom pri visokom pritisku. Između dve mehaničke faze prerade, primenili su enzimski tretman korišćenjem endoglukanaze. Enzimska hidroliza je manje agresivna nego kisela hidroliza i omogućava selektivnu hidrolizu amorfni oblasti što olakšava mehaničku dezintegraciju. Dodavanje enzima takođe podstiče delaminaciju ćelijskog zida i na taj način sprečava blokadu komore z-oblika mikrofluidizatora.

Pred-tretman endoglukanazama olakšava dezintegraciju celuloznih vlakana iz drveta povećavajući im bubrenje u vodi. Osim toga, ovaj ekološki pred-tretman u odnosu na pred-tretman hidrolize kiselinom

deluje povoljnije na strukturu MFC smanjujući dužinu vlakana i povećavajući stepen finoće materijala⁸⁷.

Engström i sar.¹⁰⁴ su proučavali mehanizam dejstva endoglukanaze i njen uticaj na reaktivnost celuloznih vlakana. Njihovi rezultati su pokazali da enzimski pred-tretman predstavlja veoma obećavajuću metodu za industrijsku primenu.

Acetilovanje

Kalemljenje acetil grupa ima za cilj da smanji hidrofilnost fibrilisane celuloze i poboljša hemijski afinitet između fibrilisane celuloze i nepolarnog rastvarača. *Tingaut* i sar.¹⁰⁵ su razvili biokompozite na bazi acetilovane MFC i polilaktidne kiseline. Acetilovanje MFC sprovedeno je s ciljem poboljšanja njene kompatibilnosti sa matricom od polilaktidne kiseline. Utvrđeno je da sadržaj acetil grupa iznad 4,5% utiče na značajne promene u kristalnoj strukturi MFC (acetil grupe su kalemljene unutar kristalnih područja MFC) i da sprečava njihovu agregaciju nakon sušenja. Nakalemljene acetil grupe na MFC smanjuju međufibrilarno vezivanje vodoničnim vezama i na taj način omogućavaju bolju disperzibilnost MFC u nepolarnom polimernom matriksu.

Karboksimetilovanje

Karboksimetilovanjem se povećava anjonsko naelektrisanje usled formiranja karboksilnih grupa na površini MFC¹¹. *Aulin* i sar.¹⁰⁶ su proizveli karboksimetilovanu MFC i njene dimenzije uporedili sa MFC koja nije podvrgnuta ovom pred-tretmanu i ustanovili da se karboksimetilovanjem uvodi velika količina naelektrisanja na površinu fibrila čime se postiže njihovo lakše oslobađanje. *Taipale* i sar.⁸⁹ su utvrdili da posle karboksimetilovanja potrebna energija fluidizacije iznosi 2,2 MWh·t⁻¹ po prolazu kroz mikrofluidizer kako bi se dobila MFC, dok bez pred-tretmana potrebna energija fluidizacije iznosi 5,5 MWh·t⁻¹ za postizanje istog efekta.

Karboksilovanje posredstvom TEMPO oksidacije

TEMPO oksidacija je trenutno najčešće korišćen pred-tretman za dobijanje NFC/MFC. S tim u vezi, može se reći da TEMPO oksidisani celulozni nanofibrili (TOCN) predstavljaju posebnu kategoriju nanofibrilisane celuloze^{10, 11}.

TEMPO oksidacija je veoma perspektivna metoda modifikacije površine native celuloze gde karboksilne i aldehidne funkcionalne grupe mogu biti uvedene u čvrstu nativnu celulozu pri blagim uslovima i u vodenom medijumu⁵. Pored toga, utvrđeno je da se potrošnja energije uz TEMPO oksidativni pred-tretman u poređenju sa potrošnjom energije ponovljenih ciklusa homogenizacije pod visokim pritiskom (700-1400 MJ·kg⁻¹) drastično smanjuje na vrednosti manje od 7 MJ·kg⁻¹¹⁰.

Osnovni princip ovog pred-tretmana zasniva se na oksidaciji celuloznih vlakana NaClO u prisustvu 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPO) radikala i NaBr, na pH 10-11, u uslovima sobne temperature, pri čemu se C6 primarne hidroksilne grupe celuloze selektivno konvertuju u karboksilne grupe preko aldehidnih intermedijera¹⁰⁷.

Kao rezultat toga, nanofibrili unutar vlakna se bolje razdvajaju jedni od drugih zahvaljujući odbojnim silama među jonizovanim karboksilnim grupama koje premašuju privlačne vodonične veze koje ih drže zajedno. Sa povećanjem dodatog NaClO i vremena oksidacije, povećava se i sadržaj karboksilnih grupa formiranih na površini NFC¹⁰⁸.

Saito i sar.⁹⁹ su primenili ovaj pred-tretman na celulozi različitog porekla: drvnoj pulpi, pamučnom lintersu, plaštašima, bakterijskoj celulozi, ramiji, pa čak i na holocelulozi iz omorike.

Oni su definisali oksidativnu efikasnost njihovog pred-tretmana sledećom jednačinom⁶⁷:

$$\text{Oksidativna aktivnost} = 100 \times \frac{\{(C_T - C_O) + (A_T - A_O)\}}{M_{NaClO}} \quad (1)$$

gde je:

M_{NaClO} - količina dodatog NaClO ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ celuloze),

C_O - sadržaj karboksilnih grupa pre oksidacije ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ celuloze),

C_T - sadržaj karboksilnih grupa posle oksidacije ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ celuloze),

A_O - sadržaj aldehidnih grupa pre oksidacije ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ celuloze),

A_T - sadržaj aldehidnih grupa posle oksidacije ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ celuloze).

TEMPO oksidativni pred-tretman uglavnom je praćen mehaničkim tretmanom, koji može biti izveden korišćenjem kuhinjskog blendera ili ULTRA-TURRAX® sistema. Uklanjanje nepotpuno fibrilisane NFC se postiže centrifugiranjem što je za sada ograničeno na laboratorijski nivo¹¹.

U drugim pristupima, poput onih koje su predložili Eichorn i sar.¹⁰⁸, Johnson i sar.¹⁰⁹, umesto blendiranja koristi se ultrazvučni tretman u cilju dobijanja TOCN. Ovi istraživači su primetili da vreme ultrazvučnog tretmana utiče na prinos nanofibrila. Prema TEM merenjima, nakon 20 min ultrazvučnog tretmana 97,5% suspenzije vlakana je prevedeno u NFC širine 3-5 nm. Li i Renneckar¹¹⁰ su u svojoj studiji, korišćenjem AFM, ustanovili da nakon 30 min ultrazvučnog tretmana prosečna debljina nanofibrila iznosi 1,38 nm, a dužina 580 nm. Duže vreme ultrazvučnog tretmana (4 h) je imalo značajan uticaj na dimenzije nanofibrila, tj. debljina se smanjila na 0,74 nm, a dužina na 260 nm.

S obzirom da je u ovoj doktorskoj disertaciji rađeno na dobijanju TEMPO oksidisanih celuloznih nanofibrila i njihovoj daljoj primeni u dobijanju bioaktivnih nanostrukturnih materijala na bazi celuloze i hitozana, u narednom poglavlju će biti posvećena pažnja literaturnom pregledu rezultata dobijenih iz dosadašnjih istraživanja svojstava TEMPO oksidisanih celuloznih nanofibrila.

Kvaternizacija

U poređenju sa karboksimetilovanjem ili karboksilovanjem, kojima se uvodi anjonsko naelektrisanje na površinu celuloze, kvaternizacijom se vrši katjonizacija celuloze¹¹¹. Karande i sar.⁸⁴ su primenili ovaj pristup kako bi se olakšala proizvodnja NFC tokom dalje mehaničke dezintegracije. Nakon kvaternizacije, proces dezintegracije pulpe postaje lakši zbog elektrostatičkog odbijanja između kvaternarnih amonijum katjona na površini nanofibrila.

2.2. TEMPO oksidisani celulozni nanofibrili

NFC inicijalno je nastala u obliku vodenih disperzija. One zadržavaju veliku količinu vode zbog veoma hidrofilne prirode celuloze. NFC disperzije poznate su po tome što se odlikuju svojstvima gela čak i pri niskim koncentracijama celuloze, npr. 0,125 mas%, što se dešava kada se prekorači kritična koncentracija nanofibrila. U tom slučaju dolazi do formiranja mrežne strukture, koja je u vezi sa odnosom dužina/širina mikrofibrila, pri čemu se jačina ove mreže progresivno povećava sa povećanjem koncentracije celuloze⁹⁰.

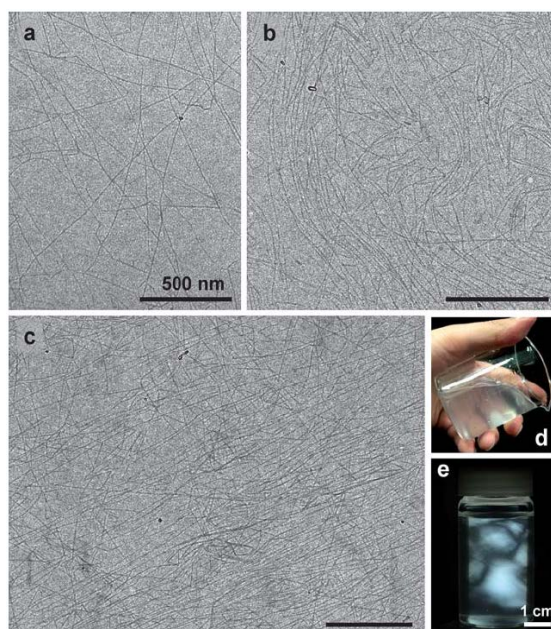
U zavisnosti od proizvodnog procesa dobijene NFC vodene disperzije imaju različita svojstva. Bez obzira na proizvodne metode, kao i biološke ili hemijske pred-tretmane, sve one pokazuju gelasto, pseudoplastično i tiksotropno ponašanje pri niskom sadržaju čvrste supstance. Takođe, ove disperzije se mogu dalje konvertovati u druge NFC oblike: hidrogelove, aerogelove, prahove ili filmove⁸³.

Kada se TEMPO oksidacija primeni na nemodifikovana celulozna vlakna, njihova defibrilacija postaje lakša i posledično mehanički tretmani zahtevaju manju potrošnju energije. Sadržaj karboksilnih grupa od oko 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ omogućava smanjenje broja prolaza na homogenizatoru potrebnih za dobijanje gela MFC. Generalno, gel se može dobiti nakon 5–60 prolaza, bilo da se radi o homogenizatoru ili mlinu sa kuglama, a sve u zavisnosti od izvora celuloze i primenjenog pred-tretmana⁷³.

Prinos nanofibrila, propustljivost svetlosti i viskoznost TOCN vodenih disperzija zavise od upotrebljene aparature i primenjenih uslova tokom mehaničkog tretmana. U laboratorijskim uslovima za mehaničku dezintegraciju TEMPO oksidisanе celuloze može se primeniti jedan ili kombinacija više sledećih metoda: magnetno mešanje, blendiranje, homogenizacija homogenizatorom dvocilindričnog tipa i ultrazvučna homogenizacija. Svakom od navedenih dezintegracionih metoda moguće je postići prinos nanofibrila od preko 95% za TEMPO oksidisanе celuloze sa sadržajem karboksilnih grupa većim od 0,8 $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$. Međutim, različiti uređaji za mehaničku dezintegraciju zahtevaju različito vreme kako bi se njihovom upotrebom postigao maksimalan prinos nanofibrila¹⁰.

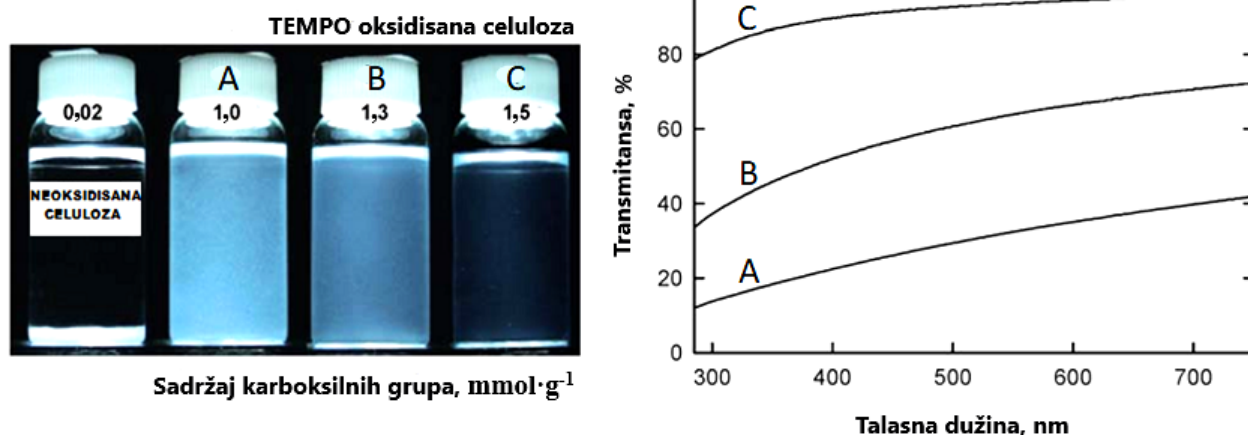
TOCN vodene disperzije imaju slično pseudoplastično ponašanje bez obzira na korišćene metode mehaničke dezintegracije. Međutim, viskoznosti dobijenih disperzija su različite u zavisnosti od dezintegracionih metoda i prate sledeći trend: magnetno mešanje > blendiranje > ultrazvučna homogenizacija. Vreme mehaničke dezintegracije potrebno za prinos preko 95% je različito uz korišćenje različite aparature (magnetno mešanje > blendiranje > ultrazvučna homogenizacija). Najveći prinos TOCN se postiže upotrebom ultrazvučnog homogenizatora, ali tako dobijene TOCN disperzije imaju relativno nisku viskoznost^{112, 113}.

Prečnik i dužina nanofibrila u TOCN disperzijama mogu se utvrditi mikroskopskim tehnikama, a kao indikator da se disperzije sastoje iz pojedinačnih nanofibrila (prečnika 3-4 nm) veoma često se koristi fenomen dvojnog prelamanja svetlosti (Slika 16.)⁸.



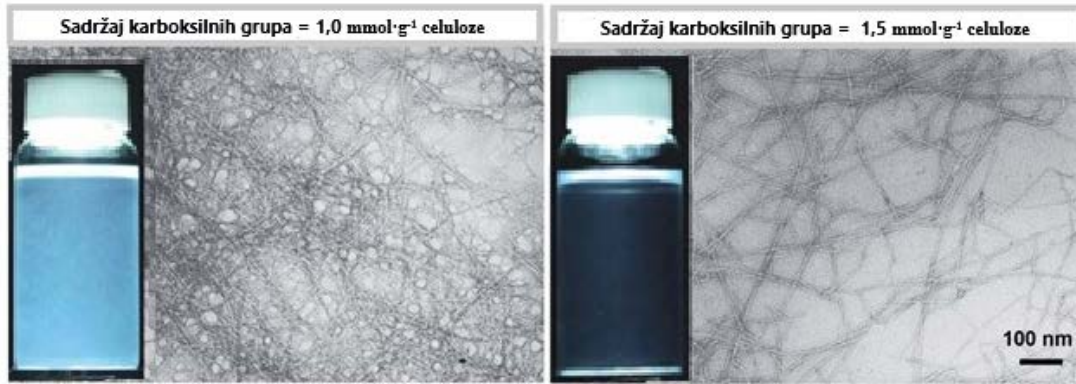
Slika 16. TEM fotografije osušene disperzije TEMPO oksidisanih celuloznih nanofibrila iz listopadnog drveta sa sadržajem karboksilnih i aldehydnih grupa od 0,8 i 0,0 mmol·g⁻¹, respektivno (a-c); tipičan izgled TOCN disperzije (d); izgled TOCN disperzije posmatrane u polarizovanoj svetlosti (e)¹⁰

Propustljivost svetlosti kroz TOCN vodene disperzije pripremljene uz iste uslove mehaničke dezintegracije, sa sadržajem karboksilnih grupa od 1,0 i 1,5 mmol·g⁻¹ celuloze, varira od delimične do visoke transparentnije, respektivno (Slika 17.). UV-vis transmisioni spektar na Slici 17. pokazuje da je propustljivost svetlosti zavisna od talasne dužine kao i da je povezana sa debljinom nanofibrila. Dakle, sadržaj karboksilnih grupa je ključni faktor koji utiče na stepen fibrilacije TEMPO oksidisanе celuloze¹¹².



Slika 17. Izgled disperzija i UV-vis transmisija TEMPO oksidisanih celuloznih nanofibrila iz listopadnog drveta sa različitim sadržajem karboksilnih grupa, modifikovano iz¹¹²

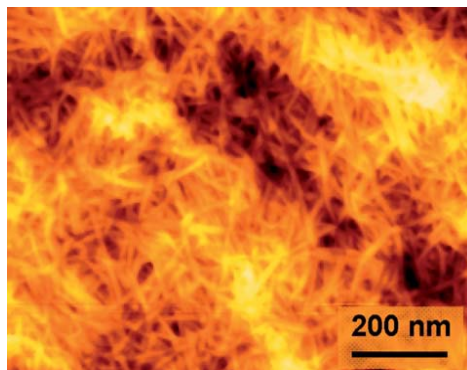
Na Slici 18. su prikazane SEM fotografije TOCN, dobijene iz listopadnog drveta, sa sadržajem karboksilnih grupa od 1,0 i 1,5 mmol·g⁻¹ celuloze. Jasno se može uočiti da celulozni nanofibrili sa sadržajem karboksilnih grupa od 1,0 mmol·g⁻¹ celuloze formiraju agregate što rezultuje u slabijoj propustljivosti svetlosti kroz disperziju. S druge strane, celulozni nanofibrili sa sadržajem karboksilnih grupa od 1,5 mmol·g⁻¹ celuloze ne formiraju agregate; njihova debljina od 3-4 nm je manja od talasne dužine vidljive svetlosti, a anjonsko naelektrisanje na površini je dovoljno veliko da izazove međusobno odbijanje što sveukupno dovodi do toga da je njihova disperzija gotovo transparentna¹⁰.



Slika 18. SEM fotografije osušenih TOCN disperzija sa sadržajem karboksilnih grupa 1,0 i 1,5 mmol·g⁻¹ celuloze i vizuelni izgled TOCN disperzija, modifikovano iz¹¹²

Sušenjem NFC disperzija mogu se dobiti NFC filmovi čija svojstva variraju u zavisnosti od vrste upotrebene NFC i korišćenog postupka za njegovo formiranje. Nakon uklanjanja vode iz NFC disperzije formira se mreža nanofibrila uspostavljanjem interfibrilarnih vodoničnih veza. Postoji nekoliko metoda koje se trenutno koriste za proizvodnju takvih filmova, kao npr. sušenje vazduhom, filtracija pod pritiskom, termopresovanje, sprej tehnika, 3D štampa ili metoda rotirajućeg diska^{83, 114, 115}.

Mikroskopijom atomskih sila (AFM) je pokazano da se TOCN film sastoji iz nasumično udruženih nanofibrila, što je prikazano na Slici 19.¹¹⁶



Slika 19. AFM fotografija TOCN filma dobijenog od TEMPO oksidisane celuloze iz četinarskog drveta¹¹⁶

NFC filmovi obično poseduju visok nivo transparentnosti (80-90%) u vidljivom spektru talasnih dužina jer male dimenzije nanovlakana i njihovo gusto pakovanje značajno smanjuju rasipanje svetlosti⁸³.

U slučaju TOCN filmova, COONa grupe prisutne na površini TOCN ne mogu da formiraju vodonične veze pa je njihova mehanička svojstva moguće poboljšati prevođenjem COONa grupa u COOH grupe, npr. izlaganjem parama kiselina¹⁰.

TOCN filmovi dobijeni od celuloze oksidisane u sistemu TEMPO/NaClO/NaClO₂ u vodi na pH 6,8 imaju veću otpornost na istežanje, verovatno zbog većeg stepena polimerizovanja celuloze, u odnosu na one koji su dobijeni u sistemu TEMPO/NaBr/NaClO u vodi na pH 10. Međutim, njihovi elastični moduli su slični bez obzira na vrstu upotrebljenog sistema za TEMPO oksidaciju¹¹⁷.

Visoka hidrofilnost TOCN filmova čini ih osetljivim na dejstvo vode. Ugao kvašenja TOCN filma u interakciji njegove površine sa kapi vode iznosi 47° i vremenom se snižava. Njihova hidrofobizacija se obično postiže metodom kvašenja uz upotrebu katjonske alkil keten dimer (AKD) disperzije. Karboksilatne grupe na površini TOCN filma verovatno predstavljaju adsorpciona mesta za katjonske AKD dispergovane čestice. TOCN film tretiran sa 0,05% AKD disperzijom ima ugao kvašenja od 94° koji ostaje nepromenjen i nakon 10 s¹¹⁶. Pored toga, utvrđeno je da se hidrofilna svojstva TOCN filmova mogu kontrolisati i jonskom izmenom natrijuma iz karboksilatnih grupa sa drugim jonima metala⁸. Dobijanje hidrofobnih TOCN postignuto je i jonskom izmenom TEMPO oksidisane celuloze sa tetra-*n*-butilamonijum jonima uz njenu naknadnu mehaničku dezintegraciju u vodi i *N,N*-dimetilformamidu, respektivno. Disperzije TOCN sa tetra-*n*-butilamonijum kontrajonima (u vodi i *N,N*-dimetilformamidu) upotrebljene su za dobijanje kompozitnih filmova na bazi gume (kao matriksa) i hidrofobizovanog TOCN (kao punioca). Oba kompozitna filma pokazala su visoke *Young*-ove module od ~45 MPa i niske koeficijente termičkog širenja od ~20 ppm·K⁻¹, pri masenom odnosu hidrofobizovanog TOCN/guma = 5/100, bez obzira da li je za njihovo korišćenje bila upotrebljena disperzija hidrofobizovanog TOCN u vodi ili *N,N*-dimetilformamidu. Međutim, zatezna čvrstoća i prekidno izduženje ovih kompozitnih filmova su se razlikovale, što je posledica različite homogenosti raspodele hidrofobizovanih TOCN u gumi u zavisnosti od toga da li je za njihovo dobijanje bila korišćena disperzija hidrofobizovanog TOCN u vodi ili *N,N*-dimetilformamidu¹¹⁸.

TOCN filmovi imaju manju termičku stabilnost od nativne celuloze usled formiranja natrijum-karboksilatnih grupa na površini mikrofibrila celuloze i promena u sistemu vodoničnih veza. Tako termička degradacija TOCN filmova, dobijenih od celuloze iz četinara, počinje na oko 200 °C u atmosferi azota, a kod nativne celuloze na oko 300 °C. Termičko širenje TOCN filmova je veoma malo; koeficijent termičkog širenja TOCN filma je približno 2,7 ppm·K⁻¹, što je znatno niže nego stakla (oko 9 ppm·K⁻¹). Izuzetno nizak koeficijent termičkog širenja je posledica visoke kristalnosti nanofibrila od kojih se sastoji TOCN film¹¹⁶.

Zbog izuzetnih svojstava TOCN koji se mogu dispergovati do potpuno individualnih fibrila prečnika 3-4 nm i odnosa dužina/širina>50, a koji na svojoj površini imaju veliku gustinu karboksilatnih grupa, dobijeni filmovi su visokotransparentni, superiornih mehaničkih i barijernih svojstava. U cilju daljeg unapređenja svojstava filmova na bazi TOCN, kao što su hidrofilnost/hidrofobnosti, transparentnost, fleksibilnost, savitljivost, lakoća oblikovanja u filmove i sl. razvijani su i različiti kompozitni filmovi na bazi TOCN i alginata, polivinilalkohola, SiO₂, polipirola i dr¹¹⁹. Istraživanja o primeni nanofibrilisane celuloze kao sredstva za naslojavanje počela su tek nedavno, pri čemu je naslojavanje nanofibrilisane celuloze uglavnom vršeno na papiru. Utvrđeno je da debljina i formulacija nanosenog sloja imaju ključnu ulogu u rezultirajućim svojstvima naslojenog papira. Do sada je primenjeno nekoliko metoda za naslojavanje kao što su nanošenje filma metodom pokretnog noža, naslojavanje raspršivanjem, naslojavanje presovanjem i naslojavanje valjcima, pri čemu je pokazano da pomenute metode omogućavaju variranje gustine i efikasnosti naslojavanja. Na primer, naslojavanje metodom

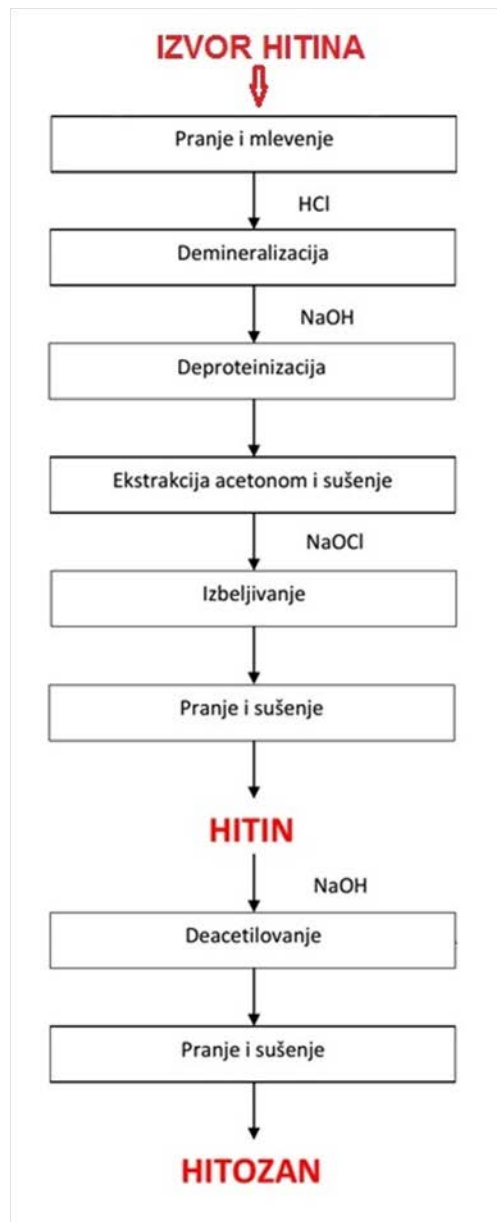
pokretnog noža, koja je najčešće upotrebljavana metoda, pokazalo se da omogućava veću gustinu naslojavanja MFC u odnosu na naslojavanje presovanjem¹²⁰.

Ultra-tanki filmovi (debljina < 100 nm) predstavljaju važnu kategoriju savremenih materijala. Osnovni problem sa deponovanjem ultra-tankih filmova na bazi nanofibrilisane celuloze je njena sklonost da formira gel čak i pri vrlo niskim (~1 mas.%) koncentracijama, jer gelovi generalno nisu pogodni za deponovanje ultra-tankih filmova. Na primer, podešavanje debljine ultra-tankih filmova na bazi nanofibrilisane celuloze metodom rotirajućeg diska nije izvodljivo ukoliko se ne može primeniti veća koncentracija njene disperzije usled geliranja odnosno povećanja viskoznosti. Dobijanje ultra-tankog filma sa potpunim prekrivanjem metodom rotirajućeg diska nije jednostavno čak ni primenom vrlo razblaženih disperzija. *Wilson* i sar.¹²¹ su elektroforetskom depozicijom postigli dobijanje ultra-tankih filmova na bazi TOCN čija je debljina uspešno podešavana u širokom opsegu. Pored problema podešavanja debljine ultra-tankih filmova na bazi nanofibrilisane celuloze, TOCN nisu popularni za izradu ultra-tankih filmova i zbog njihove nestabilnosti nakon depozicije: TOCN imaju tendenciju da se otpuštaju usled velike gustine naelektrisanja¹¹⁵. Stoga, dobijanje ultra-tankih filmova na bazi TOCN povezano je uglavnom sa slučajevima koji nisu uključivali njihovo izlaganje tečnostima, kao na primer u radu *Hakalahti* i sar.¹²² koji su ispitivali reakcije ultra-tankih filmova na bazi TOCN sa vodenom parom.

3. Hitozan

Hitin je 1811. godine otkrio francuski hemičar i farmaceut *Henri Braconnot* prilikom izučavanja gljiva^{123, 124}. Hitin je najrasprostranjeniji prirodni aminopolisaharid i drugi po rasprostranjenosti među polisaharidima, odmah posle celuloze. Poreklo naziva hitin (*engl.* chitin) vodi od grčke reči hiton (*chiton*) koja znači ogrtač, oklop, jer hitin ima funkciju zaštitnog oklopa za beskičmenjake. Hitin, osnovni izvor za dobijanje hitozana, nastaje biosintezom pri čemu se monomeri *N*-acetil-D-glukozamina međusobno povezuju u enzimatski katalisanoj reakciji. Najviše ga ima u egzoskeletu ljuskara i insekata. U vrlo maloj količini sreće se kod nižih biljaka¹²⁵. Njegova proizvodnja u prirodi iznosi oko 10¹¹ tona godišnje¹²⁶. Iako se u literaturi mogu naći brojni postupci za izdvajanje hitina iz oklopa ljuskara, uobičajeni postupak podrazumeva demineralizaciju, deproteinizaciju i dekolorizaciju. Minerali se rastvaraju upotrebom kiseline, proteini se hidrolizuju alkalijom, a pigmenti se uklanjaju rastvaračima i/ili oksidansima, gde se najčešće vrši ekstrakcija sa acetonom nakon čega sledi beljenje sa natrijum-hipohloritom (Slika 20.)¹²⁵.

Hitozan je otkrio *Rouget* 1859. godine tokom kuvanja hitina u koncentrovanom rastvoru kalijum-hidroksida, što je rezultovalo deacetilovanjem hitina^{123, 124}. Hitozan se uglavnom dobija industrijskim putem (alkalnim deacetilovanjem hitina), jer se u prirodi javlja u vrlo malim količinama¹²⁵. Iako je dugo vremena bio zanemaren, uglavnom zbog ograničene reaktivnosti i preradivosti, njegova primena je u poslednje vreme drastično porasla s obzirom da se odlikuje širokim spektrom bioloških aktivnosti^{4, 123, 125, 126, 127, 128, 129, 130}.



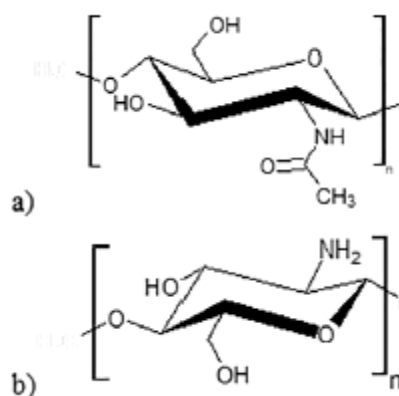
Slika 20. Šema dobijanja hitina i hitozana, modifikovano iz¹³¹

Specifična polikatjonska priroda hitozana odgovorna je za njegova brojna biološka svojstva poput mukoadhezivnosti, hemostatičnog, antimikrobnog i hipoholesterolemičnog delovanja¹³⁰. Hitozan ulazi u sastav komercijalno dostupnih preparata/sredstava za terapiju rana zahvaljujući stimulaciji proliferacije ćelija i obnavljanja tkiva, antimikrobnom, hemostatskom i blagom analgetičkom delovanju. U odnosu na sintetičke biološki aktivne supstance koje se danas masovno koriste, prirodne biološki aktivne supstance kao što je hitozan imaju prednost zbog biokompatibilnosti, biodegradabilnosti, bioaktivnosti i netoksičnosti^{126, 132, 133}.

3.1. Molekulska struktura hitozana

Hitozan je linearni heteropolisaharid, sastavljen iz 2-acetamido-2-deoksi- β -D-glukopiranoze i 2-amino-2-deoksi- β -D-glukopiranoze povezanih β -1,4-glikozidnim vezama, koji se, kao što je već rečeno, dobija parcijalnim deacetilovanjem hitina¹²⁶. Strukturna formula hitozana predstavljena je na Slici 21.

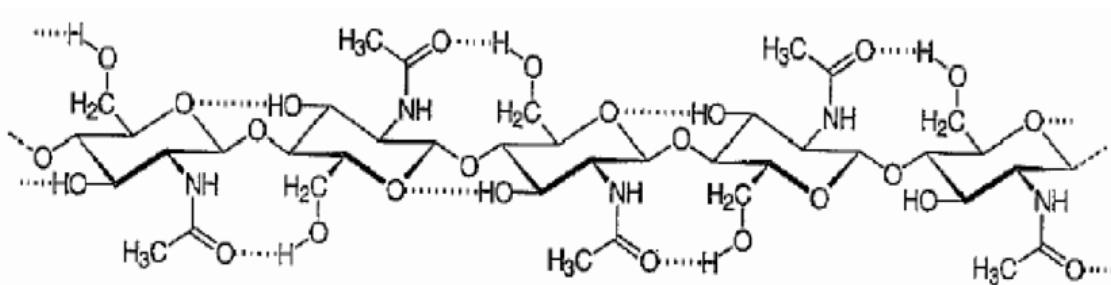
Hitin je po strukturi sličan celulozi (Slika 21.), uz tu razliku što je OH grupa na C2 atomu svake glukozidne jedinice hitina zamenjena acetilovanom amino grupom. Slično celulozi, hitin je hemijski inertan, čak i inertniji od celuloze. Za razliku od hitina koji je hemijski inertan, amino grupa u hitozanu je sposobna za veliki broj reakcija. Međutim, potpuno deacetilovanje hitina uobičajenim procedurama nije moguće tako da komercijalni hitozan sadrži obično 15-25% acetilovanih amino grupa¹²⁵.



Slika 21. Struktura hitina (a) i hitozana (b)¹²⁹

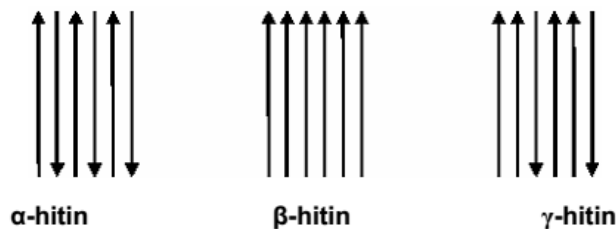
Sistem intravodoničnih veza u kristalnoj strukturi hitina (Slika 22.) povećava njegovu krutost. Svaka jedinica hitina uspostavlja dve intramolekulske vodonične veze:

- između susednih prstenova vezivanjem karbonilne grupe za hidroksilnu grupu na C6 ugljenikovom atomu i
- između OH grupe na C3 ugljenikovom atomu i kiseonikovog atoma na susednom prstenu¹²⁵.



Slika 22. Hemijska struktura hitina sa intramolekulskim vodoničnim vezama¹²⁵

Nadmolekulska struktura hitina i hitozana vrlo je slična nadmolekulskoj strukturi celuloze. S obzirom da je pakovanje makromolekula hitina u kristalnu rešetku slično kao kod celuloze, i kod hitina se, zavisno od rasporeda makromolekula unutar kristalnih područja, javljaju tri kristalne forme: α , β i γ hitin (Slika 23.). Za razliku od celuloze koja se u prirodi javlja samo kao celuloza I, hitin se u prirodi javlja u tri oblika, ponekad čak i u istom organizmu¹²⁵.



Slika 23. Raspored makromolekula u tri kristalne forme hitina¹²⁵

3.2. Fizičko-hemijska svojstva hitozana

Fizička svojstva hitozana zavise od brojnih parametara kao što su molekulska masa, stepen deacetilovanja, raspored amino i acetamido grupa i čistoća dobijenog hitozana¹³⁴.

U čvrstom stanju, hitozan je semikristalni polimer¹²⁷. Kao i većina polisaharida, prilikom zagrevanja razgrađuje se pre nego što počne da se topi, što je posledica razvijenog sistema vodoničnih veza¹²⁶, pri čemu njegova termička razgradnja posebno dolazi do izražaja na temperaturama višim od 200 °C¹³⁵. Nije termoreaktivan, ali vezivanjem određenih hidrosilnih ili amfilfilnih polimera može se uticati na njegovo termoreaktivno ponašanje¹³⁶.

Slabo je rastvorljiv u organskim rastvaračima i vodi na fiziološkom pH, što značajno ograničava njegovu primenu. Međutim, modifikacijama poput karboksimetilovanja, kvaternizacije i sulfonacije moguće je poboljšati njegovu rastvorljivost u vodi¹³⁷. Lako je rastvorljiv u razblaženim rastvorima kiselina s obzirom da predstavlja jaku bazu usled prisustva primarnih amino grupa. Promene pH direktno utiču na promenu naelektrisanja amino grupa, a time i rastvorljivost hitozana. Sa snižavanjem pH vrednosti amino grupe postaju protonovane u većoj meri, čineći hitozan rastvorljivijim. Nasuprot tome, sa povećavanjem pH vrednosti amino grupe postaju deprotonovane u većoj meri, čineći hitozan manje rastvorljivijim¹³⁴. Eksperimentalno određena vrednost pK_a hitozana kreće se između 6 i 6,5¹³⁴, odnosno 6,2 i 7¹³⁷. Navedene različite vrednosti mogu se objasniti činjenicom da pK_a vrednost u velikoj meri zavisi od broja slobodnih amino grupa, odnosno stepena deacetilovanja hitozana. Samim tim rastvorljivost hitozana je zavisna od stepena deacetilovanja, pri čemu ne treba zanemariti ni uticaj primenjene metode za deacetilovanje¹³⁸. Generalno, hitozani sa stepenom deacetilovanja višim od 50% smatraju se rastvorljivim u razblaženim rastvorima kiselina¹²⁹.

Pored rastvorljivosti, viskoznost rastvora hitozana je veoma bitna karakteristika, posebno imajući u vidu njegovu primenu za izradu filmova i naslojavanje različitih materijala. Na viskoznost rastvora hitozana utiču kako molekulska masa, stepen deacetilovanja i koncentracija hitozana u rastvoru, tako i jonska jačina, pH vrednost i temperatura rastvora. Sa porastom molekulske mase i stepena deacetilovanja hitozana, kao i sa porastom njegove koncentracije u rastvoru, raste i viskoznost njegovih

rastvora, dok povećanje temperature i pH vrednosti rastvora hitozana dovodi do smanjenja viskoznosti njegovih rastvora. Zbog bolje rastvorljivosti u vodi i niže viskoznosti rastvora, za neke oblasti primene, hitozani manje molekulske mase imaju prednost u odnosu na hitozane velike molekulske mase¹³⁹. Kod vrlo razblaženih rastvora hitozana dolazi do abnormalnog porasta viskoznosti u odsustvu soli. Ova pojava se može objasniti činjenicom da suprotno naelektrisani joni mogu lako da napuste neposrednu okolinu molekula hitozana u vrlo razblaženom rastvoru, što dovodi do rasta efektivnog naelektrisanja sklopčanih molekula hitozana koje omogućava njihovo opružanje¹²⁵.

Na kraju važno je istaći i da, usled prisustva slobodnih NH₂ grupa na C2 atomu 2-amino-2-deoksi-β-D-glukopiranozne jedinice, hitozan poseduje izraženu sposobnost kompleksiranja sa jonima metala, koja pak zavisi kako od fizičkog stanja, stepena deacetilovanja i rasporeda slobodnih NH₂ grupa hitozana, tako i od pH vrednosti okolnog medijuma, vrste i sadržaja katjona. Sposobnost kompleksiranja jona metala raste sa povećanjem stepena deacetilovanja, odnosno sa povećanjem broja slobodnih NH₂ grupa. Čak i oligosaharidni hitozani sa najmanje 6 monomernih ostataka poseduju ovo svojstvo¹²⁷. Opšte je prihvaćeno da se mehanizam kompleksiranja hitozana sa jonima metala zasniva na interakcijama između jona metala i slobodnih elektronskih parova atoma azota koji se nalaze na molekulu hitozana, pri čemu jedan jon metala može da se veže samo za jedan atom azota¹⁴⁰. Afinitet hitozana nije isti za sve jone metala, što se može videti na primeru niza dobijenog za dvo- i trovalentne jone metala iz njihovih hloridnih soli: Cu²⁺ >> Hg²⁺ > Zn²⁺ > Cd²⁺ > Ni²⁺ > Co²⁺ ~ Ca²⁺ > Eu³⁺ > Nd³⁺ > Cr³⁺ ~ Pr³⁺¹²⁷.

Takođe, hitozan može da stupa u elektrostatičke interakcije i sa drugim jedinjenjima gradeći elektrostatičke komplekse¹³². Zahvaljujući postojanju slobodnih/protonovanih amino grupa hitozan se može posmatrati kao polikatjon koji ima sposobnost da stupa u interakciju sa negativno naelektrisanim jedinjenjima poput polianjona, pri čemu je ovo svojstvo u direktnoj zavisnosti od pH vrednosti, od koje zavisi da li će amino grupe biti protonovane u većoj ili manjoj meri¹⁴¹.

Kao što je već pomenuto, hitozan je nerastvorljiv u vodi, ali se rastvara u razblaženim organskim kiselinama pri pH < 6,5 što je od velikog značaja za funkcionalizaciju različitih materijala, uključujući i tekstilne materijale, sa hitozanom. Imajući ovo u vidu i predmet same disertacije, posebno će biti razmatrano ponašanje hitozana u vodenom rastvoru i moguće interakcije.

Specifična struktura hitozana omogućava mu praktično sve vrste interakcija poznate u hemiji. Interakcije hitozana zavise kako od njegovih svojstava, brojnih parametara vezanih za njegovu strukturu ili kristalografiju, tako i od medijuma u kome se nalazi. U smislu ponašanja u vodenom rastvoru i mogućih interakcija, u najvažnije fizičko-hemijske parametre medijuma u kom se nalazi hitozan spadaju: dielektrična konstanta medijuma, pH, jonska jačina i temperatura. Ukoliko se svi ovi parametri uzmu u obzir i dobro regulišu, onda se može pretpostaviti ponašanje hitozana u vodenom rastvoru, njegove moguće interakcije i eventualno razmotriti mogućnosti njegove primene¹³⁹.

Hitozan se rastvara kada odgovarajuće elektrostatičko odbijanje katjonskih grupa postane jačeg intenziteta u odnosu na privlačne sile niskoenergetskih interakcija, kao što su vodonične veze ili hidrofobne interakcije¹³⁹. Rastvorljivost je, takođe, favorizovana hidratacijom različitih, uglavnom naelektrisanih, aktivnih mesta pa je veoma važan odnos NH₃⁺/NH₂ koji je direktno povezan sa gustinom naelektrisanja i zavisi od pH sredine i stepena neutralizacije protonovanih amino grupa što je ilustrovano jednačinom koju je postavio *Katchalsky*¹³⁴:

$$pK_a = pH + \frac{\log(1-\alpha)}{\alpha} = pK_0 - \frac{\epsilon \Delta\psi(\alpha)}{KT} \quad (2)$$

gde je:

pK_α - prividna konstanta kiselosti,

α - stepen neutralizacije $-NH_3^+$ grupa,

pK_0 - je stvarna pK jedne katjonske grupe i $\frac{\epsilon \Delta \psi(\alpha)}{KT}$ - je elektrostatički parametar koji bitno zavisi od naelektrisanja polimera, tj. od broja katjonskih grupa po jedinici dužine duž ose makromolekulskog lanca.

Gustina naelektrisanja je u neposrednoj vezi sa stepenom acetilovanja i ne utiče samo na elektrostatičke interakcije, već i na rastvorljivost hitozana u vodenim rastvorima, iz kojih se hitozan najčešće i upotrebljava. Pored njihove uzajamne povezanosti, ova dva parametra utiču na molekulsku pokretljivost hitozana koja je osnova kinetičkog aspekta interakcija i kvantitativnih ograničenja koje su posledica kinetičkog aspekta¹³⁹.

Potenciometrijsko-titracionim studijama je pokazano da stepen acetilovanja i stepen neutralizacije - NH_3^+ grupa (α) imaju najveći uticaj na pK vrednost slobodnih amino grupa. Za stepen acetilovanja ispod 30% i za malu vrednost α , ponašanje polimera je u skladu sa onim za relativno slabe katjonske polielektrolite sa važnom ulogom elektrostatičkih interakcija u odnosu na gustinu naelektrisanja. Za veće vrednosti α , smanjenje gustine naelektrisanja je povezano sa povećanjem hidrofobnih interakcija i formiranjem vodoničnih veza što doprinosi povećanju uticaja ovih parametara. Sa povećanjem stepena acetilovanja (> 50%), u opsegu niskog stepena disocijacije, favorizovano je formiranje hidrofobnih interakcija. Sa povećanjem α , postepeno slabi hidratacija sistema i favorizuje se vezivanje vodoničnim vezama što sigurno zamenjuje važan deo hidrofobnih interakcija. Stoga, stepen acetilovanja i α imaju veliki uticaj na dimenzije lanca i parametre interakcija polimer/rastvarač u odnosu na samoudruživanje polimernih lanaca koje dovodi do deplecije, agregacije i precipitacije¹⁴².

Jonska jačina takođe utiče na rastvorljivost menjajući pK_0 vrednost ili efektivnu gustinu naelektrisanja. Uticaj jonske jačine na rastvorljivost hitozana jasno je ilustrovan taloženjem hitozana u obliku soli, npr. hlorovodoničnom kiselinom pri $pH < 2$, usled zaklanjanja naelektrisanja na polimernim lancima prouzrokovanog visokom koncentracijom protona (> $10^2 M$) i samim polielektrolitom¹³⁹. Takođe, dodatak molekula soli sprečava odbojne interakcije između polimernih lanaca što omogućava da lanci dođu na kraće međusobno rastojanje. Što je bliži kontakt između lanaca to je izvesnije formiranje intermolekulskih vodoničnih veza koje efektivno otežavaju pokretljivost lanaca u rastvoru što se ogleda kroz porast viskoznosti¹⁴³.

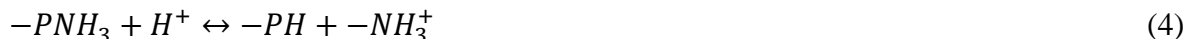
Interakcije koje obuhvataju vodonične veze, *Van der Waals*-ove i hidrofobne interakcije su veoma značajne i u situacijama kada molekulski lanci hitozana dođu u kontakt sa hemijskim jedinjenjima sa kojima su ove interakcije moguće¹³⁹. S obzirom da je identifikacija i kvantifikacija ovih interakcija izuzetno teška i kompleksa, posebno imajući u vidu da u mnogim slučajevima ove interakcije ne isključuju jedna drugu, ovoj problematici do sada nije bilo posvećeno mnogo istraživanja.¹⁴⁴

S obzirom da je hitozan polielektrolit, tačnije polikatjon, ima sposobnost formiranja polianjon/polikatjon (PA/PK) kompleksa u kiseloj sredini¹⁴⁵. Interakcije polianjona i polikatjona zavise od gustine naelektrisanja polimera i pK_0 vrednosti naelektrisanih funkcionalnih grupa koja učestvuju u interakciji. Predstavljajući hitozan preko $-NH_3^+$ grupa, optimalni uslovi za formiranje PA/PK kompleksa mogu se šematski prikazati pomoću jednačine (3), pri čemu se i ostale dve reakcije (jednačine 4 i 5) moraju uzeti u obzir:



gde su:

K^+ i A^- suprotni joni polianjona odnosno polikatjona¹³⁹.

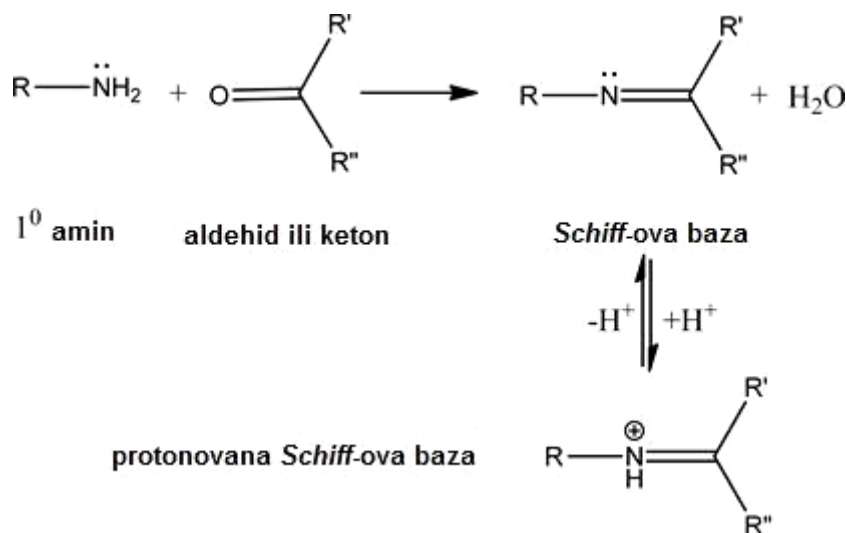


Iz prikazanih jednačina jasno je da je formiranje kompleksa maksimalno u slučaju maksimalne gustine naelektrisanja, a potpuno formiranje kompleksa postiže se neutralizacijom ukupne količine negativnog naelektrisanja istom količinom protonovanih amino grupa, što je praćeno oslobađanjem stehiometrijske količine KA soli, jednačina (3). Formirani polielektrolitni kompleks je neutralan i nerastvoran u vodi¹³⁹.

Stabilnost polielektrolitnog kompleksa, kao i njegovo formiranje, u velikoj meri zavisi od pH vrednosti sredine u kojoj se nalazi. Kada je $pH > pK_a$ hitozana dolazi do nagle destabilizacije kompleksa, usled deprotonovanja NH_2 grupa, a time i slabljenja interakcije između dva polimera. Iz ovoga se može zaključiti da je polielektrolitni kompleks izuzetno pH osetljiv, tj. njegova stabilnost zavisi od pK_0 vrednosti anjonskih i katjonskih mesta¹⁴¹. S tim u vezi, polielektrolitni kompleks se lako raspada sa sniženjem pH vrednosti kada anjonska mesta potiču od slabih kiselina, dok je stabilan za sve vrednosti $pH < 6,5$ kada anjonska mesta potiču od jakih kiselina¹³⁹.

Većina istraživanih polielektrolitnih kompleksa hitozana formirana je sa drugim polisaharidima i našla je širok spektar primena¹⁴⁶. Polielektrolitni kompleksi hitozana formirani sa DNA do sada su uglavnom primenjeni u farmaciji¹⁴⁷, dok su kompleksi formirani sa polianjonima uglavnom primenjeni kao biosenzori, u inženjerstvu tkiva, za prečišćavanje voda i kao nosači lekova¹⁴⁸.

Važno je istaći da hitozan, kao primarni amin, može da formira *Schiff*-ove baze sa aldehydima i ketonima. Šifova baza je azotni analog aldehida ili ketona u kome je $C=O$ grupa zamenjena sa $C=N-R$ grupom, a obično se formira kondenzacijom aldehida ili ketona sa primarnim aminom, kao što je šematski prikazano na Slici 24.



Slika 24. Osnovna šema formiranja *Schiff*-ove baze¹⁴⁹

Na kraju treba naglasiti da sličnosti između hemijske i molekulske strukture celuloze i hitozana omogućava visok afinitet između ova dva polimera. Intermolekulske interakcije između celuloze i hitozana zasnivaju se na uspostavljanju vodoničnih veza i dejstvu *Van der Waals*-ovih sila^{1, 39}.

Karboksilne i aldehidne grupe uvedene u celulozu doprinose intenzivnijem i ireverzibilnijem vezivanju između celuloze i hitozana^{2, 150}. Karboksilne grupe celuloze mogu obezbediti jonske veze između njih i hitozana kao adsorbenta, dok su aldehidne grupe najprikladnije za kovalentno vezivanje hitozana formiranjem *Schiff*-ove baze¹.

3.3. Biološka svojstva hitozana

Hitozan je biokompatibilan i biodegradabilan polimer u čijoj razgradnji u organizmu učestvuju enzimi poput lizozima, di-*N*-acetilhitobiazije, *N*-acetil- β -D-glukozaminidaze i hitiotrizidaze. Brzina degradacije hitozana u organizmu smanjuje se sa porastom stepena njegovog deacetilovanja. Degradacijom hitozana nastaju netoksični oligosaharidni produkti koji dalje mogu da učestvuju u određenim metaboličkim procesima organizma ili da se iz njega izluče preko bubrega¹⁵¹.

Smatra se netoksičnim polimerom sa smrtonosnom dozom (LD_{50}) > 16 g·kg⁻¹ telesne mase miša nakon peroralnog unošenja, što je, veća vrednost čak i u odnosu na saharozu¹⁵¹. Toksikološka ispitivanja pokazala su da toksičnost hitozana zavisi od puta primene. Nakon subkutane primene prvi znaci citotoksičnosti kod zečeva i pasa javljaju se nakon primene doza u opsegu 5-50 mg·kg⁻¹ dnevno, dok se nakon oralne primene prvi klinički znaci trovanja kod miševa i pacova javljaju tek nakon unošenja 5-15 g·kg⁻¹ dnevno. Kod zdravih dobrovoljaca peroralno unošenje dnevne doze hitozana od 6,75 g nije dovelo do vidljivih znakova intoksikacije. Primena hitozana na koži ne izaziva iritaciju, čak ni ukoliko je oštećena, niti alergijske reakcije¹⁵². Američka agencija za hranu i lekove (FDA) odobrila je primenu dodataka ishrani i medicinskih sredstva na bazi hitozana namenjenih za ubrzano zarastanje rana. Od 2002. godine so hitozana, hitozan-hidrohlorid u zemljama Evropske unije ima farmakopejski status, iako sam hitozan još uvek nema dodeljen GRAS (generalno prihvatljivi kao bezbedni) status. Imajući u vidu da njegova strukturna raznolikost različito utiče na njegovu biodistribuciju, *in vivo* i *in vitro* toksičnost, sve su učestaliji zahtevi da studije toksičnosti prate detaljni podaci o strukturi hitozana na koji se odnose¹⁵².

Jedan od glavnih razloga za komercijalizaciju hitozana na globalnom tržištu je njegovo hipoholesteremično svojstvo, koje je prvi put potvrđeno 1993. godine¹⁵³. Hipoholesterolemično delovanje hitozana objašnjeno je preko nekoliko mehanizama, od kojih je najznačajniji među njima zasnovan na interakcijama hitozana sa žučnim kiselinama i spontanom formiranju nerastvornih soli koje se hidrofobnim interakcijama vezuju za holesterol i lipide čime se otežava njihovo varenje¹³¹.

Veoma važno biološko svojstvo hitozana je i mukoadezivnost, tj. sposobnost vezivanja za biološke membrane prekrivene mukusom. Zahvaljujući polikatjonskoj prirodi, hitozan je u kiseloj sredini (npr. želudac) pozitivno naelektrisan i stupa u interakciju sa negativno naelektrisanim mukoznim membranama¹⁵⁴. *He* i sar.¹⁵⁵ proučili su interakciju između mucina i hitozana pre više od dve decenije. Izraženu interakciju između pozitivno naelektrisanog hitozana i negativno naelektrisane sijalinske kiseline pokazali *Dhavan* i sar.¹⁵⁶. Sa porastom stepena deacetilovanja raste i broj slobodnih NH₂ grupa čijim protonovanjem se poboljšava mukoadezivnosti hitozana. Takođe, sa povećanjem molekulske mase poboljšava se mukoadezivnost, što se objašnjava činjenicom da hitozani veće molekulske mase formiraju viskoznije rastvore koji usled bolje adhezije na sluzokožu imaju duže vreme zadržavanja¹⁵⁴.

Hemostatično delovanje hitozana zasniva se na njegovoj sposobnosti da ostvari interakcije sa negativno naelektrisanim trombocitima i eritrocitima, što rezultira formiranjem krvnog ugruška¹⁵⁷. Međutim, zbog slabe rastvorljivosti, hitozan nije najprikladnije sredstvo za terapiju rana koje obilno krvare. Iz tog

razloga tj. kako bi se proširilo polje njegove kliničke primene, hitozan se često upotrebljava u kombinaciji sa nekim drugim hemostatičkim supstancama ili se hemijski modifikuje¹⁵⁸. Protonovane amino grupe hitozana mogu da stupe u elektrostatičke interakcije sa anjonima prisutnim na površini crvenih krvnih zrnaca što dovodi do intenzivne agregacije crvenih krvnih zrnaca oko rane pri čemu se formiraju krvni ugrušci koji brzo zaustavljaju krvarenje¹⁵⁹. Stoga, jasno je da stepen protonovanja amino grupa hitozana ima važnu ulogu u njegovoj adsorpciji na crvena krvna zrnca. Studije su pokazale da je sposobnost hitozana da pokrene koagulaciju povezana sa stepenom deacetilovanja, ali i da zavisi od broja protonovanih amino grupa^{160, 161}. *Sagnella* i sar.¹⁶² pokazali su da neutralisanje pozitivnog naelektrisanja hitozana rezultira smanjenjem broja adhezovanih i agregiranih trombocita kao i da nema značajnog efekta na aktivaciju koagulacije, što ukazuje da je neophodna velika gustina pozitivnog naelektrisanja u hitozanu kako bi se izazvalo povećanje adhezije i agregacije trombocita. Neka istraživanja pokazala su da hitozan može pojačati aktivaciju trombocita i ubrzati adheziju i agregaciju trombocita¹⁶³. *Fischer* i sar.¹⁶⁴ ustanovili su da hitozan ima niz biohemijskih reakcija *in vivo* sa uglavnom svim proteinima plazme i nekim važnim koagulacionim faktorima krvi, što dodatno utiče na poboljšano stvaranje krvnih ugrušaka. S obzirom na molekulsku strukturu, hitozan može lako da formira mrežne strukture i da na taj način dođe do poboljšanja njegovih interakcija sa komponentama krvi odnosno do intenzivnog zgrušavanja krvi. *Dovling* i sar.¹⁶⁵ predložili su gelirajući hemostatski mehanizam baziran na samoorganizovanju molekula hidrofobno modifikovanog hitozana (HM-CS) sa ćelijama krvi. Nakon što hidrofobni HM-CS stupe u kontakt sa ćelijama krvi, dolazi do njihovog vezivanja za hidrofobna mesta membrana ćelija krvi usled hidrofobnih interakcija i formiranja trodimenzionalne mreže gela koja potencijalno može zaustaviti krvarenje.

Utvrđeno je da hitozan poseduje širok spektar antimikrobnog delovanja prema gljivicama, Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama, ali tačni mehanizmi antimikrobnog dejstva hitozana nisu još uvek u potpunosti razjašnjeni. Najprihvaćenija hipoteza se zasniva na remećenju ćelijske membrane/ćelijskog zida mikroorganizama usled interakcija između pozitivno naelektrisanog hitozana i negativno naelektrisane membrane mikroorganizama¹⁶⁶.

Opšte prihvaćeni mehanizmi antimikrobnog delovanja hitozana zasnivaju se na:

- remećenju ćelijske membrane/ćelijskog zida,
- interakcijama sa DNA mikroorganizama,
- helaciji nutrijena neophodnih za opstanak mikroorganizama, i
- formiranju gustog polimernog filma na površini mikroorganizama¹⁶⁷.

Protonovane amino grupe hitozana imaju ključnu ulogu u remećenjenju ćelijske membrane/ćelijskog zida mikroorganizama¹⁶⁸. Kada je pH vrednost okoline hitozana niža od njegove pK_a vrednosti, amino grupe se protonuju dajući hitozanu pozitivno naelektrisanje. Ćelijski zid Gram-pozitivnih bakterija je negativno naelektrisan usled prisustva teihoiniske kiseline koja se nalazi u tankom peptidoglikanskom sloju, dok je ćelijski zid Gram-negativnih bakterija izuzetno negativno naelektrisan usled prisustva lipopolisaharida koji se nalaze u spoljašnjem sloju membrane. Takođe, i u slučaju gljivica ćelijski zid sadrži komponente koje ga čine negativno naelektrisanim¹⁶⁹. Elektrostatičke interakcije između pozitivno naelektrisanih molekula hitozana i negativno naelektrisanih komponenata ćelijskog zida mikroorganizama mogu dovesti do blokiranja intra/ekstracelularne razmene ili čak do pucanja ćelijskog zida i, na kraju, curenja citoplazmatskog sadržaja¹⁶⁸. *Fu* i sar.¹⁷⁰ su pokazali da teihoiniske kiseline koje se nalaze u ćelijskom zidu *S.aureus* ostvaruju interakcije sa derivatima hitozana i tako inhibiraju rast bakterija, u nekim slučajevima čak i do skoro 100%. *Li* i sar.¹⁷¹ su upotrebom elektronske mikroskopije zabeležili oštećenja ćelijske membrane i curenje citoplazmatskog sadržaja *E.coli* u prisustvu hitozana. Interakcije hitozana sa DNA mikroorganizama posebno se odnose na hitozane niske molekulske mase.

Proizvodi hidrolize hitozana niske molekulske mogu da uspostave interakcije sa DNA mikroorganizama što utiče na sintezu proteina i inhibiciju mRNA mikroorganizama¹²⁸. Ovaj mehanizam antimikrobnog delovanja hitozana potvrdili su *Liu* i sar.¹⁷² prema *E.coli*, a *Sebti* i sar.¹⁷³ prema *Aspergillus niger*. Helacija nutrijenata neophodnih za opstanak mikroorganizama zasnovana je na sposobnosti kompleksiranja hitozana sa jonima metala¹⁷⁴. Komponente ćelijskog zida kako Gram-pozitivnih tako i Gram-negativnih bakterija privlače dvovalentne jone metala koji su neophodni za njihov opstanak. Fosfatne grupe teihoinse kiseline koja se nalazi u peptidoglikanskom sloju Gram-pozitivnih bakterija posebno privlače jone Mg^{2+} i Ca^{2+} koji učestvuju u održavanju enzimskih funkcija i integriteta membrana. Lipopolisaharidi, komponente spoljašnjeg sloja membrane Gram-negativnih bakterija, usled negativnog naelektrisanja takođe imaju jak afinitet prema dvovalentnim jonima metala¹⁶⁹. S tim u vezi, hitozan heliranjem jona metala i nutrijena koji su neophodni za rast mikroorganizama negativno utiče na njihov opstanak¹⁷⁴. Formiranje gustog polimernog filma na površini mikroorganizama karakteristično je za hitozane visoke molekulske mase koji mogu da se deponuju na površini mikroorganizama i na taj način spreče unos hranljivih materija i kiseonika u njih, što posebno negativno utiče na opstanak aerobnih bakterija¹⁶⁷. Deponovanje hitozana na spoljašnju membranu *E.coli* zabeležili su *Helander* i sar.¹⁷⁵ primenom elektronske mikroskopije.

Hitozan pokazuje i lokalno analgetičko delovanje, što se objašnjava njegovom baznom prirodom i sposobnošću da vezuje protone koji se oslobađaju u područjima zahvaćenim inflamatornim procesima¹⁷⁶. S obzirom na lokalni analgetički, umirujući i efekat hlađenja nakon primene hitozana na kožu zahvaćenu ulceracijama, opekotinama i mehaničkim oštećenjima, hitozan je našao široku primenu u terapiji rana¹⁷⁷.

Takođe, hitozan i njegovi derivati pokazuju antitumorsko delovanje koje je ispitivano kako *in vivo* tako i *in vitro* metodama^{178, 179, 180}. Antitumorsko delovanje hitozana generalno je povezano sa njegovim uticajem na normalno funkcionisanje ćelijskog ciklusa, ključne elemente bioloških sistema (poput DNA i RNA) koji učestvuju u sintezi proteina ili enzima i hormonske procese biosinteze koji inhibiraju rast ćelija tumora¹⁷⁸.

Poslednjih godina mnogo pažnje posvećeno je i proučavanju antioksidativne aktivnosti hitozana i njegovih derivata^{137, 181}. Hitozan ima sposobnost da aktivira antioksidativne mehanizme u ljudskim ćelijama koji sprečavaju oksidativni stres odgovoran za stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) na obolelim mestima u organizmu¹⁸². Hitozan kao sredstvo za uklanjanje ROS ima svojstvenu antioksidativnu aktivnost koja može da spreči peroksidaciju i degradaciju ćelijskih membrana, lipida, proteina i genoma. Ova jedinstvena karakteristika rezultat je reakcija ROS sa slobodnim amino i hidroksilnim grupama hitozana što dovodi do povećanja stabilnosti ROS¹⁸³. *Sun* i sar.¹⁸⁴ objavili su da hitozan i njegovi derivati deluju kao donori vodonika za neutralisanje ROS. U novijim istraživanjima rađeno je na modifikacijama hitozana sa poznatim ROS-responzivnim supstancama u cilju poboljšanja njegove antioksidativne aktivnosti. *Pu* i sar.¹⁸⁵ pokazali su da hitozan u kombinaciji sa kurkumom, a *Wang* i sar.¹⁸⁶ da hitozan u kombinaciji sa hijaluronskom kiselinom pokazuje bolju antioksidativnu aktivnosti u odnosu na čist hitozan.

Imajući u vidu širok spektar navedenih bioloških svojstava hitozana nije iznenađujuće da je našao primenu u brojnim komercijalno dostupnim medicinskim proizvodima za terapiju rana, najčešće u obliku fibroznih i sunderastih materijala, hidrogelova, membrana i filmova (Tabela 1). Najvažnije uloge hitozana kao bioaktivne supstance u medicinskim sredstvima za prevenciju i terapiju rana ogledaju se u stimulaciji proliferacije ćelija i obnavljanja tkiva, hemostatičkom delovanju, zaustavljanju krvarenja i blokiranju nervnih završetaka ublažavajući osećaj bola. Hitozan se postepeno razgrađuje stvarajući *N*-acetil- β -D-glukozamin koji stimuliše proliferaciju fibroblasta, sintezu

hijaluronske kiseline na mestu oštećenja i pomaže u nakupljanju kolagena. Zahvaljujući navedenim svojstvima, hitozan ubrzava zarastanje rane i sprečava pojavu ožiljaka¹⁵².

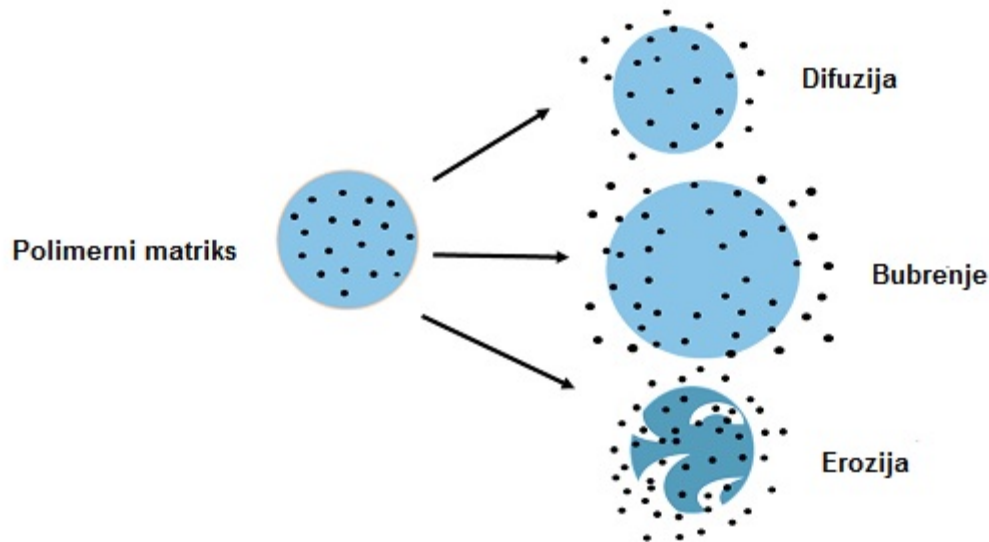
Tabela 1. Pregled komercijalno dostupnih proizvoda za terapiju rana sa hitozanom/ derivatima hitozana kao bioaktivnom supstancom^{152, 167}

Zaštićeno ime proizvoda	Proizvođač
Chitoderm® plus	Trusetal
Opticell®	Medline
ChitoGauze® PRO	Tricol Biomedical
HemCon® Bandage PRO	Tricol Biomedical
Chitodine®	IMS
Celox™	MedTrade
ChitoFlex® Hemostatic dressing	HemCon Medical Technologies
ChitoPack® C	Eisai Co.
ChitoSeal®	Abbott Vasdcular Devices
Clo-Sur® PAD	Scion Cardio-Vascular
Axiostat®	Axio
ExcelArrest® XT	Hemostasis
PosiSep®	Hemostasis

3.4. Nanočestice hitozana

Prema standardu ASTM E2456-06 nanočestice su definisane kao ultra-fine čestice sa najmanje jednom dimenzijom u opsegu između 1 i 100 nm¹³⁰. Međutim, u radovima se mogu pronaći podaci gde se i čestice većih dimenzija svrstavaju u nanočestice hitozana. Primera radi, čestice hitozana dimenzija od 334 nm u radu *Nguyen i sar.*¹⁸⁷, 187 nm u radu *Shambayati i sar.*¹⁸⁸, 600 nm u radu *Madureira i sar.*¹⁸⁹, i 800 nm u radu *Paomephan i sar.*¹⁹⁰ nazvane su nanočesticama hitozana. Razlike u dimenzijama dobijenih nanočestica hitozana generalno zavise od metode njihovog dobijanja, kao i molekulske mase i stepena acetilovanja hitozana upotrebljenog za njihovo dobijanje¹⁴. Nanočestice hitozana mogu se dobiti emulzifikacionim metodama, metodama samoudruživanja, jonotropnim geliranjem, itd. Jonotropno geliranje je jednostavna i često korišćena metoda koja se koristi za dobijanje nanočestica hitozana. Bazira se na interakcijama makromolekula hitozana sa molekulima suprotnog naelektrisanja kao što je natrijum-tripolifosfat (TPP). TPP se često koristi za dobijanje nanočestice hitozana s obzirom da je TPP netoksičan, multivalentan i sposoban da stvara gelove jonskim interakcijama. Interakcije makromolekula hitozana sa molekulima TPP mogu biti kontrolisane njihovom gustinom naelektrisanja koja je zavisna od pH rastvora¹⁹¹. Najnovija istraživanja pokazala su da nanočestice hitozana pokazuju odličnu propustljivost, antimikrobna svojstva i imunološku modulaciju, pri čemu su istovremeno netoksične za humane ćelije¹⁹², kao i poboljšana antimikrobna svojstva u poređenju sa hitozanom u masi¹⁹³. U poslednje vreme, zahvaljujući nanometarskim dimenzijama, manje ili više pravilnom sferičnom obliku i velikom odnosu površine i zapremine, nanočestice hitozana privlače interesovanje brojnih istraživača kao pogodni nosači bioaktivnih supstanci i jedan su od najznačajnijih sistema za kontrolisano otpuštanje bioaktivnih supstanci¹⁴.

Otpuštanje inkorporirane bioaktivne supstance iz nanočestica hitozana je složen proces koji može da se odvija preko: bubrenja polimera, difuzije inkorporirane bioaktivne supstance sa površine polimernog matriksa, difuzije inkorporirane bioaktivne supstance kroz polimerni matriks, erozije ili degradacije polimera i kombinacije erozije i razgradnje polimera, Slika 25.¹⁴



Slika 25. Mogući mehanizmi otpuštanja inkorporirane bioaktivne supstance difuzijom, bubrenjem i erozijom polimernog (hitozan) matriksa¹⁴

Imajući u vidu moguće mehanizme, kao i njihovo kombinovano odvijanje, jasno je da postizanje kontrolisanog otpuštanja inkorporirane bioaktivne supstance sa/iz nanočestica hitozana predstavlja veliki izazov¹⁴. Osim za kontrolisano otpuštanje, nosači na bazi nanočestica hitozana koriste se u cilju postizanja zaštite inkorporirane bioaktivne supstance od nepovoljnih uticaja okruženja u *in vivo* uslovima i povećanja biološke raspoloživosti zahvaljujući mukoadhezivnosti hitozana, poboljšanju transmukozne resorpcije¹⁹⁴.

Među najispitivanijim nosačima na bazi nanočestica hitozana su alginat-hitozan, hitozan-tripolifosfat, hitozan-genipinihitozan-glutaraldehyd nanočestice. Ovi nosači namenjeni su za različite puteve primene poput per oralne, transdermalne, oftalmološke, vaginalne, nazalne, bukalne/sublingvalne i parenteralne. Brojna istraživanja sprovedena su sa ciljem da se ispituju mogućnost i prednosti inkapsulacije citotoksičnih lekova, antigena, gena, proteina i peptida u nanočestice na bazi hitozana^{152, 195, 196}.

Nanočestice hitozana našle su primenu kao nosači kurkume radi poboljšanja njene rastvorljivosti i stabilnosti u gastrointestinalnom traktu¹⁹⁷. Postignuta je olakšana transmukozna resorpcija dva hidrofobna leka, triklozana i furosemida, njihovim inkorporiranjem u nanočestice hitozana¹⁹⁸. Heparin niske molekulske mase inkorporiran je u nanočestice hitozana čime je poboljšana njegova oralna adsorpcija i relativna biološka raspoloživost, u poređenju sa rastvorom heparina niske molekulske mase¹⁹⁹. U oblasti onkologije, nanočestice hitozana privlače veliku pažnju kao nosači lekovitih supstanci radi poboljšanog targetiranja tumora, sposobnosti inkorporiranja različitih hidrofobnih lekova, kao i kontrolisanog otpuštanja lekovite supstance^{200, 201}. Nanočestice na bazi hitozana i heparina pokazale su se kao pogodni nosači za poboljšano otpuštanje oligonukleotida u epitelne

ćelije²⁰². Rezultati ispitivanja genetske imunizacije upotrebom nanočestica hitozana sa inkorporiranim plazmidom DNK, su pokazali merljive i kvantitativne nivoe ekspresije gena i značajnog titra antigena²⁰³. Istraživan je i potencijal upotrebe nanočestica hitozana kao nosača antigena. Nanočestice hitozana pokazale su se kao stabilne nakon inkorporiranja sa rekombinantnim površinskim antigenima hepatitisa B, sposobne za efikasno povezivanje sa pomenutim antigenom (60%), pogodne za zadržavanje njegovog epitopa netaknutim i njegovo kontrolisano otpuštanje²⁰⁴. Uspešno su formulisane i nanočestice hitozana za oralnu primenu insulina koje su pokazale poboljšanu interakciju sa crevnim epitelom, adsorpciju, *in vitro* i *in vivo*, kao i prihvatljivu biološku raspoloživost insulina²⁰⁵.

U novije vreme nanočestice hitozana pronašle su primenu i u oblasti terapije rana. Nanočestice hitozana sa inkorporiranim insulinom naslojene su na tekstilni material dobijen elektrospredanjem poli (ϵ -kapolaktama) i kolagena. Posle 14 dana primene dobijene obloge postignuto je skoro potpuno zarastanje rane, dok je primenom sterilne gaze postignuto oko 45% smanjenja veličine rane²⁰⁶. Nanočestice hitozana sa inkorporiranim srebro-sulfadiazinom naslojene su na gazu kako bi se dobila obloga sa kontrolisanim otpuštanjem srebro-sulfadiazina za terapiju opekotina u cilju sprečavanja njihovog inficiranja. Dobijena obloga za ranu pokazala se kao efikasna u inhibiciji rasta *Bacillus subtilis*, *S.aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa* i *C.albicans*²⁰⁷. Nanočestice hitozana sa inkorporiranim srebrom naslojene su na poliestarsku tkaninu, tako dobijena obloga za rane pokazala je antibakterijsko delovanje prema *S.aureus*²⁰⁸. Nanočestice na bazi hitozana i lecitina sa inkorporiranim melatoninom u obliku suspenzija dobijene su sa ciljem poboljšanja epitelizacije rana, a rezultati *in vitro* ispitivanja pokazali su da se primenom ove suspenzije postiže poboljšana epitelizacija rana²⁰⁹. Poboljšana regeneracija dijabetičkih rana postignuta je primenom nanočestica hitozana i kurkume inkorporiranih u porozni nosač na bazi kolegena; *in vivo* ispitivanja su pokazala da se rana kontrahuje znatno brže od rana tretiranih kontrolnim i placebo poroznim nosačima²¹⁰. Takođe, za terapiju dijabetičkih rana formulisane su i nanočestice na bazi hitozana i esencijalnog ulja *Homalomena pineodora* koje su pokazale odlična antimikrobna svojstva prema *Bacillus cereus*, *B.subtilis*, *S.aureus*, meticilin rezistentnoj *S.aureus*, *E.coli*, *Proteus mirabilis*, *Yersinia sp.*, *K.pneumoniae*, *Shigella boydii*, *Salmonella typhimurium*, *Acientobacter anitratus*, *P.aeruginosa*, *C.albicans* i *Candida utilis*²¹¹, dok su se nanočestice hitozana sa inkorporiranim kurkukom, takođe, pokazale kao odlične u sprečavanju formiranja mono- i polimikrobnog biofilma *C.albicans* i *S.aureus*²¹². Nanočestice hitozana sa inkorporiranim elaginskom kiselinom dobijene su sa ciljem primene u zaustavljanju krvarenja rana. U odnosu na samu elaginsku kiselinu, primenom ovih nanočestica smanjeno je vreme koagulacije za 34% i vreme razgradnje ugruška za 16,4%²¹³.

S obzirom da su u ovoj doktorskoj disertaciji sintentizovane nanočestice hitozana sa inkorporiranim jonima cinka radi funkcionalizacije celuloznih filmova i tkanina, a u cilju dobijanja materijala za prevenciju i terapiju rana, u narednom poglavlju će biti posvećena pažnja najznačajnijim literaturnim podacima o potencijalu primene cinka i njegovih kompleksa sa hitozanom u prevenciji i terapiji rana.

3.5. Potencijal cinka i njegovih kompleksa sa hitozanom u prevenciji i terapiji rana

Joni metala čine esencijalne komponente bioloških sistema. Njihova uloga u biološkim sistemima ogleda se u učestvovanju u formiranju aktivnog mesta i stabilizaciji strukture enzima, regulaciji genske ekspresije, aktiviranju signalnih puteva u ćeliji kao i održavanju osmotskog i vodnog balansa

organizma. Smatra se da je prisustvo metalnog kofaktora neophodno za normalno funkcionisanje trećine svih do sada poznatih vrsta proteina²¹⁴.

Uloga jona metala u normalnim i patološkim fiziološkim procesima, ukazala je na njihovu potencijalnu primenu za raznovrsne terapijske svrhe^{215, 216, 217, 218, 219}.

Cink na biohemijskom nivou deluje kao strukturna, katalitička i regulatorna komponenta. Specifična hemijska struktura cinka pruža mu širok spektar bioloških svojstava. Kada se nalazi u formi jona (Zn^{2+}), usled popunjene d-orbitale stabilan je u biološkim sistemima i ne učestvuje u oksidoredukcionim procesima, zbog čega ne dovodi do formiranja slobodnih radikala odnosno oksidativnog stresa. Na nivou celog organizma, cink je neophodan za njegov rast. Pored toga, neophodan je i za razvoj i funkcionisanje nervnog, imunog i reproduktivnog sistema, kao i održavanje antioksidativnih sistema. Nedostatak cinka primarno se manifestuje kroz inhibiciju rasta i otežano funkcionisanje visokoproliferativnih tkiva^{214, 220}.

Cink je posebno važan za kožu. Koža sadrži relativno visok sadržaj cinka (oko 5% telesnog sadržaja), posebno u epidermisu (50–70 $\mu\text{g/g}$ suve mase). Zbog njegovog velikog sadržaja u epidermisu, blagi nedostatak cinka dovodi do promena na koži (suva i gruba koža) i do produžetka vremena potrebnog za zarastanje rana²¹⁹. Kao fiziološki odgovor organizma, u ranama dolazi do promene koncentracije cinka sa vremenom. Utvrđeno je da tokom prvih 24 h dolazi do porasta od 20% u odnosu na normalne fiziološke vrednosti. Nakon toga, u fazi granulacije i intenzivne proliferacije epitelnih ćelija, porast se nastavlja do dodatnih 30%. U kasnijim fazama zarastanja rana (10.-21. dan), usled smanjene deobe ćelija i maturacije ožiljaka, dolazi do postepenog pada i vraćanje na normalne vrednosti¹⁶. Lokalno povećanje koncentracije cinka u ranama utiče na zaustavljanje krvarenja, uklanjanje mikroorganizama, zatvaranje rane, remodelovanje tkiva i restauraciju normalne morfologije i funkcije kože²¹⁴. Suplementacija cinkom pokazala se kao korisna kod teških povreda kože izazvanih opekotinama^{221, 222}, potkožnih apscesa, manjih operacija²²³ i dekubitusa^{224, 225}.

Dobro je poznato da je oksidativno oštećenje glavni uzrok povreda tkiva, a da redoks regulacija igra važnu ulogu u sanaciji rana²²⁶. S tim u vezi, od posebnog značaja je uloga cinka u zaštiti biomolekula od oksidativnog stresa s obzirom da:

- cink predstavlja strukturnu komponentu enzima koji su direktno uključeni u uklanjanje kiseoničnih slobodnih radikala,
- cink indukuje sintezu metalotioneina koji inaktiviraju slobodne radikale i regulišu nivo teških metala i
- se vezivanjem cinka za tiolne grupe strukturnih ili regulatornih proteina obezbeđuje njihova zaštita od oksidativnog dejstva²²⁷.

Pored oksidativnog oštećenja, infekcije rana su jedan od najvećih problema u njihovoj terapiji i mogu dovesti do niza komplikacija²²⁸. Iako predstavljaju esencijalni element za mikroorganizme, pri superfiziološkim koncentracijama, joni cinka deluju kao snažan antimikrobni agens²²⁹. Postoje dva mehanizma antimikrobnog dejstva jona cinka: 1) generisanjem reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i deplecijom antioksidanata i 2) narušavanjem Fe-S klastera enzima²¹⁴.

U prvom slučaju, ukoliko je pristutan u višku, iako ne spada u redoks aktivne metale i stabilan je u biološkim uslovima, cink može dovesti do indirektnog posredovanja u oksidativnom stresu odnosno generisanju slobodnih radikala. Kod aerobnih organizama, kao sporedni produkti respiracije nastaju vodonik-peroksid (H_2O_2) i superoksidni anjon (O_2^-). U procesu koji je označen kao Fentonova reakcija (jednačina (6)), nastali H_2O_2 može dalje da oksiduje redoks aktivne metale pri čemu nastaju hidroksilni

anjon (OH⁻) i izuzetno reaktivni hidroksil radikal (OH[·]). Nastali OH[·] napada biomolekule pri čemu dolazi do nastanka i propagacije novih radikala i daljeg oksidativnog oštećenja biomolekula. U narednom koraku oksidovani metal reaguje sa O₂⁻, pri čemu se redukuje i regeneriše (jednačina (7)). Zbirna reakcija nastanka reaktivnih kiseoničnih vrsta, polazeći od sporednih produkata reaspiracije, u kojoj prelazni redoks aktivni metali deluju kao katalizatori, poznata je pod nazivom *Haber-Weiss*-ova reakcija (jednačina (8))²¹⁴.



.....



Nastali slobodni radikali se neutrališu ćelijskim antioksidativnim sistemima koji ih redukuju, a redoks aktivni metali se vezuju u helatne komplekse i prevode u neaktivan oblik²¹⁴.

U drugom slučaju, pri visokim koncentracijama, Zn(II) reaguje sa enzimima koji sadrže Fe-S grupu u katalitičkom centru, istiskuju Fe(II) i koordinativno se vezuju za sumpor, narušavajući njihovu aktivnost. Ovi enzimi su, najčešće, evolutivno konzervirani i učestvuju u katalizi esencijalnih metaboličkih puteva. U Fentonovu reakciju mogu ući istisnuti Fe(II) pa oštećenje Fe-S katalitičkog centra cinkom može indirektno dovesti i do generisanja reaktivnih kiseoničnih vrsta²¹⁴.

Topikalna primena cinka u formi cink-sulfata (ZnSO₄), obično optimalne koncentracije od 3%, široko se koristi u terapiji rana zbog svog antioksidativnog dejstva²³⁰. Druge forme u kojima se često primenjuje cink uključuju 1% cink-hlorid (ZnCl₂) i cink-oksidi (ZnO) koji je gotovo nerastvorljiv u vodi, pri čemu ZnO obezbeđuje dugotrajno snabdevanje rane cinkom i pojačava njegovu lekovitu sposobnost. Pored toga, ZnO povećava degradaciju kolagena kod nekrotičnih rana²³¹. *Aksoy* i sar.²³² su u *in vivo* istraživanju na modelu opekotina kod zečeva pokazali da topikalna primena ZnO na mestu oštećenja kože, ubrzava proces kontrakcije i zarastanja rana. *Emri* i sar.²³³ su utvrdili da tretman Zn(II) dovodi do intenzivne proliferacije humanih keratinocita u kulturi, a *Agren*²³¹ povećane aktivnosti metaloproteinaza matriksa u *in vitro* modelu nekrotičnog tkiva. *Attia* i sar.²³⁴ sproveli su studiju na pacijentima sa nekomplikovanim ranama i pokazali da se grupama pacijenata čije su rane tretirane sa tečnostima koje sadrže cink značajno poboljšalo zarastanje rana u odnosu na grupu pacijenta čije su rane tretirane sa fiziološkim rastvorom.

Kao i u slučaju hitozana, potencijal cinka u terapiji rana iskorišćen je u medicinske svrhe razvijanjem niza proizvoda. U Tabeli 2. prikazan je pregled nekih komercijalno dostupnih proizvoda za terapiju rana sa cinkom kao bioaktivnom supstancom.

Tabela 2. Pregled komercijalno dostupnih proizvoda za terapiju rana sa cinkom kao bioaktivnom supstancom^{16, 214}

Zaštićeno ime proizvoda	Proizvođač
Mezinc [®]	Abigo Medical
Gelocast [™]	Smith&Nephew
Viscopaste [™]	Smith&Nephew
Steripaste [®]	Mölnlycke
Varolast	Hartmann
Dermagran [®]	Derma Sciences
Calaband [®]	Mölnlycke Health Care
Trionic	Johnson&Johnson

Bioaktivna svojstva kompleksa hitozana i cinka do sada nisu masovno proučavana, pri čemu su sprovedene studije uglavnom bazirane na proučavanju njihove antimikrobne aktivnosti. Utvrđeno je da kompleksi hitozana i cinka mogu imati izuzetnu antimikrobnu aktivnost. Wang i sar.²³⁵ ispitivali su antimikrobnu aktivnost kompleksa hitozana i cinka na 11 različitih vrsta bakterija i 3 različite vrste gljivica i pokazali da kompleksi ispoljavaju širok spektar antimikrobnih aktivnosti, čak do 2-8 i 4-16 puta veće od onih koje ispoljava sam hitozan ili cink-sulfat, respektivno. Pri tome, ispitivani kompleksi pokazali su bolju antibakterijsku nego antifungalnu aktivnost. Prema podacima ovih autora, kompleksi hitozana i cinka naročito su efikasni protiv *E.coli* i *Corynebacterium*. Oluwasina i sar.²³⁶ proučavali su i poredili antimikrobnu aktivnost karboksimetil hitozana i kompleksa karboksimetil hitozana i cinka. U njihovom istraživanju antibakterijska aktivnost kompleksa karboksimetil hitozana i cinka postignuta je prema *S.aureus*, *B.cereus*, *Pseudomonas* *siringae*, *P.aeruginosa* i *E.coli*, dok je antibakterijska aktivnost karboksimetil hitozana postignuta samo prema *S.aureus*. Antifungalna aktivnost postignuta je kako u slučaju karboksimetil hitozana tako i kompleksa karboksimetil hitozana i cinka prema *Collectotrichum falcritum*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrihum lindematianum*, i *Trichhoderum rubrum*, pri čemu je kompleks karboksimetil hitozana i cinka pokazao veći intenzitet antifugalne aktivnosti. Zhai i sar.²³⁷ proučavali su antibakterijska svojstva prevlake cinka i prevlaka kompleksa cinka i hitozana elektrodeponovanih na čelik. Prevlake cinka dobijene iz rastvora ZnSO₄, a prevlake kompleksa cinka i hitozana dobijene su iz smeše rastvora ZnSO₄ i rastvora hitozana različitih koncentracija (0,2, 0,6 i 1 g·l⁻¹). Poboljšana antibakterijska aktivnost prevlaka kompleksa cinka i hitozana postignuta je prema *E.coli*, *P.aeruginosa* i *Shevanella oneidensis*, pri čemu su najbolji rezultati postignuti u slučaju prevlake dobijene iz smeše rastvora ZnSO₄ i rastvora hitozana koncentracije 0,6 g·l⁻¹. Patale i sar.²³⁸ sintetizovali su kompleks *O,N*-karboksimetil hitozana i cinka i kompleks hitozana i cinka, u obliku praha. U njihovoj studiji kompleks *O,N*-karboksimetil hitozana i cinka pokazao je bolju antibakterijsku aktivnost prema *S.aureus* i *E.coli* u odnosu na kompleks hitozana i cinka. Dobijeni rezultati objašnjeni su boljom rastvorljivošću kompleksa *O,N*-karboksimetil hitozana i cinka u vodenom rastvoru što je omogućilo njihovu bolju difuziju i veću koncentraciju na mestu dejstva.

4. Bioaktivni materijali na bazi celuloze i hitozana za prevenciju i terapiju rana

Koža pokriva površinu tela i predstavlja najveći organ koji je od izuzetnog značaja za ceo organizam jer predstavlja prvu liniju odbrane od najrazličitijih hemijskih, fizičkih i bioloških agenasa. Do infekcije kože i mekih tkiva dolazi ukoliko se naruši integritet i odbrambena funkcija kože. Rane nastaju prekidom kontinuiteta površine kože i sluzokože pri čemu se stvara pogodna sredina za prodor mikroorganizama i nastanak infekcije²³⁹.

Prema istraživanjima, patogena bakterija koja najčešće izaziva infekcije rana je *S.aureus* (28,2%). Pored nje, česti uzročnici su i *P.aeruginosa* (25,2%), *E.coli* (7,8%), *Staphylococcus epidermidis* (7,1%) i *Enterococcus faecalis* (5,6%)²⁴⁰.

Normalna mikroflora kože ima mogućnost sprečavanja kolonizacije patogenih bakterija. Međutim, pod određenim uticajima genetskih i faktora okoline i mikroorganizmi koji čine normalnu mikrofloru kože postaju patogeni i uzrokuju oportunističke infekcije. Većina mikroorganizama normalne mikroflore živi u površinskim slojevima kože i na delovima folikula, ali postoje i oni koji su stanovnici dubljih slojeva i predstavljaju rezervoar za rekolonizaciju nakon uništavanja površinskih bakterija pod uticajem spoljašnjih faktora.²⁴¹

Imajući u vidu navedeno, među savremenim bioaktivnim materijalima za prevenciju i terapiju rana veliko interesovanje privlače oni sa antimikrobnim dejstvom tj. oni koji imaju sposobnost da sprečavaju rast i razvoj patogenih mikroorganizama. Osnovni kriterijumi pri njihovom dizajniranju su kontrolisano i prolongirano otpuštanje antimikrobne supstance, stabilnost na dejstvo inaktivirajućih faktora, kao i jednostavna i laka primena^{239, 242}.

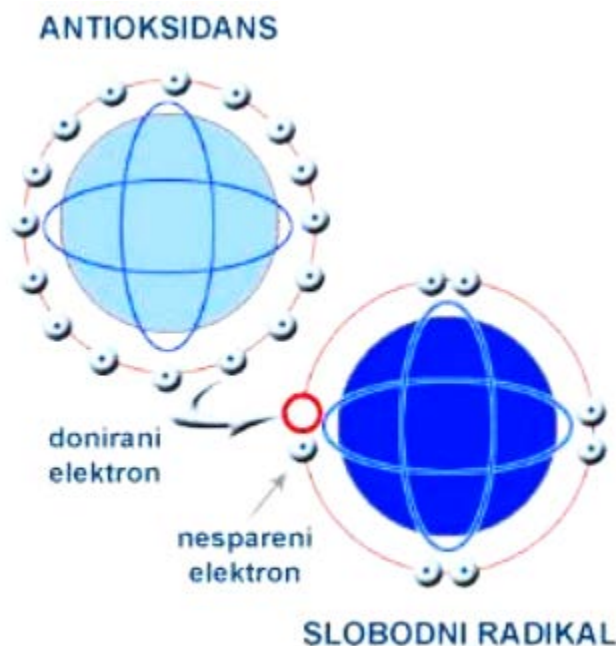
Antimikrobno dejstvo podrazumeva negativan uticaj na vitalnost mikroorganizama. Stepem aktivnosti bioaktivnih materijala sa antimikrobnim dejstvom određen je terminom "cidno" koji podrazumeva destrukciju mikroba i "statično" koji podrazumeva inhibiciju rasta mikroba bez destrukcije. Da bi imali zaštitnu namenu neophodno je da ovi materijali imaju biocidnu funkciju, naročito brzu i efikasnu inaktivaciju mikroorganizama širokog spektra dejstva³.

Danas su u upotrebi brojna jedinjenja sa različitim antimikrobnim dejstvom. Izbor antimikrobnog sredstva zavisi od krajnje upotrebe bioaktivnog materijala i patogena kojima su oni izloženi. Međutim, veliki problem u prevenciji i terapiji rana predstavlja pojava sve većeg broja multirezistentnih sojeva. Jedan od razloga je nekritična i prekomerna upotreba antibiotika u lečenju različitih infekcija. Osim antimikrobnog dejstva koje podrazumeva sistemsku terapiju, izuzetno važnu ulogu imaju i antimikrobne supstance sa preventivnim dejstvom, koje sprečavaju razmnožavanje bakterija i smanjuju mogućnost da dođe do infekcije, antiseptici. Zbog toga, alternativne i do sada manje korišćene prirodne supstance sa antimikrobnim dejstvom poput hitozana privlače sve veću pažnju^{13, 167}.

U izradi bioaktivnih materijala za prevenciju i terapiju rana, pored onih sa antimikrobnim, sve veće je interesovanje i za one sa antioksidativnim dejstvom tj. one koji mogu zaštititi ljudsko telo od slobodnih radikala i usporiti napredak mnogih hroničnih bolesti primenom prirodnih antioksidanasa². Smatra se da je oksidativni stres, indukovano slobodnim radikalima, glavni uzročnik različitih degenerativnih bolesti, kao i normalnog procesa starenja. Slobodni radikali nastaju normalnim metaboličkim procesima ili iz egzogenih faktora i agenasa i mogu lako pokrenuti peroksidaciju membranskih lipida,

što dovodi do nakupljanja lipidnih peroksida i oštećenja širokog spektra esencijalnih biomolekula²⁴³. Zaštitu ljudskog tela od slobodnih radikala i usporavanje napredka mnogih hroničnih bolesti antioksidansi obezbeđuju na tri različita načina: sniženjem energije slobodnih radikala, sprečavanja njihovog nastajanja ili prekida lančane reakcije oksidacije²⁴⁴.

Antioksidans je svaki molekul koji se sam oksiduje i na taj način štiti od oksidativnih oštećenja ćelije i tkiva u organizmu, pri čemu antioksidativna aktivnost podrazumeva neutralizaciju slobodnog radikala predajom svog elektrona, čime slobodni radikal postaje stabilan. Šematski prikaz neutralizacije slobodnog radikala antioksidansom prikazan je na Slici 26. Na ovaj način antioksidans prekida lančanu reakciju oksidacije, koja više ne predstavlja opasnost za ćelije i tkiva. Kada antioksidans preda elektron on istovremeno i sam postaje slobodni radikal. Međutim, antioksidans u ovom stanju ima sposobnost da se prilagodi promeni broja elektrona što mu omogućava da ne postane reaktivan i opasan po ćelije i tkiva u organizmu²⁴⁴.



Slika 26. Šematski prikaz neutralizacije slobodnog radikala antioksidansom²⁴⁴

Idealan materijal namenjen za terapiju rana trebalo bi da obezbedi: kontrolu vlažnosti okoline rane, odličnu propustljivost gasova, uklanjanje viška eksudata, zaštitu rane od infekcije i mikroorganizama, smanjenje površinske nekroze rana, mehaničku zaštitu, lako menjanje i uklanjanje, biokompatibilnost, biorazgradivost, elastičnost i netoksičnost, uklanjanje bola u rani i ekonomsku prihvatljivost²⁴².

Razvoj bioaktivnih materijala napreduje zadivljujućom brzinom poslednjih decenija, što je dovelo do dizajniranja materijala visokih performansi koji mogu izazvati željene i specifične reakcije ćelija i tkiva²⁴⁵. Trenutno u biomedicinskom inženjerstvu vlada posebno interesovanje za bioaktivnim materijalima na bazi biodegradabilnih polimera iz jednostavnog razloga što ih nije neophodno naknadno uklanjati iz organizma. Razlažu se pod dejstvom enzima prisutnih u organizmu ili drugih hemijskih jedinjenja u telesnim tečnostima. Njihove osnovne prednosti u odnosu na nebiodegradabilne

polimere su pre svega što ne izazivaju reakciju organizma na strano telo i to što neki od njih imaju sposobnost da regenerišu tkivo kroz interakciju sa imunološkim ćelijama^{246, 247, 248, 249}.

Prirodni polimeri su po pravilu biodegradabilni, a veliku primenu u biomedicini, kao savremeni materijali za prevenciju i terapiju rana, našli su celuloza i hitozan^{13, 126, 132, 160, 250}.

Celulozni tekstilni materijali tradicionalno se primenjuju u biomedicini, pre svega zbog biokompatibilnosti, netoksičnosti i velike sposobnosti zadržavanja vode¹. Sterilna gaza koristi se za apsorpciju eksudata rane. Međutim, njen veliki nedostatak ogleda se u potrebi njenog čestog menjanja kako bi se izbegla maceracija zdravog tkiva²⁵¹. Pored toga, sterilna gaza štiti ranu od bakterija samo dok ne postane vlažna zbog eksudata rane ili usled spoljašnjeg kvašenja. Njeno prijanjanje za ranu i uklanjanje izaziva traumu²⁵². Nedostaci gaze ogledaju se i u tome što obezbeđuje slabu zaštitu rane od spoljašnjih povreda i prljavštine i omogućava evaporaciju vlage dovodeći do dehidracije rane. Treba naglasiti da se tradicionalni materijali za terapiju rana mogu koristiti za neinficirane rane, zatim za tretman suvih rana ili kao sekundarne obloge da apsorbuju eksudat rane²⁵¹.

Biomedicinskim istraživanjima potvrđeno je da hitozan i njegovi derivati poseduju širok spektar bioloških aktivnosti pogodnih za prevenciju i tretman rana pa nije iznenađujuće veliko interesovanje za unapređenjem postojećih i razvojem novih tehnologija za dobijanje biološki aktivnih proizvoda za prevenciju i terapiju rana na bazi celuloze i hitozana^{13, 253}.

Prvo istraživanje o upotrebi hitozana za dobijanje bioaktivnog tekstilnog materijala sa antimikrobnim svojstvima sprovedeno je 1998 godine kada su Kim i sar.²⁵⁴ pokazali da je moguća uspešna funkcionalizacija pamuka sa hitozanom uz visoku antimikrobnu aktivnost dobijene tkanine prema *S.aureus*. S obzirom da štetni efekti na ćelije ljudske kože nisu uočeni, funkcionalizacija tekstilnih materijala sa hitozanom generalno je prihvaćena kao bezbedna^{255, 256, 257}. Od patogenih mikroorganizama kože, u dosadašnjim istraživanjima masovno je proučavana antimikrobna aktivnost tekstilnih materijala funkcionalizovanih hitozanom prema *S.aureus*, *E.coli*, i *K.pneumonia*^{258, 259, 260, 261}.

Kada su u pitanju vlakna, treba istaći da su u Japanu komercijalno dostupna dva kompozitna vlakna na bazi celuloze i hitozana pod nazivom Chitopoly[®] odnosno celuloze i hitina pod nazivom Crabyon[®]. Chitopoly[®] (Fuji Spinning Co.) ispoljava antimikrobna i dezodorirajuća svojstva. Dobija se mokrim ispredanjem viskoze koja sadrži mikročestice hitozana srednje veličine ispod 5 µm. Crabyon[®] (Ohmikenshi Co.) pored antimikrobnih i dezodorirajućih svojstva ispoljava veliku sposobnost adsorpcije metalnih jona. Dobija se mokrim ispredanjem smeše rastvora hitina i rastvora viskoze²⁶². Ristić i sar.²⁶³ istraživali su adsorpciju molekula i nanočestica hitozana na viskozna vlakna pri različitim pH vrednostima. U okviru njihovog istraživanja postignuta je antimikrobna aktivnost prema *S.aureus*, *C.albicans* i *E.coli*.

U literaturi se može naći dosta radova posvećenih funkcionalizaciji pamučnih tkanina hitozanom, pri čemu su tako dobijeni materijali pokazivali različite nivoe antimikrobne aktivnosti i postojanosti na pranje. Dhiman i Chakraborty²⁵⁸ funkcionalizovali su pamučnu tkaninu rastvorom hitozana koncentracije 5 g·l⁻¹. Antimikrobna aktivnost funkcionalizovanih tkanina je određena pre i nakon pranja. Dobijeni uzorci su pokazali antimikrobnu aktivnost prema *S.aureus* pre pranja, ali ne i prema *E.coli*. Tavaría i sar.²⁶⁴ proučavali su antimikrobnu aktivnost pamučnih tkanina funkcionalizovanih rastvorima hitozana različitih koncentracija (0,1 i 1% w/v) prema stafilokokama prisutnim na ljudskoj koži. Pored uticaja koncentracije, ispitan je i uticaj molekulske mase rastvorenog hitozana. Dobijeni uzorci su pokazali antimikrobnu aktivnost prema određenim vrstama stafilokoka. Takođe, uočeno je da antibakterijska aktivnost zavisi od koncentracije upotrebljenog hitozana, dok njegova molekulska masa

nije imala značajan uticaj. Do sličnog zaključka su došli *Rahman Bhuiyan* i sar.²⁶⁵ koji su za funkcionalizaciju pamučne tkanine, takođe, koristili rastvor hitozana različitih koncentracija (0,25, 0,5, 1,0 i 1,5 % w/v). Pre funkcionalizacije tkanina je modifikovana pranjem i beljenjem. Dobijeni rezultati su pokazali da je, za razliku od nemodifikovane, modifikovana pamučna tkanina pokazala antimikrobnu aktivnost prema *S.aureus* i *E.coli* pri svim upotrebljenim koncentracijama rastvora hitozana. Pored toga, uočeno je da je povećanje koncentracije rastvora hitozana doprinelo poboljšanju antimikrobne aktivnosti funkcionalizovanih tkanina.

Sa druge strane *Sadeghi-Kiakhani* i sar.²⁶⁶ su vezali hitozan za pamučnu tkaninu umrežavanjem. Rezultati su pokazali veoma dobru antimikrobnu aktivnost prema *S.aureus* i *E.coli*. Pored toga, ova procedura imobilizacije hitozana na celulozni supstrat se pokazala kao izuzetno postojana na pranje.

Lopes i sar.²⁶⁷ su otišli korak dalje u *in vivo* eksperimentu na pacijentima sa atopijskim dermatitisom i pokazali da je pidžama na bazi pamuka funkcionalizovanog hitozanom izmenila profil stafilokoka kože povećanjem koagulaze negativnih stafilokoka uz istovremeno smanjenje količine *S.aureus*.

Fras Zemljič i sar.³⁹ funkcionalizovali su viskozu sa 1% rastvorom hitozana različitim metodama radi njene potencijalne primene u formi tampona. Od 5 različitih uzoraka, samo jedan je pokazao antimikrobnu aktivnost prema *S.aureus* (79%), dok ni jedan nije prema *E.coli*. Takođe, *Fras Zemljič* i sar.²⁶⁸ primenili su plazma tretman u cilju poboljšanja adsorpcije hitozana na viskoznu tkaninu. Uzorak tretiran plazmom i naknadno impregniran sa 1% rastvorom hitozana tokom 24 h je pokazao antimikrobnu aktivnost prema *S.aureus*, ali ne prema *E.coli*. U daljim istraživanjima *Fras Zemljič* i sar.² proučavali su adsorpciju hitozana, nanočestica hitozana i nanočestica hitozana sa inkorporiranim jodom na nemodifikovanoj i oksidisanjoj viskoznoj tkanini kako bi se postigla zadovoljavajuća antimikrobna i antioksidativna svojstva. U cilju poboljšanja adsorpcije hitozana, nanočestica hitozana i nanočestica hitozana sa inkorporiranim jodom na viskozu, viskozna tkanina je hemijski modifikovana perjodatnom oksidacijom kako bi se uvele karboksilne i aldehidne grupe kao potencijalna vezujuća mesta za amino grupe hitozana. Oksidisana viskozna tkanina je pokazala povećan sadržaj karboksilnih ($0,1969 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) i aldehidnih ($0,0912 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) grupa u poređenju sa nemodifikovanom ($0,0902 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ COOH i $0,0090 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ CHO). Za oksidisane i neoksidisane uzorke funkcionalizovane nanočesticama hitozana sa inkorporiranim jodom postignuta je zadovoljavajuća antimikrobna aktivnost prema *S.aureus*, *E.coli* i *C.albicans*.

Ardila i sar.²⁶⁹ dobili su netkane podloge na bazi hitozana i bakterijske nanoceluloze elektropredenjem koristeći dva različita pristupa: (1) istovremenim ispredanjem rastvora hitozana i bakterijske nanoceluloze upotrebom dva odvojena šprica usmerena ka istom mestu i (2) koaksijalnim elektropredenjem, gde su hitozan i bakterijska nanoceluloza istovremeno ispredani kroz jedinicu sastavljenu od dve koncentrične igle za proizvodnju strukture kora-jezgro. Podloge dobijene koaksijalnim pristupom su pokazale snažnu antimikrobnu aktivnost od 99,9% prema *E coli*.

Određeni broj istraživača fokusirao se na razvoj membrana na bazi celuloze i hitozana. *Cao* i sar.²⁷⁰ napravili su porozne kompozitne membrane sa sendvič strukturom naslojavanjem površine membrane na bazi regenerisane celuloze sa hitozanom metodom izlivanja. Antimikrobna aktivnost kompozitnih membrana potvrđena je merenjem prečnika zone inhibicije. Sa povećanjem količine hitozana na membrani, odgovarajuća zona inhibicije proširena je prema *S.aureus* i *E.coli*. Na ovim membranama ispitana je i adsorpcija goveđeg serumskog albumina (BSA). Rezultati ukazuju na izraženu sklonost ka adsorpciji proteina iz krvi, što može predstavljati veliki problem pri njihovom kontaktu sa ranom. Na površinu nenaslojene membrane adsorbovano je $101,75 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ BSA proteina, a na naslojene do $152,65 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ BSA. Sa druge strane, *Lin* i sar.²⁷¹ dobili su membrane na bazi bakterijske celuloze i hitozana

(BC/CS) uranjanjem bakterijske celuloze u rastvor hitozana i sušenjem zamrzavanjem (liofilizacijom). BC/CS membrane su pokazale značajnu bakterijsku inhibiciju prema *E.coli* (99%) i *S.aureus* (99%). Wu i sar.²⁷² su se, takođe, bavili dobijanjem membrana na bazi celuloze i hitozana uz upotrebu trifluorosirćetne kiseline kao korastvarača. Smanjeno isparavanje vodene pare kroz membrane celuloza/hitozan je dovelo do zaključka da se one mogu koristiti kao materijal za previjanje koji sprečava preterano isušivanje rana. Takođe, ove membrane su pokazale antimikrobnu aktivnost prema *E.coli* i *S.aureus*.

Vikhoreva i sar.²⁷³ su pokazali da hidrofилni filmovi na bazi celuloze i hitozana mogu biti novi materijali za medicinske primene, posebno za tretman opekotina, transdermalnu terapiju i druge primene. S obzirom na biokompatibilnost i visoku apsorpciju ovi filmovi bi se mogli koristiti kao bioaktivni materijali sa antimikrobnim i dodatnim terapeutskim dejstvom. Savitskaya i sar.²⁷⁴ su ispitivali nanokompozitne filmove na bazi bakterijske celuloze i hitozana (BC/CS) dobijene uranjanjem bakterijske celuloze sintetizovane od *Komagataeibacter kilinus* u 1% rastvor hitozana u sirćetnoj kiselini. Dobijeni BC/CS kompozit je pokazao značajnu bakterijsku inhibiciju prema *S.aureus* (99%) i *E.coli* (98%).

S obzirom da hitozan ($pK_a=6,8$) pokazuje antibakterijsku aktivnost samo u kiseloj sredini zbog njegove loše rastvorljivosti iznad pH 6,5, Li i sar.²⁶² su proučavali dobijanje i svojstva filmova na bazi derivata hitozana rastvornih u vodi, a koji se rastvaraju i u kiselim i u baznim fiziološkim uslovima tako da predstavljaju potencijalne polikatjonske biocide. Filmovi na bazi *O*-karboksimetil hitozana (*O*-CMCS) i celuloze formirani su iz rastvora ova dva polimera u različitim rastvaračima. Utvrđeno je da antibakterijska aktivnost hitozana postaje mnogo jača uvođenjem $-CH_2COOH$ na $-OH$ grupe duž molekulskog lanca hitozana tj. prevođenjem hitozana u *O*-CMCS. Osim toga, kako je *O*-CMCS rastvorljiv u širokom opsegu pH vrednosti (od 3 do 11), on ima daleko širu primenu kao antibakterijsko sredstvo nego hitozan.

Za većinu navedenih radova karakteristično je da dobijeni materijali na bazi celuloze i hitozana, nezavisno od oblika materijala (vlakna, tkanine, membrane, filmovi), pokazuju manju aktivnost ili odsustvo aktivnosti prema Gram-negativnim bakterijama. Takođe, postojanost na pranje je ili nezadovoljavajuća ili nije bila ispitivana. Isti slučaj je i sa protein-odbijajućim i antioksidativnim svojstvima, što su i razlozi zašto je u okviru ove disertacije posebna pažnja posvećena poboljšanju i karakterizaciji ovih svojstava.

II EKSPERIMENTALNI DEO

5. Eksperimentalni materijal

5.1. Celulozni supstrati

U ovoj doktorskoj disertaciji kao supstrati za dobijanje TEMPO oksidisanih celuloznih nanofibrila korišćena su pamučna vlakna, a za dobijanje bioaktivnih tkanina korišćena je viskozna tkanina. Osnovni parametri korišćenih pamučnih vlakna i viskozne tkanine dati su u Tabelama 3. i 4.

Tabela 3. Osnovni parametri pamučnih vlakana

Dužina, mm	Sadržaj vlage, %	COOH grupe, mmol·g ⁻¹	CHO grupe, mmol·g ⁻¹
32-33	5,81	0,093	0,022

Tabela 4. Osnovni parametri viskozne tkanine

Vrsta prepletaja	Finoća pređe, tex		Gustina tkanine, dm ⁻¹		Površinska masa, g·m ⁻²	Debljina, mm
	u pravcu osnove	u pravcu potke	u pravcu osnove	u pravcu potke		
platno	9,6	9,9	400	350	82	0,17

5.2. Hemikalije

- ABTS radikal: 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), p.a. čistoća, „Sigma-Aldrich”, Beč, Austrija
- Azot, gas – 99,995 % čistoća, „Messer Tehnogas”, Beograd, Srbija
- BSA: goveđi serumski albumin, p.a. čistoća, „Sigma-Aldrich”, Beč, Austrija
- Cink-acetat dihidrat, Zn(CH₃COO)₂ x 2H₂O – p.a. čistoća, „Sigma-Aldrich”, Beč, Austrija
- Fenolftalein indikator, C₂₀H₁₄O₄ – p.a. čistoća, „Kemika”, Zagreb, Hrvatska
- Hitozan niske molekulske mase (Aldrich, 448869), 75%-85% deacetilovan, „Sigma-Aldrich”, Beč, Austrija
- Hlorovodonična kiselina, HCl – 37% rastvor, „Sigma-Aldrich”, Beč, Austrija
- Hlorovodonična kiselina, HCl – 0,1 M titrival, „Mol d.o.o.”, Stara Pazova, Srbija
- Kalijum-dihidrogen fosfat, KH₂PO₄ – kristalna so, p.a. čistoća, „Sigma-Aldrich”, Beč, Austrija
- Kalijum-hlorid, KCl – kristalna so, p.a. čistoća, „Sigma-Aldrich”, Beč, Austrija
- Natrijum-bromid, NaBr – kristalna so, p.a. čistoća, „Sigma-Aldrich”, Beč, Austrija
- Natrijum-hidroksid, NaOH – 0,1 N titrival, „Mol d.o.o.”, Stara Pazova, Srbija
- Natrijum-hidroksid, NaOH – p.a. čistoća, „Sigma-Aldrich”, Beč, Austrija
- Natrijum-hidrogenfosfat, Na₂HPO₄ – p.a. čistoća, „Sigma-Aldrich”, Beč, Austrija
- Natrijum-hipohlorit, NaClO – rastvor sa 13% aktivnog hlora, „Sigma-Aldrich”, Beč, Austrija
- Natrijum-hlorid, NaCl – kristalna so, p.a. čistoća, „Sigma-Aldrich”, Beč, Austrija
- Natrijum-hlorit, NaClO₂ – kristalna so, p.a. čistoća, „Sigma-Aldrich”, Beč, Austrija

- Natrijum-tiosulfat, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ – titrival, 0,1 M, „Alfapanon”, Novi Sad, Srbija
- QCM-D senzori naslojeni zlatom, “LOT-Oriel”, Darmstadt, Nemačka
- Rastvorljivi skrob, $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ – „Alkaloid”, Skopje, Severna Makedonija
- Standardni sapun „SDC enterprises limited”, Velika Britanija
- Tablete za pripremu 0,1 M fosfatnog pufera pH 7, p.a. čistoća, „Sigma-Aldrich”, Beč, Austrija
- TEMPO radikal: 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil radikal, $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{NO}$, 98 %, „Sigma-Aldrich”, Beč, Austrija
- TPP: Natrijum-tripolifosfat, $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ – kristalna so, p.a. čistoća, „Sigma-Aldrich”, Beč, Austrija
- Trimetilsilil celuloza, TMSC, sa stepenom supstitucije 2,55 proizvedena je na Thüringisches Institut für Textil- und Kunststoff-Forschung.V., Rudolstadt, Nemačka

5.3. Indikatorski mikroorganizmi i hranljive podloge

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- Tripton soja bujon (TSB), Torlak, Srbija
- Kvašćev ekstrakt, Torlak, Srbija
- Agar, Torlak, Srbija

6. Postupci dobijanja nanostrukturnih materijala na bazi celuloze i hitozana

6.1. Dobijanje disperzija na bazi TOCN

Postupak dobijanja disperzije TOCN: Pamučna vlakna su TEMPO oksidisana prema ranije opisanom postupku⁵. Ukratko, 10 g pamučnih vlakna suspendovano je u vodi (750 ml u kojoj su prethodno rastvoreni TEMPO (0,0250 g) i natrijum-bromid (0,250 g). Određena zapremina rastvora NaClO (13 mas. %), koja odgovara količini 15 mmol·g⁻¹ celuloze, je polako dodavana u celuloznu suspenziju uz neprekidno mešanje. pH vrednost suspenzije održavana je na 10,5 dodavanjem 0,5 M NaOH tokom 3 h na sobnoj temperaturi. Nakon 3h oksidacija je prekinuta dodatkom etanola (oko 5 ml). Oksidisana celuloza je temeljno isprana vodom, zatim etanolom i na kraju vodom, preko filter papira postavljenog na bihnerovom levku.

Kako bi se dobili TEMPO oksidisani celulozni nanofibrili sa natrijum-karboksilatnim grupama (TOCN-COONa) dispergovani u vodi, suspenzije TEMPO oksidisanih pamučnih vlakana (0,1, 0,5 i 1 mas. %) i vode (100 ml) su tretirane na homogenizatoru sa dvostrukim cilindrom (T 25 digital ULTRA-TURRAX, IKA, Staufen, Germany) tokom 5 min na 1000 o·min⁻¹, i nakon toga 15 min na ultrazvučnom homogenizatoru (WCX 750, SONICS, Newtown, Australia) sa sondom prečnika 19 mm na 20 kHz i 750 W izlazne snage.

Postupak dobijanja amfoterne smeše na bazi TOCN i hitozana: 1% (w/v) amfoterna TOCN+CS smeša (TOCN+CS) dobijena je mešanjem 50 ml 2% (w/v) disperzije TOCN (pH 8,0), 22 ml 0,5% (v/v) rastvora CS (pH 2,5), i 39 ml Milli-Q (MQ) vode (pH 5,5) i njihovom naknadnom homogenizacijom tokom 1 min na ultrazvučnom homogenizatoru (VCKS 750, SONICS, USA) sa sondom prečnika 9 mm na 20 kHz i 500 W izlazne snage.

6.2. Postupci dobijanja disperzija nanočestica hitozana sa i bez inkorporiranih jona cinka

Dobijanje disperzije nanočestica hitozana: Nanočestice hitozana (NCS) su dobijene jonotropnim geliranjem prema modifikovanoj metodi opisanoj od strane Gan i sar.²⁷⁵. 0,5% suspenzija hitozana i destilovane vode, čiji je pH podešen na pH 2,5 dodatkom 1 M HCl, mešana je 24 h upotrebom magnetne mešalice na sobnoj temperaturi tj. do potpunog rastvaranja hitozana. Natrijum-tripolifosfat (TPP) je rastvoren u destilovanoj vodi pri koncentraciji 1 mg·ml⁻¹. Rastvor TPP, u formi kapljica, je dodat u rastvor hitozana pri odnosu 1:1 (w/w). Disperzija nanočestica hitozana je dobijena mešanjem ova dva rastvora tokom 1 h primenom laboratorijske magnetne mešalice pri čemu su nanočestice hitozana spontano formirane. Konačni pH disperzije nanočestica hitozana je podešen na pH 5,5 dodatkom 0,5 M NaOH.

Dobijanje disperzije nanočestica hitozana sa inkorporiranim jonima cinka: Disperzija nanočestica hitozana sa inkorporiranim jonima cinka je dobijena dodatkom 3% rastvora cink-acetata dihidrata u formi kapljica disperziji nanočestica hitozana, pripremljenoj prema prethodno opisanom postupku, pri

odnosu 10:1 (w/w). Konačni pH disperzije nanočestica hitozana je podešen na pH 5,5 dodatkom 0,5 M NaOH.

6.3. Postupci dobijanja ultra-tankih filmova na bazi celuloze, TOCN i hitozana

Pre pripreme ultra-tankih filmova metodom rotirajućeg diska QCM-D senzori su potopljeni u smešu $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}_2$ (30%)/ NH_4OH (25%; 5:1:1; v/v/v) tokom 10 min na 70 °C, nakon toga uronjeni u "piranha" rastvor koji sadrži H_2O_2 (30%)/ H_2SO_4 (98%; 1:3; v/v) tokom 60 s, zatim isprani sa MQ vodom i na kraju osušeni sa gasom N_2 .

Pet različitih metodaje primenjeno za dobijanje ultra-tankih filmova:

Metoda I, jednoslojni RC film: Za naslojavanje metodom rotirajućeg diska trimetilsililceluloza (TMSC), 100 μl rastvora TMSC (1% w/v), rastvorenog u heksametildisiloksanu (HMDSO) i isfiltriranog preko 5 μm PTFE špric filtera, naneta je na QCM-D senzore, zatim rotirana 60 s pri brzini rotiranja 4000 $\text{o}\cdot\text{min}^{-1}$ i ubrzanju 2500 $\text{o}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Radi pretvaranja TMSC u čistu celulozu, TMSC naslojeni senzori su postavljeni u polistirensku Petri posudu (5 cm \varnothing) sa 3 ml 10% HCl. Posuda je bila poklopljena sa poklopcem tokom 15 min radi izlaganja TMSC parama HCl.

Metoda II, dvoslojni RC/TOCN filmovi: Prvi sloj je pripremljen prema metodi I. Nakon toga, za naslojavanje metodom rotirajućeg diska TOCN, 50 μl disperzije TOCN (0,1%, 0,5% i 1% w/v) je naneto na sloj RC, rotirano 60 s na 4000 $\text{o}\cdot\text{min}^{-1}$ pri ubrzanju od 2500 $\text{o}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$.

Metoda III, dvoslojni RC/amfoterni TOCN+CS film: Prvi sloj je pripremljen prema metodi I. Nakon toga, za naslojavanje metodom rotirajućeg diska amfoterne smeše na bazi CS i TOCN, 50 μl amfoterne smeše CS+TOCN (1% w/v) je naneto na RC sloj, rotirano 60 s na 4000 $\text{o}\cdot\text{min}^{-1}$ pri ubrzanju od 2500 $\text{o}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$.

Metoda IV, dvoslojni RC/CS film: nakon dobijanja ultra-tankog filma prema *metodi I*, primenom QCM-D tehnike preko njegove površine propumpavan je 0,1 % rastvor CS, a zatim MQ voda.

Korišćeni 0,1 % rastvor CS dobijen je rastvaranjem hitozana (0,1 mas%) u MQ vodi sa prethodno podešenim pH na 2,5 dodatkom 37% HCl. Rastvor je mešan preko noći na sobnoj temperaturi i nakon toga isfiltriran kroz 5 μm PTFE filter (Kinesis, Cheshire, Velika Britanija).

Metoda V, troslojni RC/TOCN/CS filmovi: nakon dobijanja ultra-tankih filmova prema *metodi II*, primenom QCM-D tehnike preko njihove površine propumpavan je 0,1% rastvor CS (čija priprema je opisana u metodi IV), a zatim MQ voda.

Oznake uzoraka sa opisom su prikazane u Tabeli 5.

Tabela 5. Oznake i opisi uzoraka ultra-tankih filmova

Oznaka uzorka	Opis uzorka
RC	RC ultra-tanki film (metoda I)
RC/0,1% TOCN	RC ultra-tanki film naslojen sa 0,1% TOCN disperzijom (metoda II)
RC/0,5% TOCN	RC ultra-tanki film naslojen sa 0,5% TOCN disperzijom (metoda II)
RC/1% TOCN	RC ultra-tanki film naslojen sa 1% TOCN disperzijom (metoda II)
RC/1% TOCN+CS	RC ultra-tanki film naslojen sa 1% amfoternom TOCN+CS smešom (metoda III)
RC/CS	RC ultra-tanki film (metoda I) nakon adsorpcije/desorpcije CS
RC/0,1% TOCN/CS	RC ultra-tanki film naslojen sa 0,1% TOCN disperzijom (metoda II) nakon adsorpcije/desorpcije CS
RC/0,5% TOCN/CS	RC ultra-tanki film naslojen sa 0,5% TOCN disperzijom (metoda II) nakon adsorpcije/desorpcije CS
RC/1% TOCN/CS	RC ultra-tanki film naslojen sa 1% TOCN disperzijom (metoda II) nakon adsorpcije/desorpcije CS

Radi određivanja antibakterijske aktivnosti, izabrani ultra-tanki filmovi pripremljeni su u makro obliku, metodom izlivanja, prema četiri metode:

Metoda VI, jednoslojni Cs film: Cs film je pripremljen izlivanjem 8 ml 0,5% (mas) rastvora CS u plastičnu Petri posudu (35 mm Ø, Sam-Plast, Čačak, Srbija) i sušenjem na sobnoj temperaturi do konstantne mase.

Korišćeni 0,5 % rastvor CS dobijen je rastvaranjem hitozana (0,5 mas%) u MQ vodi sa prethodno podešenim pH na 2,5 dodatkom 37% HCl. Rastvor je mešan preko noći na sobnoj temperaturi i nakon toga isfiltriran kroz 5 µm PTFE filter (Kinesis, Cheshire, Velika Britanija). Nakon toga, pH rastvora CS je podešen na 5,5 dodatkom 0,5M NaOH.

Metoda VII, dvoslojni RC-TOCN film: prvi sloj je napravljen izlivanjem 2 ml 1% (mas) TMSC rastvorenog u HMDSO u plastičnu Petri posudu (35 mm Ø), uz naknadnu konverziju TMSC u čistu celulozu izlaganjem parama 10% HCl, dok je drugi sloj napravljen izlivanjem 2 ml 1% (mas) disperzije TOCN preko RC sloja i sušenjem na sobnoj temperaturi do konstantne mase.

Metoda VIII, dvoslojni RC-(1% TOCN+CS) film: prvi sloj je napravljen kao što je prethodno opisano u metodi VII, dok je drugi sloj napravljen izlivanjem 2 ml 1% (mas) amfoterne TOCN+CS smeše preko RC sloja i sušenjem na sobnoj temperaturi.

Metoda IX, troslojni RC-TOCN-CS film: 5 ml 0,1% (mas) rastvora CS (pH 5,5) izliveno je preko prethodno napravljenog RC/TOCN dvoslojnog filma prema metodi VII. Reverzibilno vezan CS je uklonjen neprekidnim ispiranjem filma sa 20 ml MQ vode tokom 240 min, u porcijama od 5 ml tokom 60 min. Troslojni RC/TOCN/CS film je osušen na sobnoj temperaturi.

Korišćeni 0,1 % (mas) rastvor CS dobijen je rastvaranjem hitozana (0,1 mas%) u MQ vodi sa prethodno podešenim pH na 2,5 dodatkom 37% HCl. Rastvor je mešan preko noći na sobnoj temperaturi i nakon toga isfiltriran kroz 5 µm PTFE filter (Kinesis, Cheshire, Velika Britanija). Nakon toga, pH rastvora CS je dodatkom 0,5M NaOH podešen na 5,5.

Oznake uzoraka sa opisom su prikazane u Tabeli 6.

Tabela 6. Oznake i opisi uzoraka makro filmova

Oznaka uzorka	Opis uzorka
RC-TOCN	Dvoslojni film na bazi RC i CS
RC-(1% TOCN+CS)	Dvoslojni film na bazi RC i 1% amfoterne TOCN+CS smeše
Cs	Jednoslojni film na bazi CS
RC-TOCN-CS	Troslojni film na bazi RC i TOCN nakon adsorpcije CS

6.4. Pred-tretmani viskoznih tkanina

Kako bi se poboljšala adsorpcija CS, NCS i NCS+Zn na viskozu, primenjena su dva različita pred-tretmana viskoze radi uvođenja karboksilnih i aldehidnih grupa kao vezujućih mesta za amino grupe hitozana:

TEMPO oksidacija pri neutralnim uslovima (pH 7): TEMPO oksidacija izvršena je prema ranije opisanom postupku^{18,19}. Viskozna tkanina (10 g) potopljena je u 0,05 M natrijum-fosfatni pufer pH vrednosti 7 (50 ml rastvora fosfatnog pufera/g viskozne tkanine) u kojem je prethodno rastvoren TEMPO (20 mg TEMPO/g viskozne tkanine). Zatim je dodat natrijum-hlorit (50 mg NaClO₂/g viskozne tkanine) i rastvor natrijum-hipohlorita (2,5 mmol NaClO/g viskozne tkanine). Mešanje svih navedenih komponenti vršeno je na temperaturi od 60 °C tokom 5 min upotrebom laboratorijske mešalice pri brzini mešanja 200 o·min⁻¹. Nakon 5 min, oksidacija je prekinuta dodatkom etanola (oko 5 ml). Oksidisana viskozna tkanina temeljno je isprana vodom, zatim etanolom i osušena na sobnoj temperaturi.

Naslojavanje viskozne tkanine sa 0,5 mas. % disperzijom TOCN: Naslojavanje je trajalo 30 min na sobnoj temperaturi pri odnosu kupatila 1:50 i 100% upijanju. Uzorci su zatim iscedeni na laboratorijskom fulardu (Rapid, Istanbul, Turkey) pod pritiskom od 2 bara. Nakon što je višak tečnosti uklonjen, tkanina je sušena na 40°C tokom 30 min u laboratorijskoj sušnici (Instrumentaria, Zagreb, Croatia).

Iscrpljenje TOCN iz disperzije tokom impregnacije viskozne tkanine određeno je pH-potenciometrijskim titracijama (metoda opisana u poglavlju 7.3.) vršenim na disperzijama TOCN, pre i posle impregnacije viskozne tkanine. Uzorci za titraciju su pripremljeni dodavanjem 10 ml MQ vode u 20 ml prethodno izdijalizirane disperzije. Iz razlike u ukupnoj količini naelektrisanja 0,5% disperzije TOCN pre i posle impregnacije viskozne tkanine izračunata je količina TOCN adsorbovanih na viskoznoj tkanini tokom impregnacije.

Pred-tretirani uzorci su kondicionirani prema SRPS EN ISO 139:2007 (T=20±2 °C; RV=65±4%) pre funkcionalizacije sa hitozanom.

6.5. Funkcionalizovanje viskoznih tkanina hitozanom i nanočesticama hitozana

Funkcionalizovanje viskoznih tkanina hitozanom: 0,5% rastvor hitozana je dobijen potapanjem hitozana u destilovanu vodu, nakon čega je pH podešen na 2,5 uz upotrebu hlorovodonične kiseline (1 M HCl). Dobijena suspenzija je zatim mešana 24 h upotrebom laboratorijske magnetne mešalice na sobnoj temperaturi do potpunog rastvaranja hitozana. Konačna pH vrednost rastvora hitozana je podešena na 5,5 dodavanjem 0,5 M NaOH.

Nakon toga, nemodifikovana i pred-tretirane viskozne tkanine potopljene su u 0,5 % vodeni rastvor hitozana. Funkcionalizacija je trajala 30 min na sobnoj temperaturi pri odnosu kupatila 1:50 i 100% upijanju. Uzorci su zatim iscedeni na laboratorijskom fulardu (Rapid, Istanbul, Turkey) pod pritiskom od 2 bara. Nakon uklanjanja viška tečnosti, tkanine su sušene na 40°C u laboratorijskoj sušnici (Instrumentaria, Zagreb, Croatia) tokom 30 min. Nakon toga uzorci su dovedeni u standardno stanje prema SRPS EN ISO 139:2007 ($T=20\pm 2$ °C; $RV=65\pm 4\%$) pre daljih analiza.

Funkcionalizovanje viskoznih tkanina nanočesticama hitozana: Nemodifikovana i pred-tretirane viskozne tkanine potopljene su u disperziju: nanočestica hitozana i nanočestica hitozana sa inkorporiranim jonima cinka.

Funkcionalizacija je trajala 30 min na sobnoj temperaturi pri odnosu kupatila 1:50 i 100% upijanju. Uzorci su zatim iscedeni na laboratorijskom fulardu (Rapid, Istanbul, Turkey) pod pritiskom od 2 bara. Nakon uklanjanja viška tečnosti, tkanine su sušene na 40 °C u laboratorijskoj sušnici (Instrumentaria, Zagreb, Croatia) tokom 30 min. Nakon toga uzorci su dovedeni u standardno stanje prema SRPS EN ISO 139:2007 ($T=20\pm 2$ °C; $RV=65\pm 4\%$) pre daljih analiza.

Kako bi se stekao uvid u postojanost funkcionalizacije sa hitozanom i nanočesticama hitozana, izvršeno je pranje viskoznih tkanina prema standardu ISO 105-C10, tokom 30 minuta sa 0,5 % rastvorom standardnog sapuna na temperaturi od 40 °C. Nakon toga, uzorci su ispirani 1 min destilovanom, a zatim još 1 min tekućom vodom. Nakon ispiranja uzorci su osušeni u sušnici na 40 °C (Instrumentaria, Zagreb, Croatia).

Oznake uzoraka pre i posle pranja prikazane su u Tabeli 7.

Tabela 7. Označe uzoraka viskoznih tkanina pre i posle pranja

Opis uzoraka	Ciklus pranja			
	0	1	3	5
Nemodifikovana viskoza	CV	-	-	-
TEMPO oksidisana viskoza	TEMPO CV	-	-	-
Viskoza naslojena sa TOCN	TOCN CV	-	-	-
CV+rastvor hitozana	CV/CS	CV/CS-1	CV/CS-3	CV/CS-5
TEMPO CV+ rastvor hitozana	TEMPO CV/CS	TEMPO CV/CS-1	TEMPO CV/CS-3	TEMPO CV/CS-5
TOCN CV+ rastvor hitozana	TOCN CV/CS	TOCN CV/CS-1	TOCN CV/CS-3	TOCN CV/CS-5
CV+ nanočestice hitozana	CV/NCS	CV/NCS-1	CV/NCS-3	CV/NCS-5
TEMPO CV+ nanočestice hitozana	TEMPO CV/NCS	TEMPO CV/NCS-1	TEMPO CV/NCS-3	TEMPO CV/NCS-5
TOCN CV+ nanočestice hitozana	TOCN CV/NCS	TOCN CV/NCS-1	TOCN CV/NCS-3	TOCN CV/NCS-5
CV+ nanočestice hitozana sa inkorporiranim jonima cinka	CV/NCS+Zn	CV/NCS+Zn-1	CV/NCS+Zn-3	CV/NCS+Zn-5
TEMPO CV+ nanočestice hitozana sa inkorporiranim jonima cinka	TEMPO CV/NCS+Zn	TEMPO CV/NCS+Zn-1	TEMPO CV/NCS+Zn-3	TEMPO CV/NCS+Zn-5
TOCN CV+ nanočestice hitozana sa inkorporiranim jonima cinka	TOCN CV/NCS+Zn	TOCN CV/NCS+Zn-1	TOCN CV/NCS+Zn-3	TOCN CV/NCS+Zn-5

7. Metode karakterizacije

7.1. Određivanje molekulske mase TEMPO oksidisanih pamučnih vlakana i TOCN

Gel propusna hromatografija (GPC) je korišćena za karakterisanje celuloze sa aspekta molekulske mase i raspodele molekulskih masa. Uzorci celuloze rastvarani su u rastvaraču dimetilacetamid/litijum-hlorid (DMAc/LiCl) (9 % w/v) primenjujući standardnu proceduru opisanu u radu²⁷⁶. Elementi i parametri korišćeni za GPC analizu su: rastvarač (pokretna faza) - DMAc/LiCl (0,9% w/v) filtriran pomoću 0,02 µm filtera Anodisc (Whatman); protok 1,0 ml·min⁻¹; zapremina ubrizgavanja - 100 µl; GPC kolone 4x PL-gel Mixed A AS 7,5 x 300 mm, Polymer Laboratories; temperatura 25 °C; detektori: RI detektor, Shodex RI-71, MALLS detektor, Wyatt Dawn DSP sa argonskim laserom (λ₀= 488nm); vreme po uzorku - 45 min. Obrada dobijenih podataka je rađena pomoću programa Astra i GRAMS/32.

7.2. Određivanje sadržaja karboksilnih i karbonilnih grupa u celulozi

Karboksilne grupe celuloze reaguju sa solima slabijih kiselina kao što je kalcijum-acetat, formirajući so celuloze i oslobađajući ekvivalentnu količinu slabije kiseline. Na osnovu toga i modifikacije kalcijum-acetatne metode²⁷⁷ za određivanje sadržaja karboksilnih grupa u TEMPO oksidisanim celuloznim vlaknima/viskoznoj tkanini, primenjen je sledeći postupak. Uzorci mase 0,5 g tretirani su sa 100 ml 0,01 M HCl u trajanju 1 h, a potom isprani destilovanom vodom. Nakon toga, uzorci su potopljeni u 30 ml 0,25 M kalcijum-acetata i 50 ml destilovane vode i mešani 2 h u tom rastvoru. Od ukupnih 80 ml uzeto je po 30 ml za titraciju sa 0,01 M NaOH uz fenolftalein kao indikator. Sadržaj COOH grupa izračunat je po formuli:

$$COOH = \frac{80}{30} \cdot \frac{0,01 \cdot V(NaOH)}{m(1 - \frac{w}{100})}, \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ celuloze} \quad (9)$$

gde je:

0,01 molaritet rastvora NaOH korišćenog za titraciju,

V zapremina rastvora NaOH utrošena za titraciju (ml),

m masa uzorka koji se tretira (g),

w sadržaj vlage uzorka (%).

Za određivanje sadržaja karbonilnih grupa upotrebljena je *Parks* i *Hebert*-ova metoda^{277, 278}. Karbonilne grupe su prevedene u karboksilne tako što je u 50 ml destilovane vode dodato 10 ml 5 M CH₃COOH, uzorci mase 1 g i 0,905 g NaClO₂. Uzorci su mešani 48 h u drmalici na sobnoj temperaturi, a potom ispirani destilovanom vodom i acetonom i osušeni na vazduhu do konstantne mase. Dalje je primenjena prethodno opisana metoda za određivanje sadržaja COOH grupa.

Od ovako dobijenih vrednosti, koje predstavljaju sadržaj karboksilnih grupa nastao prevođenjem svih karbonilnih grupa u karboksilne, oduzete su vrednosti za sadržaj karboksilnih grupa prisutnih u uzorcima pre oksidacije hloritom u cilju dobijanja vrednosti sadržaja karbonilnih grupa.

7.3. Određivanje naelektrisanja TOCN, hitozana i njihove amfoterne smeše u zavisnosti od pH

Ponašanje naelektrisanja TOCN, hitozana i njihove amfoterne smeše u zavisnosti od pH određeno je pH-potenciometrijskim titracijama vršenim u direktnom (iz kiselog u bazno) i povratnom smeru (iz baznog u kiselo) upotrebom 0,1 M HCl i 0,1 M NaOH. Titrant je dodavan u sistem po dinamičkom modu upotrebom duple birete Mettler Toledo T70 (Kolambus, Sjedinjene Američke Države) automatske titracione jedinice (Mettler Toledo, Kolambus, Sjedinjene Američke Države). pH vrednost je merena upotrebom Mettler Toledo DG-111-SC kombinovane staklene elektrode (Kolambus, Sjedinjene Američke Države). Titracija je izvršena na prethodno izdijaliziranoj 0,1 % TOCN disperziji. Uzorak je pripremljen tako što je odmereno 20 ml 0,1 % TOCN disperzije i u nju dodato 10 ml MQ vode.

Isti postupak, primenjen je i na 0,1% rastvoru hitozana, kao i na 1% amfoternoj smeši TOCN i hitozana.

7.4. Određivanje mutnoće TOCN disperzija

Mutnoća 0,1%, 0,5%, 1% i 2% disperzije je određena nefelometrijskom metodom upotrebom terenskog turbidimetra TB 1 (VELP scientifica, Usmate Velate, Italija).

7.5. Određivanje zeta potencijala, veličine čestica i indeksa polidisperznosti TOCN, NCS sa i bez inkorporiranih jona cinka

Zeta potencijal, indeks polidisperznosti i veličina čestica TOCN, NCS sa i bez inkorporiranih jona cinka, određeni su u intervalu pH vrednosti od 2 do 12. Uzorci su pripremljeni tako što je odmereno 2 ml disperzije, čemu je dodato 18 ml vode. Merenja su izvršena na uređaju Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., London, Velika Britanija) koji istovremeno meri potencijal strujanja, primenjen pritisak, specifičnu provodljivost, pH vrednost i temperaturu rastvora.

7.6. FTIR analiza

ATR-FTIR spektri CS i svih uzoraka viskoznih tkanina snimljeni su korišćenjem Shimadzu IRA Infinity-1 (FT-IR) spektrofotometra (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) opremljenog sa priborom za prigušenu totalnu refleksiju upotrebom dijamant/ZnSe kristala u opsegu talasnih brojeva od 600 do 4000 cm^{-1} , sa rezolucijom od 2 cm^{-1} i pri modu skeniranja 20. Pre ATR-FTIR merenja, uzorci su sušeni preko noći na 40 °C i čuvani u eksikatoru do merenja.

7.7. Elementalna analiza

Sadržaj azota u funkcionalizovanim viskoznim tkaninama izračunat je iz procenta azota određenog elementalnom analizom korišćenjem uređaja Vario EL III C,H,N,S/O (Elementar Analysensysteme GmbH, Langensfeld, Nemačka) i termoprovodljivog detektora (TCD, thermal conductivity detector). Uzorak je sagorevan na 1150 °C u struji kiseonika i prisustvu katalizatora, a noseći gas bio je helijum.

Radni opseg aparata je sledeći:

C: 0,03-20 mg

H: 0,03-3 mg

N: 0,03-2 mg

S: 0,03-6 mg

7.8. ICP-OES analiza

Sadržaj cinka u NCS+Zn funkcionalizovanim tkaninama određen je tako što je prvo poznata masa uzorka tkanine totalno mineralizovana postupkom mikrotalasne digestije. Digestija je urađena u sistemu za digestiju upotrebom HPR-1000/10S rotora pod visokim pritiskom. Oko 0,25 g uzorka je stavljeno u mešavinu 8 ml HNO_3 (65%) i 1 ml H_2O_2 (30%) i zagrevano tokom 20 minuta u mikrotalasnom sistemu na 180 °C. Nakon hlađenja uzorci rastvora su razblaženi u normalnom sudu do 25 ml.

Za određivanje koncentracije jona cinka u tečnim uzorcima koji su dobijeni posle mineralizacije uzoraka tkanine korišćena je analitička tehnika induktivno kuplovana plazma sa optičkom emisijom spektrometrijom (ICP-OES). Analiza je rađena na instrumentu Thermo Scientific iCAP 6500 Duo ICP (Kembridž, Velika Britanija). U ovom instrumentu se koristi poboljšani CID (*engl.* charge injection device detector) koji omogućava bolju rezoluciju i niži šum signala u odnosu na predhodnu generaciju detektora. Optički sistem je bio ispran sa argonom, a Echelle polihromator je termostatiran na 38 °C.

Kalibracija je rađena koristeći standardnu seriju rastvora u očekivanom opsegu koncentracija ispitivanog metala. Kvantifikacija je rađena na emisioj liniji: Zn I 213,856 nm.

7.9. Merenje zeta potencijala

Zeta potencijal viskoznih tkanina određen je metodom potencijala strujanja pomoću SurPASS elektrokinetičkog analizatora (Anton Paar GmbH, Grac, Austrija). Pravougaoni uzorak tkanine (8 cm × 2 cm) je montiran u cilindričnu ćeliju, tako da formira propusni čep. Reproductivna gustina pakovanja propusnog čepa održavana je praćenjem veličine i mase uzorka, kao i kontrolisanjem kompresije uzorka u mernoj ćeliji. Za svaki uzorak su izvršena četiri merenja, a standardna devijacija je bila do 5%.

Merenja zeta potencijala u zavisnosti od pH izvršena su kako bi se ispitala elektrokinetička svojstva viskoznih tkanina na različitim pH vrednostima. Da bi se izbegao uticaj bubrenja supstrata na zeta potencijal, uzorci su potopljeni u dejonizovanu vodu 30 minuta pre merenja. Kao elektrolit je korišćen 0,001 M rastvor KCl, a početni pH je podešen na pH 10 dodatkom NaOH, dok su, tokom automatskih titracija, promene u pH (od oko pH 10 do pH 3) postignute dodavanjem 0,05 M HCl. Pošto jonska jačina rastvora elektrolita tokom merenja u regionu niskog pH može uticati na zeta potencijal²⁷⁹ merenja su vršena do pH 3. Izoelektrične tačke (IET) niže od 3 su određene ekstrapolacijom eksperimentalnih podataka.

Merenje zeta potencijala u zavisnosti od vremena izvršeno je kako bi se stekao uvid u stabilnost TEMPO oksidisanih celuloznih nanofibrila na viskoznoj tkanini. Eventualne promene zeta potencijala, merenog pri istom pH, tokom napredovanja vremena izloženosti viskozne tkanine naslojene TOCN tečnosti su indikator promena u elektrokinetičkim svojstvima njene površine odnosno otpuštanja TOCN sa njene površine. Kao elektrolit korišćen je 0,001 M rastvor KCl, pri čemu je pH rastvora iznosio 5,5. Merenja zeta potencijala na pomenutom pH vršena su tokom 150 min u vremenskim intervalima od 6,5 min.

7.10. SEM analiza

Carl Zeiss (FE-SEM SUPRA 35 VP, Nemačka) skenirajući elektronski mikroskop korišćen je za proučavanje morfologije površine TEMPO oksidisanih pamučnih vlakana. Uzorci su pre snimanja podvrgnuti naparavanju zlatom. Slike su snimljene sa radnim naponom od 1 kV na radnom rastojanju od 4,5 mm.

JEOL JSM-5300 skenirajući elektronski mikroskop (JEOL, Tokijo, Japan) korišćen je za proučavanje morfologije površine nanočestica hitozana sa i bez inkorporiranih jona cinka kao i viskoznih vlakana. Disperzije nanočestica hitozana sa i bez inkorporiranih jona cinka su pre snimanja izlivena na čvrstu podlogu i osušene. Nakon toga, osušene disperzije tj. nanočestice hitozana sa i bez inkorporiranih jona cinka kao i viskozna vlakna su pre snimanja naparavani zlatom na uređaju za naparavanje ION SPUTTER, JEOL, model JFC-1100E (JEOL, Tokijo, Japan).

7.11. AFM analiza

Morfologija površine TOCN, NCS, NCS+Zn i filmova napravljenih prema metodama I i II (pre i posle adsorpcije hitozana primenom QCM-D tehnike) okarakterisana je sa mikroskopom Agilent 5500 AFM, u tapkajućem režimu i uz upotrebu sonde sa višestrukim skeniranjem (Digital Instruments, Santa Barbara, CA). Za potrebe snimanja morfologije površine, 100 μl 1% disperzije TOCN naneto je na metalnu pločicu i metodom rotirajućeg diska rotirano 60 s pri brzini rotiranja $4000 \text{ o} \cdot \text{min}^{-1}$ i ubrzanju $2500 \text{ o} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, dok je 100 μl 0,1% disperzija NCS i NCS+Zn naneto na silikonske pločice u obliku kapi i osušeno na sobnoj temperaturi. Površine filmova su skenirane silicijumskom konzolom (ATECNC-20, Nanosensors, Nemačka) sa rezonantnom frekvencijom od 210-490 kHz i konstantom silom od 12-110 $\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$. Veličina skenirane slike bila je 1 μm x 1 μm . Sva merenja izvršena su na sobnoj temperaturi.

7.12. Kvarc-kristal mikrovaga sa praćenjem disipacije (QCM-D)

U ovoj doktorskoj disertaciji, kvarc-kristal mikrovaga sa praćenjem disipacije (model E4, Q-Sense, Gothenburg, Švedska) korišćena je za ispitivanje sadržaja vode, kao i adsorpcije hitozana i proteina na celulozne filmove. QCM-D uređaj registruje promene u frekvenciji (f) oscilujućeg kristala kvarca prouzrokovane promenom mase, pri čemu negativne promene frekvencije (Δf) ukazuju na povećanje mase.

Promena frekvencije može biti direktno povezana sa adsorbovanom masom upotrebom *Sauerbrey*-ove jednačine²⁸⁰:

$$\Delta f = -C \frac{\Delta m}{n} \quad (10)$$

gde je:

Δf promena frekvencije,

Δm promena mase,

C *Sauerbrey*-ova konstanta ($C = 17,7 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{Hz}^{-1}$ na frekvenciji od 5 MHz), a

n broj overtona ($n = 1, 3, 5, \text{ itd.}$) oscilacije.

Sauerbrey-ova jednačina je primenljiva samo za tanke i krute filmove koji u potpunosti osciluju sa kvarcnim senzorom. U slučaju viskoelastičnih filmova koji ne osciluju u potpunosti sa kvarcnim senzorom, *Sauerbrey*-ova jednačina postaje nevažeća usled rasipanja energije u filmu. Ovo rasipanje tj. disipacija (D) je definisana kao:

$$D = \frac{E_{diss}}{2\pi E_{stor}} \quad (11)$$

gde je:

E_{diss} rasuta energija, a

E_{stor} je ukupna energija uskladištena u oscilatoru tokom jednog ciklusa oscilovanja²⁸⁰.

Filmovi ispitivani u ovoj doktorskoj disertaciji tretirani su kao kruti produžetak kvarcnog kristala nakon izvršenih procena korišćenjem *Sauerbrey*-ove jednačine.

Za analizu podataka korišćena je promena u trećoj frekvenciji (f_3). Za sve QCM-D eksperimente, izmerena je početna rezonantna frekvencija senzora naslojenih filmovima u QCM-D protočnoj ćeliji. Nakon toga, filmovi su zasićeni sa MQ vodom posle čega su ispirani sa pozadinskim rastvorom (MQ voda je korišćena za određivanje sadržaja vode i eksperimente adsorpcije sa hitozanom, dok je PBS pufer korišćen za eksperimente adsorpcije proteina) dok se nije uspostavila konstantna frekvencija.

7.12.1. Određivanje sadržaja vode

Da bi se odredio ravnotežni sadržaj vode, filmovi su podvrgnuti bubrenju u H₂O i D₂O. Sadržaj vode je određen pomoću QCM-D uređaja metodom zamene rastvarača H₂O/D₂O kao što je opisano u radu *Kittle* i sar.²⁸¹. Razlike u viskoznosti/gustini H₂O i D₂O utiču na rezonantnu frekvenciju odgovarajuće frakcije rastvarača, a promene frakcije rastvarača $\Delta f_{solvent}$ mogu se izraziti *Kanazawa-Gordon*-ovom jednačinom²⁸²:

$$\frac{\Delta f_{solvent}}{n} = -f_0^{3/2} \sqrt{\frac{\eta_1 \rho_1}{\pi \rho_p \mu_p}} \quad (12)$$

Gde je:

n broj overtona,

f_0 osnovna frekvencija kristala (5 MHz),

ρ_1 gustina tečnosti (0,9982 g·cm⁻³ za H₂O i 1,1050 g·cm⁻³ za D₂O pri 20 °C, respektivno),

η_1 viskoznost tečnosti (1,002 cP za H₂O i 1,25 cP za D₂O na 20 °C, respektivno),

ρ_p gustina kvarca i

μ_p modul smicanja kvarca²⁸³.

Frekvencija podloge, Δf_{bare} , se može izračunati oduzimanjem Δf_{H_2O} od Δf_{D_2O} , a promena frekvencije usled adsorpcije vode može se odrediti prema jednačini²⁸⁴:

$$\frac{\Delta f_{H_2O}}{n} = \frac{\frac{\Delta f_{film}}{n} \frac{\Delta f_{bare}}{n}}{\frac{\rho_{D_2O}}{\rho_{H_2O}} - 1} \quad (13)$$

Ukupni sadržaj vode Γ_{water} (takođe nazivan i površinska koncentracija) može se izračunati prema jednačini²⁸¹:

$$\Gamma_{water} = -C \frac{\Delta f_{H_2O}}{n} \quad (14)$$

gde je:

C Sauerbrey-ova konstanta, a eksperimentalno utvrđena razlika u frekvenciji Δf_{bare} čiste zlatne podloge (QCM-D senzori) između H_2O i D_2O iznosi oko 68 Hz^{285} .

U ovoj doktorskoj disertaciji, nakon postavljanja filmova pripremljenih prema metodama I i II u QCM-D protočnu ćeliju, MQ voda je propušтана kroz protočnu ćeliju tokom 30 minuta. Nakon toga, MQ voda je zamenjena sa D_2O tokom 60 min, potom je D_2O zamenjen sa MQ vodom tokom 30 min nakon čega je dobijena početna frekvencija.

7.12.2. Određivanje adsorpcije hitozana

Radi određivanja adsorpcije hitozana pripremljen je 0,1 % rastvor hitozana rastvaranjem hitozana (0,1 mas%) u MQ vodi sa prethodno podešenim pH na 2,5 dodatkom 37% HCl. Rastvor je mešan preko noći na sobnoj temperaturi i nakon toga isfiltriran kroz 5 μm PTFE filter (Kinesis, Cheshire, Velika Britanija).

0,1 % rastvor hitozana napravljen je najmanje 24 sata pre njegove upotrebe.

U svakom QCM-D eksperimentu, Au senzori naslojeni celuloznim filmovima napravljenim prema metodama I i II su montirani u QCM-D protočnu ćeliju i zasićavani sa MQ vodom sve dok nije dobijen konstantan signal frekvencije. Nakon toga, sve frekvencije su podešene na nulu i merenje je pokrenuto. Pet minuta nakon protoka MQ vode, rastvor CS (0,1%, w/v) je uveden u sistem tokom 240 min radi adsorpcije na celulozne površine, a zatim su filmovi ispirani sa MQ vodom 60 min. Merenje je prekinuto u ovoj fazi. Brzina protoka tečnosti kroz protočnu ćeliju je održavana na $0,1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ tokom svih eksperimenata. Sva merenja su izvršena na $21 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Količina adsorbovanog CS je određena preko ukupne promene treće frekvencije oscilacije (f_3) nakon desorpcione faze sa vodom. Za svaki eksperiment adsorpcije korišćena su tri nezavisna senzora naslojena celuloznim filmovima, a frekvencija je izražena kao srednja vrednost.

Eksperimenti su izvedeni pri pH vrednostima 2 i 5,5. pH MQ vode i CS rastvora je podešen na pH 2 dodatkom 0,1 M HCl i na 5,5 dodatkom 0,1 M NaOH.

7.12.3. Određivanje adsorpcije proteina

Radi određivanja adsorpcije proteina pripremljen je rastvor BSA proteina rastvaranjem 5 g BSA u 100 ml prethodno pripremljenog fosfatnog pufera (PBS). Fosfatni pufer pripremljen je tako što je 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ i 0,24 g KH_2P_0_4 rastvoreno u 900 ml MQ vode, a zatim njegov pH podešen na 7,4 dodatkom 0,1 M NaOH. Nakon toga, dobijeni rastvor je dopunjen MQ vodom do zapremine od 1000 ml.

Rastvor BSA proteina napravljen je najmanje 24 sata pre njegove upotrebe.

Adsorpcija proteina je ispitana na filmovima napravljenim prema metodi II (RC/1% TOCN), pre i posle QCM-D eksperimenta adsorpcije hitozana, i prema metodi III (RC/1% TOCN+CS). U svakom

QCM-D eksperimentu, pre propuštanja rastvora proteina kroz protočnu ćeliju filmovi su zasićeni sa MQ vodom sve dok nije dobijen konstantan signal frekvencije. Nakon toga, sve frekvencije su podešene na nulu i merenje je pokrenuto. 5 min nakon protoka MQ vode, PBS-pufer je uveden u sistem narednih 10 min, a zatim BSA rastvor koncentracije $50 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ narednih 15 min. Na kraju, filmovi su ispirani sa PBS-puferom tokom 10 min radi desorpcije reverzibilno vezanih molekula proteina. Merenje je prekinuto u ovoj fazi. Brzina protoka je održavana na $0,1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ tokom svih eksperimenata. Sva merenja su izvršena na $21\pm 01 \text{ }^\circ\text{C}$ i fiziološkom pH 7,4. Količina adsorbovanih proteina je određena kao ukupna promena treće frekvencije oscilovanja (f_3) nakon desorpcione faze sa PBS-puferom. Za svaki eksperiment adsorpcije korišćena su tri nezavisna senzora naslojena celuloznim filmovima, a frekvencija je izražena kao srednja vrednost.

7.13. Određivanje sorpcionih svojstava

7.13.1. Određivanje mase sorbovane tečnosti i ugla kvašenja metodom kapilarnosti

Eksperimentalne metode zasnovane na merenjima kapilarnosti široko se koriste za karakterizaciju sorpcionih svojstava tekstilnih materijala. Među njima, merenje mase sorbovane tečnosti tokom vremena i određivanje kontaktnog ugla tečnosti na čvrstoj površini (tzv. ugla kvašenja) jedne su od najčešćih²⁸⁶. Najjednostavniji način analize rezultata dobijenih ovom tehnikom je preko *Washburn*-ove jednačine²⁸⁷:

$$h^2 = \frac{r\gamma\cos\theta}{2\eta}t \quad (15)$$

gde je:

h visina (mm) koju tečnost dostiže za vreme t (s),

r prečnik kapilare (mm),

γ površinski napon tečnosti ($\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$),

η viskoznost tečnosti (Pa s), i

θ ugao kvašenja ($^\circ$)²⁸⁷.

Washburn-ova jednačina predstavlja linearnu zavisnost kvadrata visine penjanja tečnosti uz uzorak i vremena. U slučaju tekstilnih materijala, smatrajući ih kao model snopa cilindričnih kapilara, primenjuje se modifikovana *Washburn*-ova jednačina²⁸⁶:

$$h^2 = \frac{(c\bar{r})\gamma\cos\theta t}{2\eta} \quad (16)$$

Jednačina (16) upotrebljena je za analizu rezultata dobijenih metodom kapilarnosti. Ukoliko se priraštaj visine tečnosti zameni sa priraštajem mase tečnosti m (g) tokom njenog penjanja kroz snop od n kapilara, *Washburn*-ova jednačina postaje jednostavnija²⁸⁶:

$$\frac{m^2}{t} = \frac{c\rho\gamma\cos\theta}{\eta} \quad (17)$$

u kojoj

$$c = \frac{1}{2}\pi^2\tau(\bar{r})^5n^2 \quad (18)$$

gde je:

m masa adsorbovane tečnosti (g),

ρ gustina tečnosti ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$),

n broj kapilara,

τ faktor tortuoznosti,

c koeficijent difuzije povezan sa uzorkom i fizičko-hemijskim svojstvima tečnosti (cm^5), i

\bar{r} srednji prečnik kapilara u celoj ispitivanoj zapremini materijala (mm)²⁸⁶.

U jednačini (17) figurišu dva nepoznata parametra, c i θ . Uobičajeni način za rešavanje ovog problema je da se definiše c upotrebom tečnosti koja u potpunosti kvazi čvrstu supstancu ($\theta = 0$). U tu svrhu, za tkanine ispitavane u ovoj doktorskoj disertaciji, korišćen je n -heptan. Uzorci tkanina isečeni su na komade pravougaonog oblika (2 cm x 5 cm) i pričvršćeni u držač tenziometra Krüss K12 (Hamburg, Nemačka).

Nakon što je određena konstanta c , metoda kapilarnosti je primenjena na tkaninama upotrebom MQ vode uz merenje priraštaja mase tokom penjanja tečnosti i izračunavanje ugla kvašenja.

Izvršeno je najmanje 10 merenja za svaki uzorak kako bi se dobili statistički značajni rezultati.

7.13.2. Određivanje sadržaja vlage

U ovoj doktorskoj disertaciji, sadržaj vlage određen je gravimetrijskom metodom pomoću uređaja za određivanje vlage marke Sartorius – Infrared Moisture Analyzer MA35 (Goettingen, Nemačka) pri režimu rada koji podrazumeva sušenje uzoraka na 105 °C do konstantne mase.

Izračunavanje sadržaja vlage (w) izvršeno je prema sledećoj formuli:

$$w = \frac{m_p - m_k}{m_p} \cdot 100 (\%) \quad (19)$$

gde je:

m_p masa uzorka pre sušenja (g), i

m_k masa uzorka posle sušenja do konstantne mase (g).

7.14. Određivanje prekidne sile

Prekidna sila viskoznih tkanina određena je prema standardu SRPS EN ISO 13934-1:2008 korišćenjem dinamometra Textest (Schwerzenbach, Švajcarska), sa razmakom između stega 200 mm i brzini istezanja $150 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$. Širina uzoraka bila je $50 \text{ mm} \pm 0,5 \text{ mm}$ (isključujući ivice). Prema standardu SRPS EN ISO 139:2007 pre merenja uzorci su kondicionirani u relaksiranom stanju, i ispitivani u uslovima standardne atmosfere ($T = 20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{RH} = 65\% \pm 4\%$).

7.15. Određivanje antibakterijske aktivnosti

Antibakterijska aktivnost filmova i tkanina je ispitivana prema Gram-negativnoj bakteriji *E.coli* ATCC 25922 (*E.coli*) i Gram-pozitivnoj bakteriji *S.aureus* ATCC 25923 (*S.aureus*) primenom standardne test metode za određivanje antimikrobne aktivnosti imobilisanih antimikrobnih agenasa pod dinamičkim uslovima kontakta prema standardu ASTM E 2149-01 (2001). Pre istraživanja, uzorci su UV sterilizovani. Kao inokulum, korišćena je prekonoćna kultura patogenih sojeva (*S. aureus* i *E.coli*, pojedinačno), gajena u TSB obogaćenom 0,6% kvašćevim ekstraktom u termostatu pri temperaturi od $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Podloga za rast mikroorganizama (TSB) je prethodno sterilisana u autoklavu ($120 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 min, 1,1 bar) a zatim inokulisana prekonoćnom kulturom i inkubirana u termostatu na $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Ispitivani uzorci (0,2 g) su isečeni na male delove, preneti u erlenmajere od po 100 ml u koje je dodato po 9 ml fiziološkog rastvora. Nakon sterilizacije u autoklavu (15 min, $120 \text{ }^\circ\text{C}$, 1,1 bar), u svaki erlenmajer dodato je po 1 ml prethodno pripremljene bakterijske prekonoćne kulture (ispitivani patogeni soj) obezbeđujući početnu koncentraciju od $\sim 10^5$ jedinica bakterijskih kolonija (CFU/ml) po ml. Uzorci su inkubirani 24 h pri temperaturi od $37 \text{ }^\circ\text{C}$ u vodenom kupatilu sa mešanjem. Nakon inkubacije, uzorci se vade iz vodenog kupatila i određuje se broj ćelija standardnom metodom decimalnog razblaženja. Petri šolje se zatim inkubiraju u termostatu pri temperaturi od $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 24 h. Nakon toga, određuje se broj preživelih ćelija.

Procenat bakterijske redukcije ($R, \%$) je izračunat upotrebom sledeće jednačine:

$$R = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100 \quad (20)$$

gde je:

C_0 početni broj ćelija ili kolonija u kontrolnom uzorku, (CFU/ml); za filmove kontrolni uzorak je dvoslojni film RC-TOCN, a za tkanine nemodifikovana viskozna tkanina, C broj ćelija ili kolonija u ispitivanom uzorku (CFU/ml).

7.16. Određivanje antioksidativne aktivnosti (ABTS metoda)

Antioksidativna aktivnost određena je korišćenjem biohemijskog reagensa, ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiseline)). Metoda je zasnovana na redukciji $\text{ABTS}^{+\cdot}$ radikala koji je određen spektrofotometrijski na Cary 60 UV-Vis spektrofotometru Agilent (Santa Clara, Sjedinjene

Američke Države) na talasnoj dužini od 734 nm. Katjonski ABTS^{•+} radikal dobijen je reakcijom između 7 mM ABTS u vodi i 2,45 mM kalijum-persulfata, čuvanih u mraku na sobnoj temperaturi tokom 12 h. Pre upotrebe, rastvor ABTS^{•+} je razblažen fosfatnim puferom (0,1 M, pH 7,4) da bi se postigla apsorbancija od 0,700 ± 0,025 na 734 nm. Zatim je 3,9 ml rastvora ABTS^{•+} preliveno preko 0,1 g ispitivanog uzorka. Nakon 0 min, 15 min, 60 min, 4h, 8 h, 24 h, 48 h i 72 h sposobnost redukcije ABTS^{•+} na 734 nm izražena je kao inhibicija korišćenjem jednačine:

$$Inhibicija = \frac{A_{kontrolna} - A_{uzorka}}{A_{kontrolna}} * 100\% \quad (21)$$

gde je:

$A_{kontrolna}$ apsorbancija izmerena na početnoj koncentraciji ABTS^{•+}, i

A_{uzorka} apsorbancija izmerena na smanjenoj koncentraciji ABTS^{•+} u prisustvu ispitivanog uzorka.

III REZULTATI I DISKUSIJA

8. Dobijanje ultra-tankih filmova na bazi celuloze, TOCN i hitozana

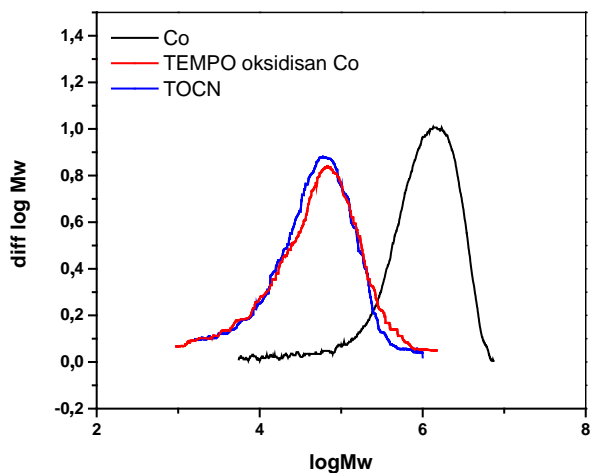
Tanki filmovi debljine ispod 100 nm predstavljaju dobar model za celulozne supstrate sa homogenom morfologijom površine²⁸⁸, pri čemu se QCM-D, koja predstavlja vrstu nanogramski osetljive vage, pokazala veoma pogodnom za proučavanje adsorpcije polimera na tanke filmove. Do sada su se celulozni tanki filmovi uglavnom koristili kao modeli za regenerisanu celulozu (RC), pri čemu se upotreba trimetilsilil celuloze (TMSC) kao polaznog materijala pokazala veoma efikasnom²⁸⁹. Primenom QCM-D proučavane su interakcije RC i hitozana (CS)^{288, 290} kao i hidrofilnost RC^{281, 285, 291}.

U okviru ove doktorske disertacije rađeno je na dobijanju ultra-tankih celuloznih filmova sa poboljšanom adsorpcijom CS, visoke hidrofilnosti i zadovoljavajućih mehaničkih svojstva. Dvoslojni ultra-tanki filmovi dobijeni su regeneracijom TMSC uz njihovo naknadno naslojavanje metodom rotirajućeg diska sa disperzijama TOCN, koje su dobijene fibrilacijom TEMPO oksidisanih pamučnih vlakana. Imajući u vidu da interakcije dvoslojnih RC/TOCN filmova sa vodom i hitozanom do sada nisu proučavane, ovi filmovi su ispitivani *in situ* primenom QCM-D, kako radi boljeg razumevanja interakcija ovih filmova sa hitozanom tako i sa tečnostima s obzirom na potencijalnu primenu ovih filmova kao obloge za rane. Pored kapaciteta sorpcije vode, kao pokazatelja pasivnog upijanja eksudata rane, ispitana su i protein-odbijajuća svojstva novog materijala imajući u vidu probleme sa nekontrolisanom adsorpcijom proteina iz eksudata rane na površinu obloga za rane. Kao model protein u QCM-D ispitivanjima korišćen je goveđi serumski albumin (BSA).

8.1. Strukturne i hemijske karakteristike TEMPO oksidisanih vlakana pamuka i TOCN

8.1.1. Molekulska masa i sadržaj funkcionalnih grupa TEMPO oksidisanih vlakana pamuka i TOCN

U okviru ove doktorske disertacije, polazeći od činjenice da se vodene suspenzije TEMPO oksidisane celuloze sa sadržajem karboksilnih grupa većim od 0,8 mmol·g⁻¹ celuloze mogu konvertovati primenom mehaničkih dezintegracionih tretmana u transparentne i viskozne disperzije nanofibrilisane celuloze, vlakna pamuka su oksidisana u sistemu TEMPO/NaBr/NaClO. Njihovom naknadnom ultrazvučnom dezintegracijom dobijeni su TEMPO oksidisani celulozni nanofibrili (TOCN). Imajući u vidu da TEMPO oksidacija izvođena u sistemu TEMPO/NaBr/NaClO u vodi, na sobnoj temperaturi i pH 10, dovodi do značajne depolimerizacije molekula celuloze⁶⁸, kao i da ultrazvučni tretmani celuloze u heterogenim sistemima dovode do nezatne depolimerizacije²⁹², GPC analiza je korišćena za praćenje promena nastalih usled depolimerizacije celuloze, kako u procesu TEMPO oksidacije, tako i ultrazvučne dezintegracije. Dobijeni rezultati (Slika 27.) su potvrdili značajnu depolimerizaciju celuloze u slučaju TEMPO oksidisanog pamuka, smanjenje molekulske mase sa 1437 kg·mol⁻¹, vrednost za polazni pamuk, na 102 kg·mol⁻¹ za TEMPO oksidisan pamuk, uz povećanje indeksa polidisperznosti. Ultrazvučna dezintegracija TEMPO oksidisanog pamuka dovela je tek do nezatnih promena u molekulskoj masi, sa 102 kg·mol⁻¹ na 82,73 kg·mol⁻¹ (preklapanje krivih raspodele molekulskih masa, Slika 27.), koje je praćeno smanjenjem indeksa polidisperznosti.

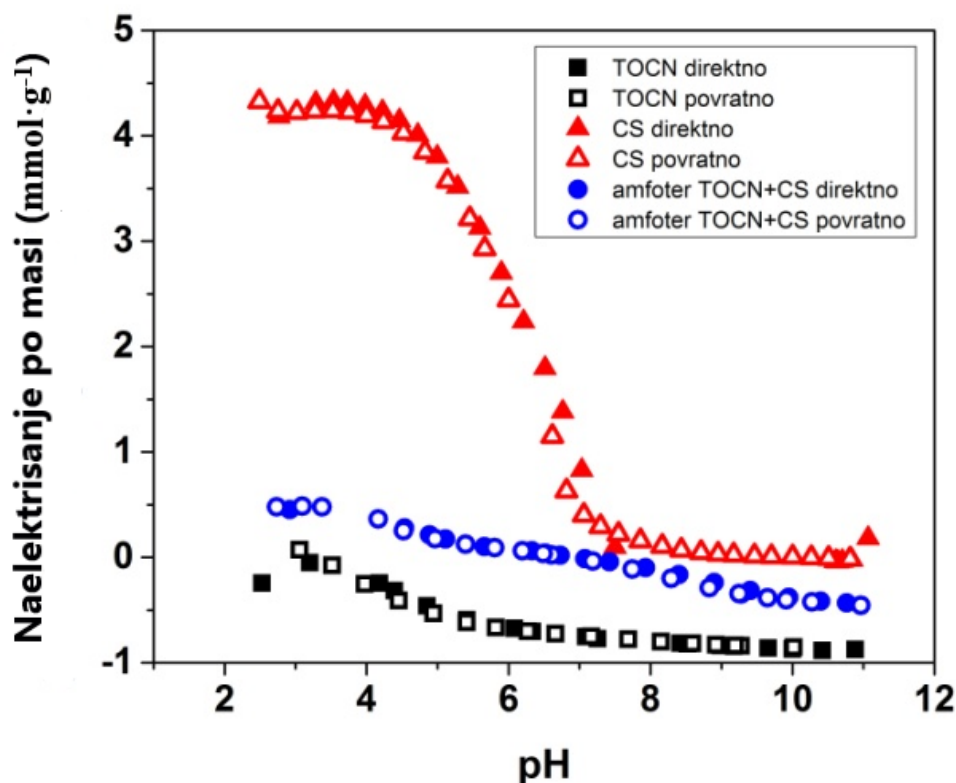


Uzorak	Mw, kg·mol ⁻¹	Mn, kg·mol ⁻¹	Mz, kg·mol ⁻¹	PDI
Pamuk (Co)	1437	338,8	2335	4,243
TEMPO oksidisan Co	102	15,62	348,9	6,532
TOCN	82,73	21	226,3	3,939

Slika 27. Rezultati određivanja molarnih masa polaznih i TEMPO oksidisanih vlakana pamuka i TOCN (Mw - srednja masena molarna masa; Mn - srednja brojna molarna masa; Mz - srednja z-vrednost molarna masa; PDI - indeks polidisperznosti)

Kalcijum-acetatnom metodom utvrđeno je da su značajne količine karboksilnih ($0,83 \text{ mmol g}^{-1}$ celuloze) i aldehidnih grupa ($0,09 \text{ mmol g}^{-1}$ celuloze) formirane u pamučnim vlaknima tokom TEMPO oksidacije. Uvedene karboksilne grupe neophodne su radi lakše fibrilacije i dobijanja nanofibrila iz pamučnih vlakana usled odbojnih sila između jonizovanih karboksilnih grupa, koje prevazilaze intenzitet privlačnih sila intermolekulskih vodoničnih veza¹⁰. Takođe, kao posledica velikog sadržaja karboksilnih grupa u TEMPO oksidisanim vlaknima pamuka, njihovom ultrazvučnom dezintegracijom dobijen je TOCN sa velikim sadržajem funkcionalnih grupa na površini fibrila.

Sadržaj karboksilnih grupa i ponašanje naelektrisanja TOCN u zavisnosti od pH utvrđeno je pH-potenciometrijskom titracijom. Sa Slike 28. može se uočiti povećanje negativnog površinskog naelektrisanja TOCN sa povećanjem pH vrednosti. Sve karboksilne grupe su nenaelektrisane tj. potpuno protonovane ispod pH 2, dok se najviše površinsko naelektrisanje tj. potpuna deprotonizacija karboksilnih grupa postiže pri pH 7. Potenciometrijski određen sadržaj karboksilnih grupa za TOCN iznosi $0,83 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ celuloze i u skladu je sa vrednošću dobijenom za TEMPO oksidisana pamučna vlakna.



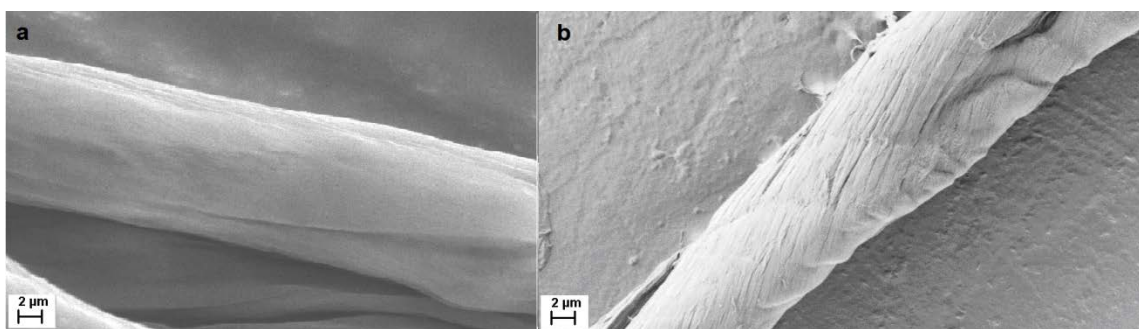
Slika 28. Vrednosti naelektrisanja TOCN disperzije, CS rastvora i TOCN+CS amfoterne smeše u funkciji od pH, publikovano u²⁹³

8.1.2. Morfologija površine TEMPO oksidisanih vlakana pamuka i TOCN

Morfologija površine polaznih i TEMPO oksidisanih pamučnih vlakana okarakterisana je pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije (Slika 29.).

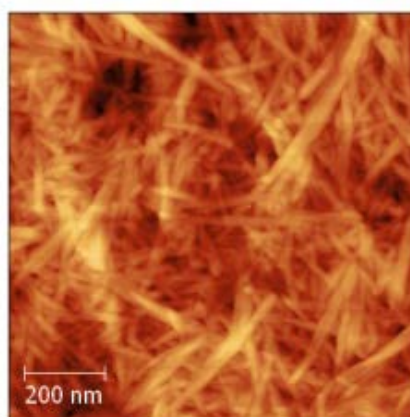
Polazna pamučna vlakna imaju glatku površinu, bez prisustva strukturnih detalja (Slika 29. (a)). Poznato je da su pamučna vlakna heterogena po poprečnom preseku, razlikuju se četiri karakteristična sloja: kutikula, vrlo tanki primarni zid i sekundarni zid koji su koaksijalno raspoređeni oko lumena (unutrašnje šupljine) vlakna. Ovi slojevi se međusobno razlikuju po strukturnoj organizaciji, pristupačnosti za reagense i bubrenju²³. Kutikulu čini veoma tanak spoljašnji sloj koji sadrži kutin i bogat je čvrsto povezanim voskovima i pektinom. Debljina primarnog zida od 0,1-0,2 μm je mala u poređenju sa celokupnom širinom vlakana od 20 μm . Primarni zid sadrži oko 50% celuloze i značajne količine pektina (10%), voskova (8%), proteina (13%) i u manjoj količini veći broj neispitanih supstanci²³. Necelulozne komponente ćelijskog zida (kutikula-primarni zid) su te koje daju površini vlakna gladak izgled (Slika 29. (a)), za razliku od TEMPO oksidisanih pamučnih vlakana na čijoj površini se jasno uočavaju fibrili (Slika 29. (b)). Unutar primarnog zida, tanki sloj, koji je poznat kao prelazni sloj, sastoji se od fibrila koje formiraju mrežu koja povezuje primarni zid sa sekundarnim zidom. Tokom fibrilacije vlakna, prelazni sloj uglavnom se odvaja zajedno sa primarnim zidom. Mreža fibrila primarnog zida i prelaznog sloja dozvoljava samo ograničeno bubrenje unutar sekundarnog zida štiteći na taj način fibrile unutar njega od bočnog razdvajanja tokom bubrenja. Sve dok je primarni zid, zajedno za prelaznim slojem, neoštećen, unutrašnji deo vlakna je manje dostupan bubrenju, a samim

tim i fibrilaciji²⁹⁴. Sekundarni zid čini oko 90% ukupne mase vlakana. Po hemijskom sastavu i strukturi značajno se razlikuje od primarnog zida. Sastoji se od oko 95% celuloze, dok ostatak čine prateće supstance. Idući od periferije ka centru, makromolekuli celuloze u sekundarnom zidu vlakna slažu se gušće i obrazuju bolje orijentisane fibrile u odnosu na osu vlakna. Fibrili u sekundarnom zidu organizovani su u slojevima ili lamelama koje se spiralno uvijaju oko ose vlakna. Sekundarni zid se sastoji iz tri podsloja: spoljašnjeg, centralnog i unutrašnjeg, koji se još naziva se i tercijarni sloj. Fibrili spoljašnjeg sloja orijentisani su pod uglom od 40 ° do 60 ° prema osi vlakna obrazujući S zavojnicu (desna spirala), dok su fibrili centralnog sloja orijentisani pod uglom od 10 ° do 30 ° prema osi vlakna obrazujući Z zavojnicu (leva spirala)²³. Fibrili unutar TEMPO oksidisanih pamučnih vlakana mogu se jasno uočiti na Slici 29. (b). Fibrili formiraju ugao od oko 30 ° prema osi vlakna obrazujući Z zavojnicu što ukazuje da je tokom TEMPO oksidacije došlo do uklanjanja kutikule, primarnog zida i spoljašnjeg sloja sekundarnog zida kao i neceluloznih komponenata, što je neophodno za poboljšano bubrenje, odnosno fibrilaciju pamučnih vlakana, u cilju dobijanja TEMPO oksidisanih celuloznih nanofibrila¹⁰.



Slika 29. SEM fotografija nemođifikovanog (a) i TEMPO oksidisanog (b) pamučnog vlakna

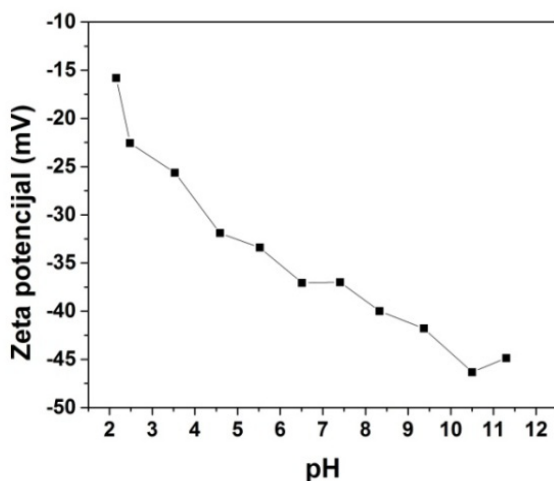
Sa AFM fotografije (Slika 30.) može se uočiti da je zbog svega navedenog postignuta fibrilacija TEMPO oksidisanih pamučnih vlakana odnosno dobijanje TOCN prosečne širine oko 20 nm. Usled nasumičnog rasporeda i međusobnog umrežavanja TOCN, njihovu dužinu nije bilo moguće jasno uočiti.



Slika 30. AFM fotografija TEMPO oksidisanih celuloznih nanofibrila. Veličina slike $1 \times 1 \mu\text{m}^2$.

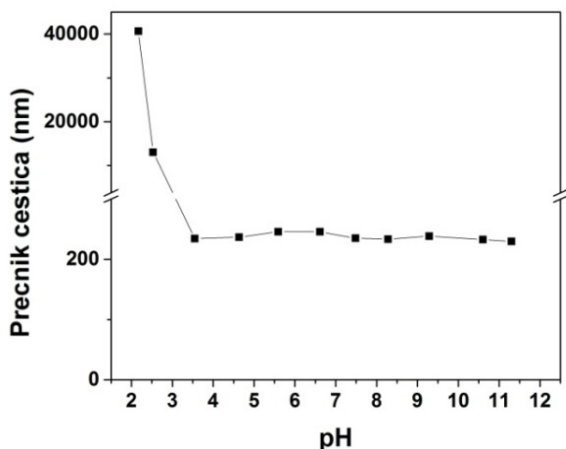
8.1.3. Zeta potencijal, veličina čestica i indeks polidisperznosti TOCN

U čestičnim suspenzijama i tečnost-tečnost emulzijama, zeta potencijal određuje stabilnost disperzija. Po pravilu, zeta potencijal veći od ± 25 mV određuje stabilnu disperziju. Na svim pH vrednostima, vrednosti zeta potencijala za TOCN imaju negativan predznak (Slika 31.) što ukazuje na negativno naelektrisanje površine TOCN u vodenom rastvoru koje potiče od grupa kiselog karaktera. Sa Slike 31. može se uočiti da je iznad pH 3,5 zeta potencijal za TOCN niži od -25 mV odnosno da je njegova disperzija stabilna na pH vrednostima višim od 3,5. Pored toga, na osnovu sniženja vrednosti zeta potencijala sa povećanjem vrednosti pH može se zaključiti da se disocijacija grupa kiselog karaktera TOCN intenzivira sa povećanjem vrednosti pH.

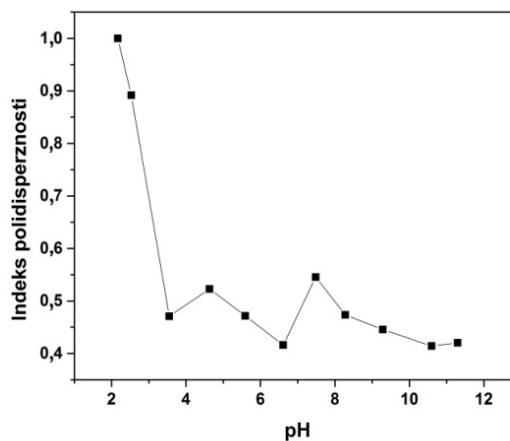


Slika 31. Zeta potencijal TOCN u zavisnosti od pH

U opsegu pH vrednosti od 3,5 do 11,5 izmerena veličina solvatovanih čestica TOCN je oko 230 nm (Slika 32.). Sa Slike 32. može se videti da na pH vrednostima nižim od 3,5 dolazi do nagle agregacije TOCN usled potisnute disocijacije grupa kiselog karaktera odnosno smanjenja površinskog naelektrisanja TOCN koje je neophodno za njihovo međusobno odbijanje. S obzirom da su čestice TOCN fibrilnog oblika, izmerene dimenzije treba uzeti uslovno jer se primenjenom metodom meri prečnik čestica, koji u slučaju TOCN zavisi od njihove orijentacije u disperziji.



Slika 32. Veličina čestica TOCN u zavisnosti od pH



Slika 33. Indeks polidisperznosti TOCN u zavisnosti od pH

Indeks polidisperznosti pruža informacije o raspodeli dimenzija čestica u ispitivanom uzorku. Za uzorak sa indeksom polidisperznosti većim od 0,7 smatra se da ima veoma široku raspodelu dimenzija čestica. Na pH vrednostima višim od 3,5 TOCN ima indeks polidisperznosti između 0,4 i 0,55 odnosno usku raspodelu dimenzija, dok na nižim pH naglo prelazi u područje široke raspodele (Slika 33.) usled agregacije TOCN.

Disperzije TOCN, različitih koncentracija, okarakterisane su sa aspekta mutnoće. Mutnoća je svojstvo fluida koje opisuje prisustvo suspendovanih ili koloidnih čestica. Na mutnoću utiče: koncentracija čestica, odnos indeksa prelamanja svetlosti čestica i okolne sredine, talasna dužina upadnog zračenja, veličina, oblik i raspodela čestica kao i orijentacija čestica ukoliko nisu sfernog oblika. U Tabeli 8. su prikazane vrednosti za mutnoću 0,1%, 0,5%, 1% i 2% disperzija TOCN na osnovu kojih se može uočiti da se sa povećanjem koncentracije TOCN povećava i mutnoća.

Tabela 8. Mutnoća 0,1%, 0,5%, 1% i 2% disperzija TOCN

Mutnoća, NTU			
0,1% TOCN	0,5% TOCN	1% TOCN	2% TOCN
35,4	58,4	107,0	242,0

8.1.4. Sadržaj funkcionalnih grupa i naelektrisanje amfoterne smeše na bazi TOCN i hitozana u zavisnosti od pH

Radi dobijanja 1% amfoterne smeše na bazi TOCN i hitozana urađene su potenciometrijske titracije TOCN i CS (Slika 28.) kako bi se izračunale zapremine 2% (w/v) disperzije TOCN i 0,5% (w/v) rastvora CS u kojima se nalazi isti sadržaj funkcionalnih grupa koje međusobno stupaju u interakcije, što je neophodan uslov za formiranje njihove smeše amfoternog karaktera. Uzimajući u obzir da je građenje polielektrolitnog kompleksa TOCN-CS zasnovano na elektrostatičkom privlačenju dva

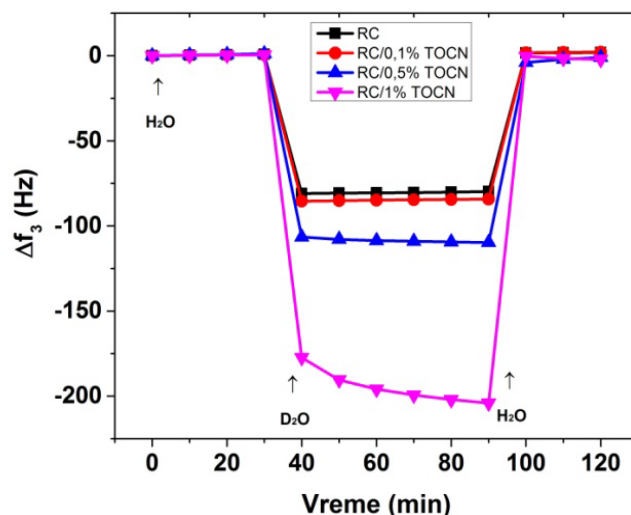
suprotno naelektrisana polielektrolita, odnosno slabe kiseline i slabe baze, pH vrednost reakcionog medijuma bila je od ključnog značaja za njegovo formiranje. Izuzetno niske pH vrednosti reakcionog medijuma imaju za posledicu potpuno protonovanje amino grupa CS (Slika 28.), ali se u protonovanoj formi nalaze i karboksilne grupe TOCN (Slika 28.), pa u takvoj sredini ne postoje uslovi za formiranje kompleksa TOCN-CS. Sa druge strane, pri visokim pH vrednostima karboksilne grupe TOCN nalaze se u -COO^- obliku (Slika 28.), ali se i amino grupe CS (Slika 28.) nalaze u svom osnovnom, deprotonovanom obliku. Opseg pH vrednosti koje su optimalne za formiranje polielektrolitnog kompleksa zavisi od strukture i svojstava TOCN i CS koji stupaju u interakciju, a nalazi se između pKa vrednosti TOCN (3,5) i CS (6,5). Iz tog razloga, u ovoj doktorskoj disertaciji, 1% (w/v) polielektrolitni kompleks TOCN-CS amfoternog karaktera dobijen je na pH 5,5 mešanjem 50 ml 2% (w/v) disperzije TOCN izvornog pH 8, 22 ml 0,5% (w/v) rastvora CS sa pH podešenim na 2,5 i 39 ml MQ vode.

pH-potencimetrijskim titracijama potvrđen je predefinisani sadržaj karboksilnih grupa TOCN ($0,45 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) i amino grupa CS ($0,45 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) koje stupaju u jonske interakcije u 1% amfoternoj smeši na bazi TOCN i CS. Važno je istaći da je prilikom dizajniranja ove smeše pored količine amino grupa CS ($0,45 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) potrebnih za jonske interakcije sa karboksilnim grupama TOCN uzeta u obzir i količina amino grupa CS ($0,09 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) potrebnih za formiranje *Schiff*-ove baze sa istom količinom aldehidnih grupa TOCN ($0,09 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) prisutnih u upotrebljenoj zapremini disperzije. pH-potencimetrijskom titracijom utvrđeno je i ponašanje naelektrisanja ove smeše. Sa Slike 28. jasno se može uočiti da 1% amfoterna smeša na bazi TOCN i CS pokazuje tipičnu amfoternu krivu sa nultim naelektrisanjem pri pH 7.

8.2. Sorpciona svojstva ultra-tankih filmovi na bazi celuloze i TOCN

8.2.1. Kapacitet sorpcije vode ultra-tankih celuloznih filmova

Kapacitet sorpcije vode ultra-tankih celuloznih filmova je veoma značajno svojstvo koje u velikoj meri određuje njihovu buduću primenu i ponašanje u eksploataciji. S obzirom na njihov potencijal i moguću primenu u oblasti sredstava za tretman rana može biti pokazatelj pasivnog upijanja eksudata rane. Ukupni sadržaj vode je određen korišćenjem QCM-D tehnike i metode zamene rastvarača $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$. Slika 34. prikazuje reprezentativne krive Δf_3 u zavisnosti od vremena, za RC i RC/TOCN filmove. Kroz protočnu ćeliju sa filmovima prvo je propuštana H_2O , zatim D_2O , i na kraju H_2O . Generalno, TOCN sloj na površini RC (RC/TOCN) poboljšava kapacitet upijanja vode RC tankih filmova. Δf_3 je generalno veća za RC/TOCN filmove (-203 Hz za RC/1% TOCN film) u odnosu na RC film (-81 Hz). Poredeći mase adsorbovane vode (Tabela 9.), ravnotežni sadržaj vode RC/TOCN tankih filmova je značajno veći (do $7457,1 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$) u odnosu na RC tanki film ($702 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$)²⁹³.



Slika 34. QCM-D promene u frekvenciji pri zameni rastvarača H_2O/D_2O za RC i RC/TOCN filmove, publikovano u²⁹³

Sadržaj vode je takođe izračunat kao procenat suve mase filma (Tabela 9.). Sadržaj vode RC filma (20,0%) je manji u odnosu na RC/TOCN tanke filmove, čije se vrednosti kreću od 25,5% do 85,9%. Pored toga, registrovano je da je sadržaj vode RC/1% TOCN tankog filma veći u odnosu na druge filmove. Naime, povećanjem količine TOCN u RC/TOCN filmovima povećava se i količina OH i COOH grupa na površini filma, što povećava sadržaj vode²⁹³. Rezultati dobijeni za RC/0,5% TOCN i RC/1% TOCN tanke filmove su slični onima za komercijalno dostupne celulozne filmove čiji je sadržaj vode od 40% do 80%. Osim toga, sadržaj vode RC/1% TOCN tankih filmova je uporediv sa sadržajem vode od 74% za nanokristalne celulozne filmove koje su dobili *Kittle* i sar.²⁸¹. Sadržaj vode RC/1% TOCN tankog filma (85,9%) je znatno viši u odnosu na do sada postignute rezultate za slične materijale. S tim u vezi, *Aulin* i sar.¹⁰⁶ dobili su filmove na bazi mikrofibrilisane celuloze sa malom količinom naelektrisanja koji se odlikuju sadržajem vode (24%) koji je više od tri puta manji u odnosu na RC/1% TOCN tanki film dobijen u okviru ove doktorske disertacije.

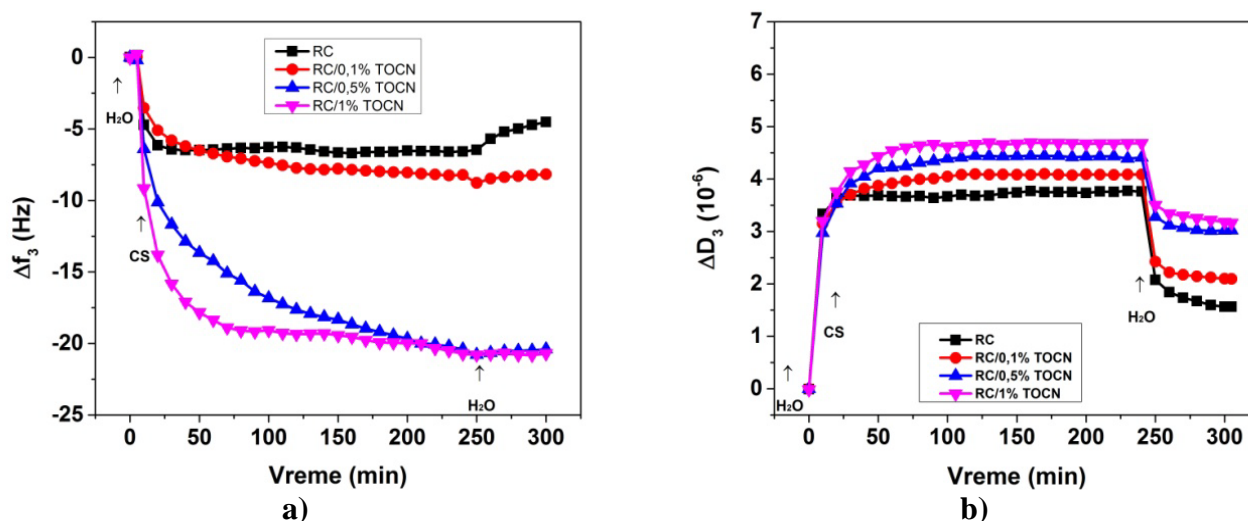
Tabela 9. Ravnotežni sadržaj vode za RC i RC/TOCN filmove, publikovano u²⁹³

Film	Γ_{water} , ng·cm ⁻²	SV, %*
RC	702,0	20,0
RC/0,1% TOCN	928,1	25,5
RC/0,5% TOCN	2205,8	52,7
RC/1% TOCN	7457,1	85,9

*Sadržaj vode (%) je izračunat u odnosu na masu suvog filma

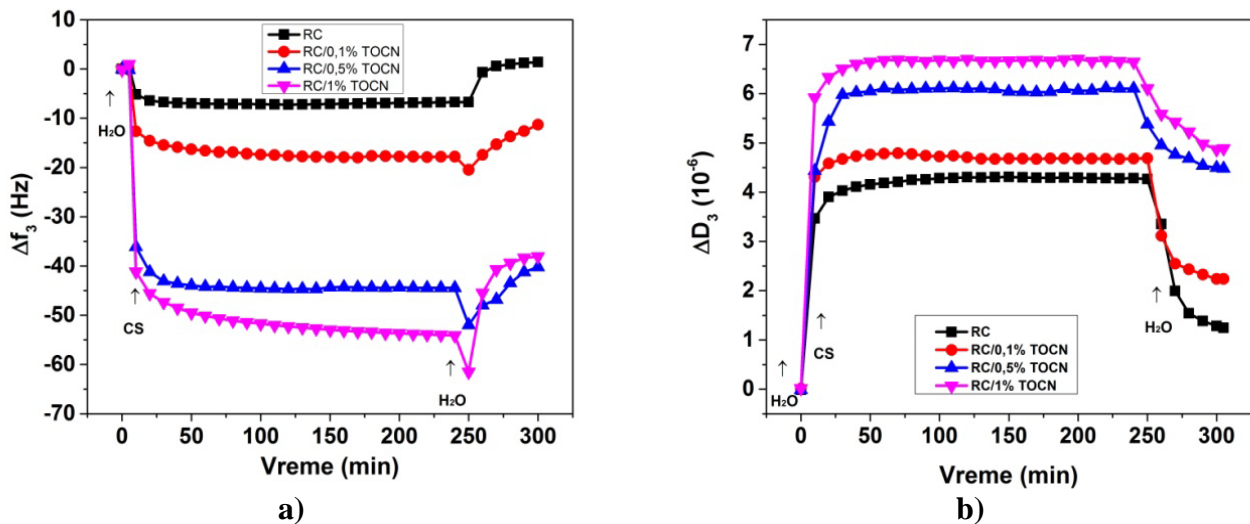
8.2.2. Kapacitet adsorpcije hitozana ultra-tankih celulozних filmova

CS je rastvorljiv ispod pH 6,5⁴, pa je njegova primena u obliku rastvora ograničena na kisele uslove. Za proučavanje i upoređivanje interakcija CS sa površinama RC i RC/TOCN filmova, adsorpcija CS na RC i RC/TOCN tanke filmove je izvedena pri jako i srednje kiselim uslovima, tj. na pH 2 i pH 5,5, respektivno. Ovi uslovi su izabrani zbog činjenice da su na pH 2 lanci hitozana u rastvoru ispruženi usled potpune protonizacije amino grupa (Slika 28.), dok su na pH 5,5 lanci hitozana delimično sklopčani usled nepotpune protonizacije amino grupa. Pored toga, na pH 5,5 je favorizovano formiranje Schiff-ovih baza²⁹⁵ što je veoma važno za postizanje ireverzibilnog vezivanja CS na RC/TOCN filmove. Promene frekvencije, Δf_3 , na pH 2 (Slika 35. (a)), ka nižim vrednostima, ukazuju da povećanje količine TOCN na površini RC dovodi do veće depozicije CS usled intenzifikacije specifičnih i niskoenergetskih interakcija. Osim toga, zanemarljive promene vrednosti Δf_3 tokom ispiranja indikuju potpunu i ireverzibilnu depoziciju CS na površinu RC naslojenu TOCN, što nije slučaj za RC film²⁹³. Pri pH 2, površina RC je praktično nenaelektrisana²⁹⁶, COOH grupe TOCN su potpuno nedisovane i amino grupe CS su potpuno protonovane, Slika 28. Imajući ovo u vidu, elektrostatičke interakcije (jonsko vezivanje) između učesnika reakcije ne bi trebalo očekivati, mada treba istaći da pri ovim uslovima (potpuno protonovane amino grupe) molekuli hitozana zauzimaju ispruženu konformaciju. Takođe, pri ovim uslovima nije moguće ni formiranje Schiff-ove baze jer ukoliko je CS potpuno protonovan nalazi se u ispruženoj konformaciji i postaje nenukleofilan²⁹⁵. Drugim rečima, kovalentno vezivanje između aldehidnih grupa celuloze i amino grupa CS nije moguće pri pH 2. Rezultati prikazani na Slici 35. (a) ukazuju na specifične interakcije između CS i površina filmova, koje su tipa vodoničnih veza, Van der Waals-ovih i hidrofobnih interakcija²⁹³. Kvantifikacija ovih interakcija je teška i uglavnom ne isključuju jedna drugu¹³⁹. Imajući u vidu da je u slučaju ksilogluktana, u odsustvu elektrostatičkog privlačenja, adsorpcioni mehanizam na celulozu objašnjen vodoničnim vezama^{297, 298}, slični adsorpcioni mehanizmi se mogu očekivati između CS i celuloze. Hosokawa i sar.²⁹⁹ su opisali adsorpcione mehanizme CS na linearne β -1,4-glukane kao posledicu strukturnih sličnosti između ovih molekula. Izraženije interakcije u slučaju RC/TOCN filmova i veća količina vezanog hitozana u poređenju sa RC filmom (Tabela 10.) su verovatno posledica većeg bubrenja i time manje kompaktne strukture ovih filmova (Tabela 9).



Slika 35. QCM-D promene u frekvenciji (a) i disipaciji (b) pri adsorpciji CS na RC i RC/TOCN filmove na pH 2, publikovano u²⁹³

Pri pH 5,5, površina RC filma je delimično naelektrisana, oko 28% karboksilnih grupa TOCN je disosovano, a oko 74% amino grupa CS je protonovano (Slika 28.). Pri ovim uslovima, između RC i/ili karboksilnih grupa TOCN i amino grupa CS omogućeno je uspostavljanje elektrostatičkih interakcija (jonsko vezivanje) kao i formiranje *Schiff*-ove baze, s obzirom da se njihova sinteza najbolje odvija u blago kiseloj sredini²⁹⁵. U odnosu na promene frekvencija pri pH 2 (Slika 35. (a)), veće promene frekvencija pri pH 5,5 (Slika 36. (a)) jasno ukazuju na jake jonske interakcije. Konformacija CS je sklupčana pri pH 5,5, zbog delimičnog deprotonovanja amino grupa usled njihove manje rastvorljivosti u vodi, što dodatno povećava sposobnost adsorpcije CS. Za sve ispitivane filmove ispiranje filmova sa vodom dovodi do delimične desorpcije adsorbovanog CS što ukazuje na to da pri ovim uslovima dolazi i do reverzibilnog vezivanja CS na celuloznu površinu. Bez obzira na uklanjanje izvesne količine CS tokom ispiranja filmova, ravnotežni sadržaj CS na površini svih RC/TOCN filmova veći je kod filmova kod kojih je adsorpcija izvedena na pH 5,5 (Tabela 10.). Adsorbovani sloj, takođe, pored molekula CS sadrži i izvesnu količinu inkorporiranih molekula vode.



Slika 36. QCM-D promene u frekvenciji (a) i disipaciji (b) pri adsorpciji CS na RC i RC/TOCN filmove na pH 5,5, publikovano u²⁹³

Promena disipacije, ΔD_3 , je uvek povezana sa adsorbovanim polimerom i inkorporiranom vodom³⁰⁰. Sa smanjenjem krutosti filmova disipacije rastu (Slike 34. (b) i 35. (b)), pri čemu je sličan trend uočen i pri pH 2 i pri pH 5,5. Za obe pH vrednosti, količnik ΔD_3 i Δf_3 raste sa povećanjem količine TOCN deponovane na površinu RC (Slike 34. i 35.). Količnik ΔD_3 i Δf_3 je veći pri pH 5,5 nego pri pH 2, što je verovatno posledica veće količine adsorbovanog CS i inkorporirane vode, kao i sklupčane konformacije CS pri pH 5,5. To znači da će se u praktičnoj primeni suvih RC/TOCN/CS filmova CS sloj brzo hidratirati adsorpcijom eksudata i formirati CS hidrogel na površini rane, što je posebno efikasno u slučaju RC/TOCN/CS filmova dobijenih na pH 5,5²⁹³.

Tabela 10. Količina adsorbovanog CS na površini ispitivanih filmova, publikovano u²⁹³

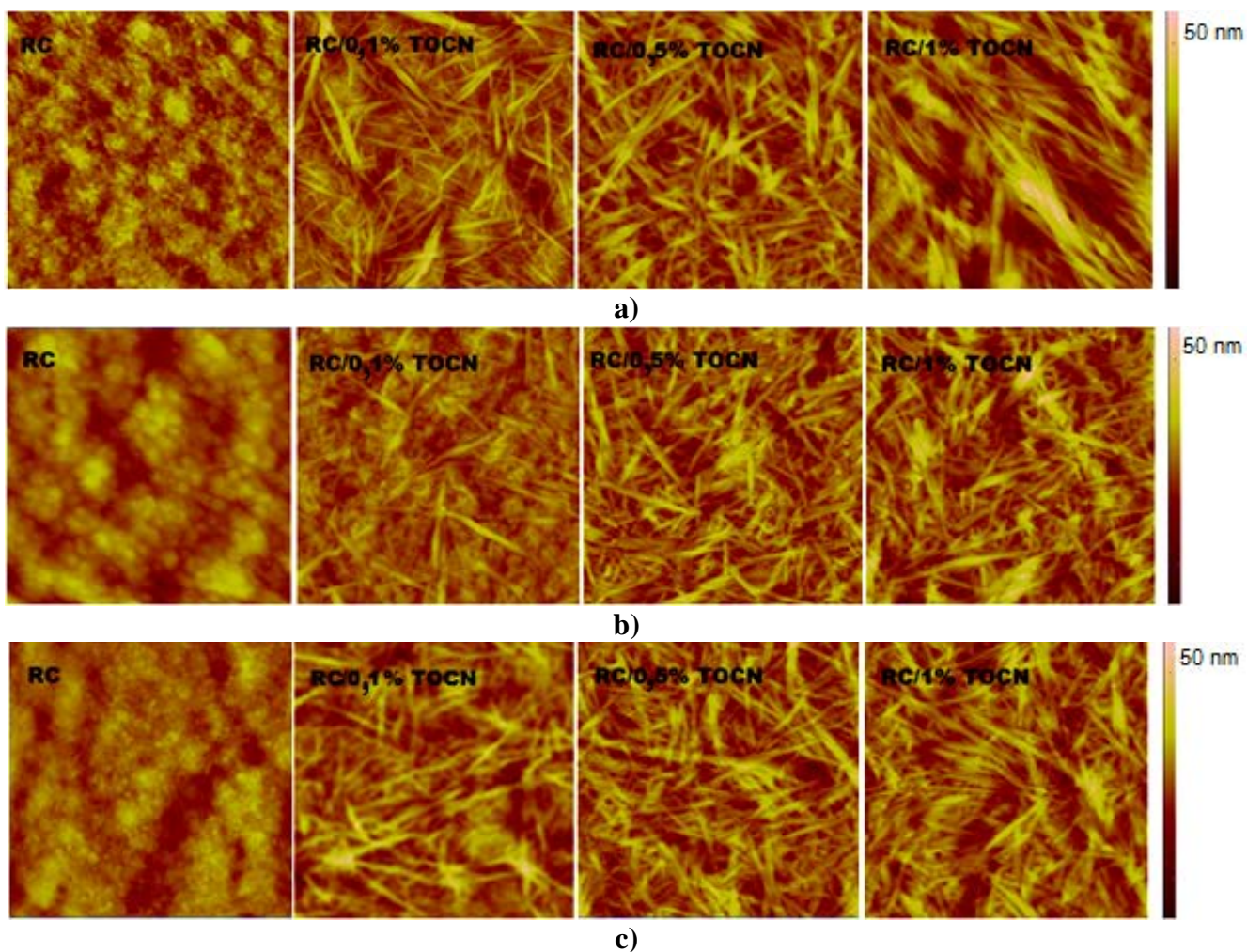
Film	Adsorbovan CS (+ inkorporirani molekuli vode), ng·cm ⁻²	
	pH 2	pH 5,5
RC	0,76	0,12
RC/0,1% TOCN	1,38	1,80
RC/0,5% TOCN	3,45	6,29
RC/1% TOCN	3,52	6,47

8.3. Struktura površine ultra-tankih filmova na bazi celuloze, TOCN, hitozana i amfoterne smeše na bazi TOCN i hitozana

Na Slici 37. je prikazana morfologija površine ispitivanih filmova. Prisustvo TOCN na RC površinama jasno je uočljivo. 0,1% TOCN disperzija samo delimično pokriva površinu RC filma, dok je u slučaju 1% TOCN disperzije pokrivenost potpuna (Slika 37 (a)). Sva AFM merenja potvrđuju stabilnost TOCN slojeva tokom QCM merenja. Hrapavost površine pre i posle adsorpcije CS (Tabela 11.) ukazuje na blagi porast hrapavosti sa povećanjem količine upotrebljenog TOCN. Adsorpcija CS generalno dovodi do smanjenja hrapavosti površine, naročito pri pH 5,5. Odstupanje od ovog trenda je primećeno za RC/1% TOCN film, što se može objasniti većom količinom adsorbovanog CS (Tabela 10.). Pri pH 5,5, manje amino grupa je naelektrisano nego pri pH 2 što dovodi do toga da su lanci CS sklupčani pa se postiže “gušća adsorpcija” i veća hrapavost površine u poređenju sa glatkijom površinom RC/1% TOCN filma²⁹³.

Tabela 11. Površinska hrapavost RC i RC/TOCN filmova pre i posle adsorpcije CS, publikovano u²⁹³

Film	Površinska hrapavost, nm		
	Pre adsorpcije CS	Posle adsorpcije CS na pH 2	Posle adsorpcije CS na pH 5,5
RC	4,82	1,67	2,43
RC/0,1% TOCN	4,85	4,69	2,53
RC/0,5% TOCN	5,19	4,65	5,17
RC/1% TOCN	5,15	5,85	6,27
RC/1% TOCN+CS	7,60	-	-



Slika 37. AFM fotografije RC i RC/TOCN površina pre (a) i posle adsorpcije CS na pH 2 (b) i pH 5,5 (c). Veličina slike je $1 \times 1 \mu\text{m}^2$, publikovano u²⁹³

8.4. Bioaktivnost ultra-tankih filmova na bazi celuloze, TOCN i hitozana

Bioaktivnost dobijenih filmova na bazi RC, TOCN i CS okarakterisana je određivanjem njihovih protein-odbijajućih svojstava *in situ* u kontinualnom toku goveđeg serumskog albumina (BSA) primenom QCM-D i određivanjem njihovih antibakterijskih svojstava *in vitro* prema *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*.

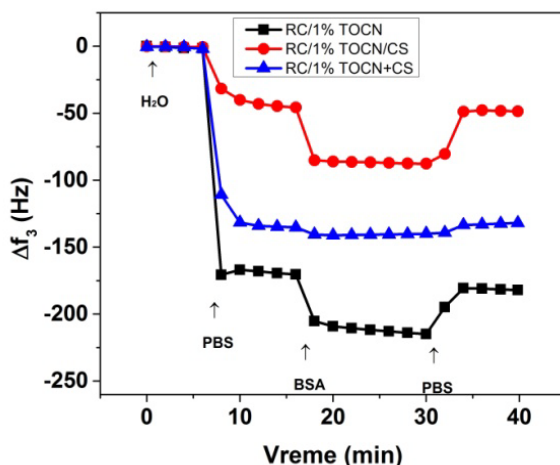
8.4.1. Protein-odbijajuća svojstva

Poznato je da kada proteini dođu u kontakt sa čvrstom površinom, najverovatnije je da će se na nju adsorbovati, tj. vrlo je teško izbeći adsorpciju proteina³⁰¹. Adsorpcija proteina može doprineti povećanoj adheziji čestica, bakterija ili ćelija što podstiče upalne procese tkiva i/ili dovodi do

zaprljanja površine materijala³⁰², tako da je veoma važno da materijal namenjen za terapiju rana poseduje protein-odbijajuća svojstva.

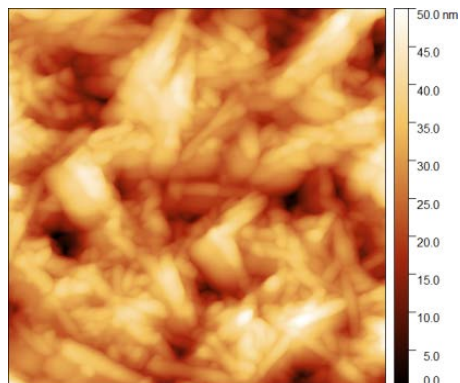
BSA se, kao model protein, često koristi za istraživanje adsorpcije proteina na polimerne površine. Razumevanje i kontrola adsorpcije proteina na površine je veliki izazov. Adsorpcija BSA se može ostvariti preko različitih mehanizama, kao što su hidrofobne interakcije, jonske sile, vodonične veze³⁰³ i specifične interakcije³⁰⁴. U ovoj doktorskoj disertaciji, adsorpcija i desorpcija BSA na površine RC/1% TOCN i RC/1% TOCN/CS filmova je upoređena upotrebom QCM-D tehnike (Slika 38.). S obzirom na činjenicu da adhezija proteina zavisi od naelektrisanja površine³⁰⁵, 1% amfoterna disperzija na bazi TOCN i CS sa niskom gustinom naelektrisanja na pH 7,4 (Slika 28.) je, takođe, upotrebljena za naslojavanje RC površina (metoda III za dobijanje RC/1% TOCN+CS filma) i ispitana adsorpcija BSA na tako dobijene filmove. Slika 38. prikazuje reprezentativne krive Δf_3 u zavisnosti od vremena za ova tri filma izložena kontinualnom toku H₂O, PBS pufera, rastvora BSA i na kraju PBS pufera. Količine adsorbovanog BSA su prikazane u Tabeli 12.

Promena frekvencije od -33 Hz između adsorpcije BSA i ispiranja PBS puferom (Slika 38.) jasno ukazuje na adsorpciju proteina na površini RC/1% TOCN filma. Izoelektrična tačka BSA je oko 4,7–4,9³⁰⁶, tako da je u uslovima viših pH BSA negativno naelektrisan. Na pH 7,4 površinsko naelektrisanje BSA i TOCN je negativno, pa je elektrostatičko odbijanje između njih moguće. Prema tome, može se zaključiti da interakcije između BSA i TOCN mogu biti veoma specifične, u skladu sa anjonskim grupama polisaharida³⁰⁶. U slučaju RC/1% TOCN/CS filma, amino grupe CS su delimično protonovane na pH 7,4 (Slika 28.), pa je elektrostatičko privlačenje između njih i BSA moguće. Slika 38. prikazuje veću promenu frekvencije od -39 Hz za RC/1% TOCN/CS film između adsorpcije BSA i ispiranja PBS puferom u odnosu na -33 Hz za RC/1% TOCN film. Ovo jasno ukazuje da deponovan CS doprinosi pogoršanju protein-odbijajućih svojstava. Imajući u vidu da površinsko naelektrisanje TOCN i CS pri pH 7,4 iznosi -0,8 mmol·g⁻¹ i +0,23 mmol·g⁻¹ (Slika 28.), respektivno, jasno je da se količina adsorbovanog BSA povećala usled smanjenja negativnog naelektrisanja i elektrostatičkog odbijanja. Značajan deo karboksilnih grupa iz TOCN sloja RC/1% TOCN/CS filma je prekriven sa molekulima CS i nedostupan za elektrostatičko odbijanje molekula BSA. Sa druge strane, deponovani molekuli CS su doprineli elektrostatičkom privlačenju negativno naelektrisanih molekula BSA²⁹³.



Slika 38. QCM-D promene u frekvenciji pri adsorpciji BSA na RC/1%TOCN, RC/1%TOCN/CS i RC/1%TOCN+CS filmove, publikovano u²⁹³

S obzirom da je registrovana značajna adsorpcija BSA (Tabela 12.) kako za RC/1% TOCN tako i za RC/1% TOCN/CS film, napravljen je, primenom amfoterne disperzije na bazi TOCN i CS (tj. polianjon/polikatjon kompleksa), i film sa amfoternim karakterom površine i niskim površinskim naelektrisanjem na pH 7,4. AFM fotografija RC površine naslojene ovim kompleksom (Slika 39.) pokazuje površinu u potpunosti pokrivenu sa TOCN+CS kompleksom, uz blago povećanje površinske hrapavosti (7,6 nm), Tabela 11.



Slika 39. AFM fotografija RC površine naslojene sa amfoternom smešom TOCN+CS. Veličina slike je $1 \times 1 \mu\text{m}^2$, publikovano u²⁹³

Veoma intenzivne interakcije uspostavljene između TOCN i CS, rezultirale su izuzetno niskim anjonskim naelektrisanjem od $-0,04 \text{ mmol g}^{-1}$ na pH 7,4 (Slika 28.). Kao što je očekivano, promena frekvencije od 7 Hz za adsorpciju BSA na RC/1% TOCN+CS film je značajno manja u odnosu na druga dva filma (Slika 38.) i potvrđuje slabu adsorpciju BSA na RC/1% TOCN+CS film (Tabela 12.).

Tabela12. Količina adsorbovanog BSA na površini ispitivanih filmova, publikovano u²⁹³

Film	Količina adsorbovanog BSA (+inkorporirani molekuli vode), $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$
RC/1% TOCN	5,63
RC/1% TOCN/CS	6,63
RC/1% TOCN+CS	1,17

Ispiranje sa PBS puferom je podiglo frekvenciju zbog reverzibilne adsorpcije proteina, koja se javlja uglavnom na krajnjem gornjem sloju nabubrelog filma. Rezultati se ne mogu tumačiti na jednostavan način zato što efektivni adsorpcioni mehanizmi još uvek nisu potpuno razjašnjeni³⁰⁵. U svakom slučaju, u poređenju sa tankim celuloznim filmovima modifikovanim sa lizinom koje su dobili *Elschner* i sar.³⁰⁷ ($50\text{-}100 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ BSA je adsorbovano pri neutralnom pH i koncentraciji BSA od $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), u okviru ove doktorske disertacije postignuta je adsorpcija niža za jedan red veličine sa RC/1% TOCN+CS filmom, čak i na mnogo višoj koncentraciji upotrebljenog rastvora BSA ($50 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

8.4.2. Antibakterijska svojstva

Antibakterijska aktivnost filmova na bazi celuloze, TOCN i hitozana ispitivana je prema *E.coli* i *S.aureus* kao Gram-negativnoj i Gram-pozitivnoj bakteriji (Tabela 13.). CS film je ostvario maksimalnu bakterijsku redukciju (99,9%) prema oba bakterijska soja. Kao što je već rečeno, smatra se da je protonovana amino grupa (NH_3^+) kao aktivna funkcionalna grupa od suštinskog značaja za antibakterijsku aktivnost CS jer učestvuje u najdominantnijem mehanizmu njegove antibakterijske aktivnosti zasnovanom na remećenju ćelijske membrane/ćelijskog zida bakterija¹⁶⁷. Dvoslojni RC-(1% TOCN+CS) film nije ostvario redukciju bakterija. Broj bakterijskih kolonija je povećan u njegovom prisustvu, verovatno kao rezultat jakih interakcija između CS i TOCN, tako da preostale dostupne amino grupe CS nisu bile dovoljne za antibakterijsku aktivnost.

Dvoslojni RC-TOCN film sa adsorbovanim CS (RC-TOCN-CS) je ostvario veoma visoku redukciju bakterija 99,8–99,6% prema obe bakterije. U ovom slučaju postignuto je ireverzibilno vezivanje CS na površini celuloze, uz dovoljnu količinu slobodnih amino grupa hitozana za efikasnu redukciju bakterija. Ovo je važno istaći s obzirom da u prethodnim istraživanjima materijali dobijeni na bazi celuloze i CS (viskozna vlakna naslojena sa CS²⁸⁸, film celuloza/CS¹³ kao i bakterijska celuloza impregnirana CS³⁰⁸) nisu ostvarili zadovoljavajuću redukciju prema *E.coli*.

Tabela 13. Antibakterijska aktivnost CS i TOCN/CS naslojenih celuloznih filmova, publikovano u²⁹³
Broj bakterijskih kolonija (CFU) i redukcija (%)

Film	<i>E.coli</i> (CFU/ml)	<i>E.coli</i> (%)	<i>S.aureus</i> (CFU/ml)	<i>S.aureus</i> (%)
kontrolni RC-TOCN	1,18 x 10 ⁶	0	1,12 x 10 ⁶	0
RC-TOCN-CS	2,02 x 10 ³	99,8	4,28 x 10 ³	99,6
RC-(1% TOCN+CS)	1,82 x 10 ⁶	0	1,54 x 10 ⁶	0
CS	<10	99,9	<10	99,9

Iz svega izloženog proizilazi da je naslojavanje TOCN na površinu RC dovelo do poboljšanja hidrofiliteta filma i adsorpcije CS. Ravnotežni sadržaj vode povećava se sa povećanjem količine naslojenog TOCN kao rezultat interakcija između hidrofiličnih karboksilnih grupa na površini RC/TOCN filma. Količina adsorbovanog CS na ultra-tankim RC/TOCN filmovima viša je pri pH 5,5. Pri pH 2 ireverzibilno vezivanje CS posledica je specifičnih i niskoenergetskih interakcija, dok su pri pH 5,5 jonske i kovalentne veze odgovorne za vezivanje CS. Filmovi superiornih protein-odbijajućih svojstava dobijeni su primenom amfoterne smeše na bazi TOCN i CS koja ima skoro nultu ukupno naelektrisanje (-0,04 mmol·g⁻¹ pri pH 7,4), s obzirom da proteini imaju veći adsorpcioni afinitet ka naelektrisanim površinama. Količina adsorbovanog BSA na površini RC/1% TOCN+CS znatno je niža nego na ostalim površinama. Sa druge strane, RC-(1% TOCN+CS) film nije ostvario antibakterijsku aktivnost, verovatno usled interakcija između CS i TOCN, tj. njihovih vodonik donirajućih grupa. Troslojni RC-TOCN-CS film pokazao je najbolju antibakterijsku aktivnost, dok je dvoslojni RC/1% TOCN+CS film pokazao najbolja protein-odbijajuća svojstva. Zahvaljujući protein-odbijajućim i antibakterijskim

svojstvima, dobijeni polisaharidni višeslojni tanki filmovi imaju veoma velik potencijal da budu primenjeni kao obloge za rane.

9. Dobijanje bioaktivnih nanostrukturnih materijala na bazi viskoze i hitozana

U cilju poboljšanja antibakterijskih i antioksidativnih svojstava kao i postojanosti na pranje viskoznih tkanina funkcionalizovanih CS, NCS i NCS+Zn, dva različita pred-tretmana, TEMPO oksidacija i naslojavanje sa TOCN dobijenim fibrilacijom TEMPO oksidisanih pamučnih vlakana, primenjena su radi uvođenja karboksilnih i aldehidnih grupa koje su neophodne za ireverzibilno vezivanje hitozana kako iz rastvora tako i iz disperzja nanočestica. Uticaji ovih pred-tretmana na hemijska, elektrokinetička, morfološka, sorpciona, mehanička, antibakterijska i antioksidativna svojstva pred-tretiranih i CS, NCS i NCS+Zn funkcionalizovanih viskoznih tkanina su ispitani i upoređeni. Tkanine su okarakterisane primenom infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (FTIR), elementalnom analizom, induktivno kuplovanom plazmom sa optičkom emisijom spektrometrijom (ICP-OES), skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM), kao i merenjima sadržaja karboksilnih i aldehidnih grupa, zeta potencijala, kapilarnosti, sadržaja vlage, prekidne sile, antibakterijske i antioksidativne aktivnosti. Postojanost na pranje viskoznih tkanina funkcionalizovanih CS, NCS i NCS+Zn praćena je kroz promene u sadržaju hitozana i cinka, elektrokinetičkim, antibakterijskim i antioksidativnim svojstvima nakon 1, 3 i 5 ciklusa pranja.

9.1. Karakterizacija pred-tretiranih viskoznih tkanina

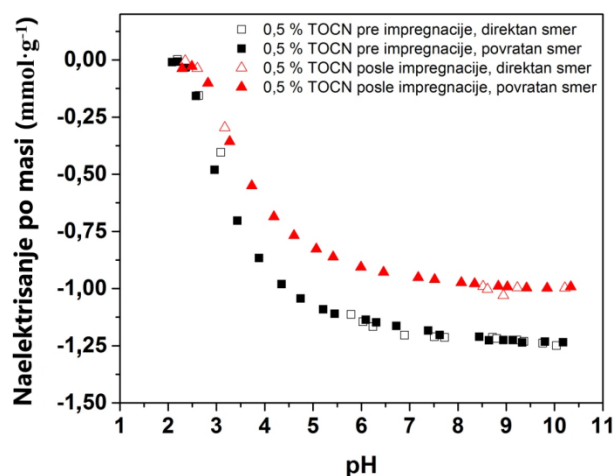
9.1.1. Hemijska i elektrokinetička svojstva pred-tretiranih viskoznih tkanina

Kao što je već rečeno u poglavlju 1.3.2., konverzija primarnih hidroksilnih grupa glukopiranoznih jedinica u karboksilne grupe preko aldehidnih intermedijera tokom TEMPO oksidacije dovodi do povećanja sadržaja funkcionalnih grupa TEMPO oksidisane viskoze kao i TOCN (Tabela 14.). U oba slučaja ukupan sadržaj uvedenih grupa je sličan s tim što je kod TEMPO oksidisane viskoze uvedena približno ista količina aldehidnih ($440 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$) i karboksilnih grupa ($438 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$) dok u slučaju TOCN dominiraju karboksilne grupe ($830 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$) u odnosu na aldehidne grupe ($90 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$). Naslojavanje nemodifikovane viskozne tkanine sa TOCN, na čijoj površini je prisutan visok sadržaj funkcionalnih grupa, omogućava uvođenje karboksilnih i aldehidnih grupa na površinu materijala i doprinosi blagom povećanju sadržaja obe funkcionalne grupe u viskoznoj tkanini. U poređenju sa nemodifikovanom, povećanje funkcionalnih grupa (karboksilnih + aldehidnih) od 10,7 puta je postignuto za TEMPO oksidisanu tkaninu, a 1,4 puta za TOCN naslojenu viskoznu tkaninu. Takođe, može se uočiti da je u slučaju TEMPO oksidisane viskozne tkanine uvedena približno ista količina karboksilnih i aldehidnih grupa, dok u slučaju TOCN naslojene viskozne tkanine dominiraju karboksilne grupe ($86 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$) u odnosu na aldehidne grupe ($27 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Tabela 14. Sadržaj funkcionalnih grupa TEMPO oksidisanih celuloznih nanofibrila (TOCN), nemođifikovane i predtretiranih viskozniñ tkanina, publikovano u ⁶²

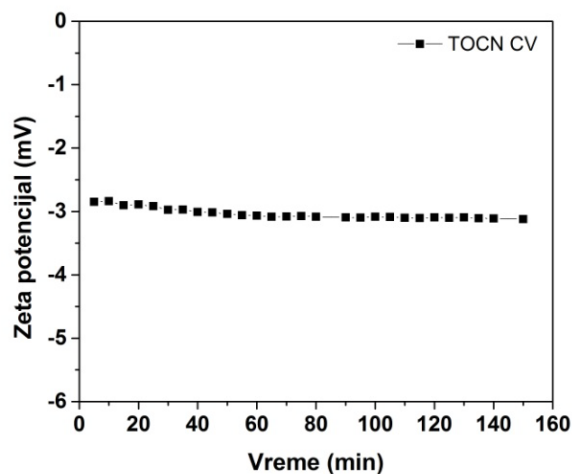
Uzorak	COOH, mmol·kg ⁻¹	CHO, mmol·kg ⁻¹	COOH+CHO, mmol·kg ⁻¹
CV	64	18	82
TEMPO CV	438	440	878
TOCN	830	90	920
TOCN CV	86	27	113

Ovo, relativno malo povećanje sadržaja funkcionalniñ grupa za TOCN naslojenu viskoznu tkaninu, može se objasniti količinom adsorbovanog TOCN. Procenat adsorbovanog TOCN na viskoznu tkaninu izračunat je pomoću potenciometrijskih titracija (Slika 40.), tj. na osnovu sadržaja karboksilniñ grupa 0,5 % disperzije TOCN pre (1,20 mmol·g⁻¹) i posle (0,96 mmol·g⁻¹) impregnacije. Razlika u sadržaju karboksilniñ grupa u disperziji TOCN pre i posle impregnacije od 20,0% ujedno predstavlja i količinu TOCN koja se iz 0,5% disperzije TOCN adsorbovala na viskoznu tkaninu. Drugim rečima, tokom procedure impregnacije dolazi do adsorpcije 0,05 g TOCN na 1 g viskozne tkanine, što znači da ovako pred-tretirana viskozna tkanina sadži 4,76% TOCN.



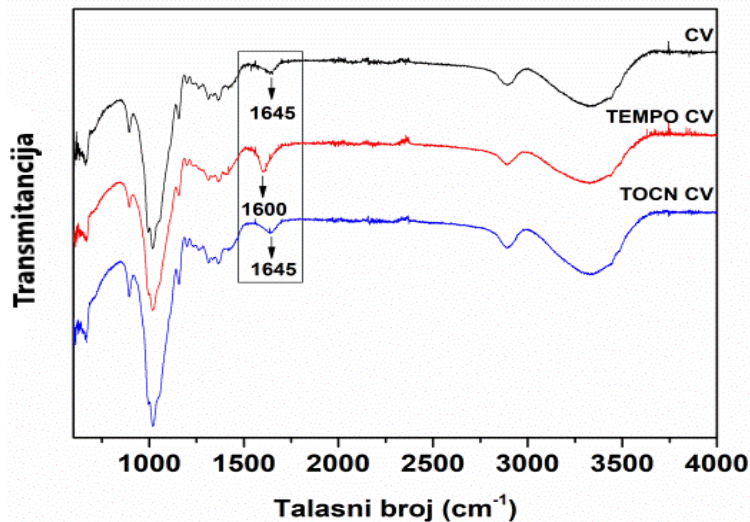
Slika 40. Vrednosti naelektrisanja 0,5 % disperzije TOCN, pre i posle impregnacije viskozne tkanine, u funkciji od pH

Stabilnost adsorbovanog TOCN na viskoznoj tkanini ispitana je praćenjem promena zeta potencijala sa vremenom izloženosti TOCN naslojene viskozne tkanine vodenom rastvoru (Slika 41.). Ispitivanje stabilnosti TOCN na viskoznoj tkanini vršeno je na pH 5,5, s obzirom da su na tom pH vršene funkcionalizacije svih viskozniñ tkanina imajući u vidu istraživanja sprovedena na modelu ultra-tankog filma u kojima je utvrđeno da je blago kisela pH vrednost najpogodnija s aspekta poboljšane adsorpcije i ireverzibilnog vezivanja hitozana na površine na bazi regenerisane celuloze i TOCN (8.2.2.). Dobijeni rezultati pokazuju da tokom 150 min izloženosti TOCN CV vodenom rastvoru na pH 5,5 nije došlo do promena zeta potencijala koje bi mogle indikovati otpuštanje TOCN. Drugim rečima, dobijeni rezultati ukazuju da je tokom impregnacije viskoze sa TOCN ostvarena izuzetno jaka veza između viskoze i TOCN, zasnovana na sistemu vodoničnih i Van der Waals-ovih veza.



Slika 41. Promene zeta potencijala TOCN naslojene viskozne tkanine tokom vremena

ATR-FTIR tehnika upotrebljena je kao pouzdana metoda za karakterizaciju površine viskoznih tkanina pre i posle različitih pred-tretmana. U FTIR spektrima nemodifikovane i različito pred-tretiranih viskoznih tkanina (Slika 42.), mogu se uočiti karakteristični pikovi za celulozu: pik na $892\text{--}896\text{ cm}^{-1}$ (C–O–C valencione vibracije β -glikozidne veze ili deformacije na C1 u celulozi II), pik na 996 cm^{-1} (C–O valencione vibracije na C6), pikovi na 1024 i 1067 cm^{-1} (C–O skeletne valencione vibracije), pik na 1158 cm^{-1} (C–O–C asimetrične valencione vibracije β -glikozidne veze u celulozi II), pikovi na 1200 i 1336 cm^{-1} (OH deformacione vibracije), pikovi na $1225\text{--}1235\text{ cm}^{-1}$ (OH deformacione vibracije na C6), pik na 1316 cm^{-1} (CH_2 deformacione vibracije klanjanja), pik na 1372 cm^{-1} (C–H deformacione vibracije u celulozi II), pik na 1418 cm^{-1} (CH_2 deformacione vibracije seckanja na C6 u celulozi II), široki pik na 1636 cm^{-1} (adsorbovana voda), pik na 2893 cm^{-1} (C–H valencione vibracije u celulozi II i CH_2 , CH_2OH u celulozi na C6, i široki pik između $3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ (vodonično vezane OH grupe)^{309, 310}. Nakon TEMPO oksidacije pojavljivanje novih pikova u spektru TEMPO CV na 1600 cm^{-1} , povezano sa C=O valencionim vibracijama, potvrđuje da su hidroksilne grupe na C6 položaju molekula celuloze konvertovane u natrijum-karboksilatne^{311, 312}. Odsustvo pika na 1600 cm^{-1} u spektru TOCN CV može biti objašnjeno niskim sadržajem karboksilnih grupa u ovom uzorku (Tabela 14.), ali i činjenicom da se ovaj pik nalazi u delu spektra gde široki pik adsorbovane vode može maskirati njegov signal. Pored toga, detektovanje aldehidnih grupa je veoma teško jer su ove grupe delimično ili čak potpuno hidratizane, a dobijene hemiacetalne ili hemialdolne strukture ne pokazuju klasičnu adsorpciju karbonilne grupe u FTIR spektru³¹². U ovim uslovima, aldehidne grupe koje potiču od TEMPO oksidacije se vrlo teško mogu detektovati pomoću FTIR analize. Međutim, u slučaju TEMPO CV i TOCN CV može biti uočeno blago smanjenje intenziteta pikova na 996 , $1225\text{--}1235$ i 1418 cm^{-1} , koji odgovaraju C–O valencionim vibracijama na C6, OH deformacionim vibracijama na C6, CH_2 deformacionim vibracijama seckanja na C6 u celulozi II, respektivno. Pored pikova karakterističnih za celulozu, kod CV i TOCN CV je uočen širok pik na 1645 cm^{-1} koji ukazuje na nepoželjnu absorbanciju neuklonjene vode vezane za celulozu⁶².

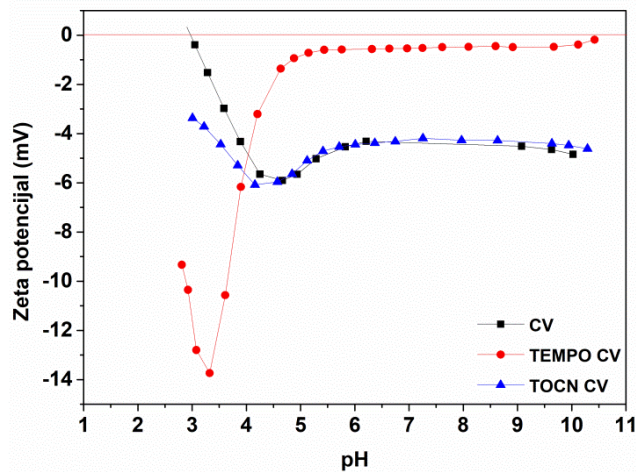


Slika 42. FTIR spektri nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina

Uspešnost funkcionalizacije tekstilnih materijala zavisi, u velikoj meri, od hemije površine polaznog materijala, koja određuje da li je neki tekstilni materijal pogodan za određeni postupak funkcionalizacije. Takođe, ako se poznaje hemija površine supstrata, u cilju uspešne funkcionalizacije, moguće je i prilagođavanje samog postupka funkcionalizacije svojstvima tekstilnih materijala. S tim u vezi, površinsko naelektrisanje je ključan parametar za pospešivanje ili sprečavanje interakcije između vodenih rastvora različitih jedinjenja i površine čvrstog materijala. Zeta potencijal (ζ), primarno korišćen kao indikator naelektrisanja čvrste površine, je koristan parametar za poređenje površina materijala pre i nakon površinskih modifikacija/funkcionalizacija, kao i ponašanja njihovog naelektrisanja u vodenom rastvoru³¹³.

Na Slici 43. su prikazane krive zavisnosti zeta potencijala od pH za nemodifikovanu i pred-tretirane viskozne tkanine. Nemodifikovana i obe pred-tretirane tkanine pokazuju negativan zeta potencijal u čitavom području pH zbog prisustva karboksilnih i hidroksilnih grupa u celuloznom polimeru. Pomeranje izoelektrične tačke (IET) sa 2,94 za nemodifikovanu na 1,74 za TEMPO oksidisanu i na 1,81 za TOCN naslojenu viskoznu tkaninu je posledica povećanog sadržaja kiselih (karboksilnih) grupa na površini tkanine. Iako je ukupni sadržaj karboksilnih grupa značajno viši za TEMPO oksidisanu nego za TOCN naslojenu viskozu (Tabela 14.), njena IET je samo neznatno niža što ukazuje da su u TEMPO oksidisanjoj viskozi uvedene funkcionalne grupe uniformno raspoređene u/na vlaknima/tkanini, dok su u slučaju TOCN naslojene viskoze te funkcionalne grupe raspoređene samo na njenoj površini. Pored toga, imajući u vidu činjenicu da bi vrednost platoa na baznom pH morala biti negativnija u slučaju veće gustine karboksilnih grupa na površini tkanine, dobijena manje negativna vrednost platoa zeta potencijala za TEMPO oksidisanu viskoznu tkaninu (koja ima veći sadržaj karboksilnih grupa od nemodifikovane i TOCN naslojene viskoze) može se objasniti činjenicom da naelektrisane grupe na površini vlakna (tj. deprotonovane karboksilne grupe) mogu sprečiti disocijaciju susednih (karboksilnih) grupa elektrostatičkim odbijanjem, kao i povećanom hidrofилношću i bubrenjem. Sa povećanjem bubrenja, odnos između maksimalno negativnog zeta potencijala (pri blago kiselom pH) i vrednosti platoa (pri visokom pH), $\zeta_{max}/\zeta_{plateau}$, se povećava²⁷⁹. Za razliku od nemodifikovane i TOCN naslojene viskoze, smanjenje negativnosti zeta potencijala pri visokom pH i povećanje $\zeta_{max}/\zeta_{plateau}$ odnosa za TEMPO oksidisanu viskozu ukazuje na povećanje hidrofилnosti i bubrenja usled promena u hemijskom sastavu i strukturi prouzrokovanim TEMPO oksidacijom. Takve

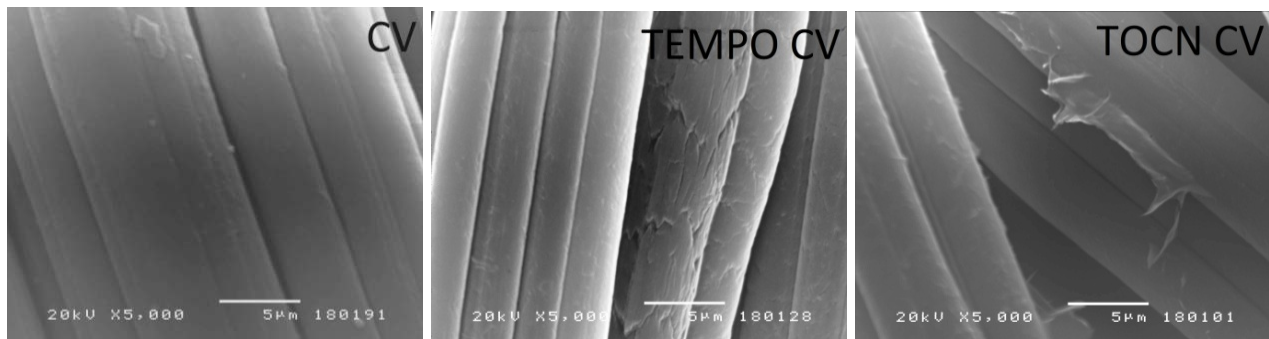
promene dovode do povećane pristupačnosti unutrašnje površine vlakana, kao i do povećanja ukupne površine vlakana, posebno u nabubrelom stanju, povećavajući kapacitet za vezivanje različitih jona, bioaktivnih molekula ili čestica^{7, 63}.



Slika 43. Zeta potencijal nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina, publikovano u⁶²

9.1.2. Morfološke karakteristike pred-tretiranih viskoznih tkanina

Morfologija površine nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih vlakana/tkanina je ispitana skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM). SEM fotografije nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina prikazane su na Slici 44. Za razliku od nemodifikovane (uzorak CV), TEMPO oksidisana viskozna vlakna (uzorak TEMPO CV) imaju otvoreniju površinu zbog oštećenja koja se na površini vlakana manifestuju kao pukotine veće ili manje dubine. Uočena oštećenja na površini vlakna koja su posledica procesa oksidacije⁶³, doprineće efikasnijoj imobilizaciji molekula CS s obzirom na razvijenu površinu i veću dostupnost aktivnih mesta za njegovo vezivanje. U slučaju TOCN naslojene viskoze (uzorak TOCN CV), TOCN formira tanak polimerni film koji obavija vlakna, kao što je to već diskutovano u poglavlju 8. Takođe, jasno se uočavaju i delovi polimernog filma koji su se odvojili od površine vlakana.



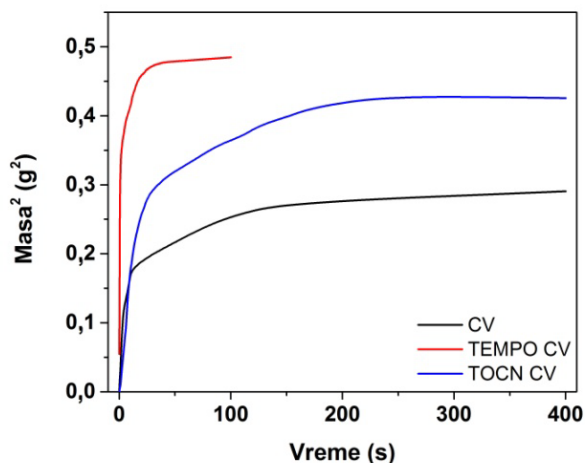
Slika 44. SEM fotografije nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina, publikovano u⁶²

9.1.3. Sorpciona i mehanička svojstva pred-tretiranih viskoznih tkanina

Sorpciona i mehanička svojstva pred-tretiranih viskoznih tkanina su veoma važna, jer od sorpcionih svojstava zavisi kako će se tkanine dalje ponašati u procesima funkcionalizacije sa CS, NCS i NCS+Zn, s obzirom da se navedene funkcionalizacije izvode iz rastvora/disperzija, kao i u kasnijoj eksploataciji, dok mehanička svojstva određuju potencijalnu primenu ovih materijala.

Sorpciona svojstva nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina okarakterisana su merenjima kapilarnosti, ugla kvašenja i sadržaja vlage. Iako su sorpciona svojstva viskoze mnogo bolja u poređenju sa sličnim materijalima (npr. hemijskim celuloznim vlaknima kao što su modal i liocel), ipak nisu dovoljna u slučajevima kada je neophodna izuzetno visoka sorpciona moć³¹⁴. Poznato je da se uvođenjem hidrofilnih funkcionalnih grupa u celulozne materijale, samim tim i one na bazi viskoze, značajno može uticati na poboljšanje njihovih sorpcionih svojstava^{314, 315, 316, 317, 318}. Konkretno u ovom radu, TEMPO oksidacija i naslojavanje TOCN dovelo je do promena u fizičko-hemijskim, o čemu je ranije diskutovano, i posledično u sorpcionim svojstvima pred-tretiranih viskoznih tkanina.

Kapilarna svojstva tekstilnih materijala mogu imati veliki uticaj na njihovu primenu, kako prilikom obrade tako i prilikom upotrebe. Dobra kapilarna svojstva tekstilnih materijala pružaju im dobar apsorpcioni kapacitet i/ili brzinu apsorpcije, što je potrebno pri apsorpciji vlage, tečnosti, kao i sredstava za funkcionalizaciju³¹⁹. Kapilarnost obuhvata nekoliko fenomena koji se istovremeno odvijaju prilikom penjanja tečnosti uz vertikalno postavljen tekstilni materijal. Kapilarnost je uslovljena hemijskom strukturom tekstilnog materijala, sistemom kapilara u tekstilnom materijalu i poroznošću samih vlakana²⁵. Krive kvašenja, dobijene merenjima kapilarnosti, za nemodifikovanu i pred-tretirane viskozne tkanine predstavljene su kao brzina apsorpcije na Slici 45., na kojoj se jasno uočava da je brzina apsorpcije drastično veća za TEMPO oksidisanu i TOCN naslojenu viskoznu tkaninu u odnosu na nemodifikovanu.



Slika 45. Krive kvašenja za nemodifikovanu i pred-tretirane viskozne tkanine

Sa dobijenih krivih kvašenja određen je i kapacitet sorpcije, koji predstavlja količinu upijene tečnosti u stanju ravnoteže. Kapacitet sorpcije za nemodifikovanu i pred-tretirane viskozne tkanine prikazan je u Tabeli 15. Nemodifikovana viskozna tkanina uspostavila je ravnotežno stanje nakon 144 s pri čemu je sorbovala 0,52 g tečnosti/g tkanine. Za obe pred-tretirane viskozne tkanine količina sorbovane tečnosti

bila je veća. Ravnotežno stanje za TEMPO oksidisanu viskoznu tkaninu uspostavljeno je brže, dok je za TOCN naslojenu tkaninu sporije. TEMPO oksidisana viskozna tkanina uspostavila je ravnotežno stanje nakon 25 s uz sorpciju 0,65 g tečnosti/g tkanine, dok je TOCN naslojena viskozna tkanina uspostavila ravnotežno stanje nakon 190 s uz sorpciju 0,64 g tečnosti/g tkanine.

Tabela 15. Količina sorbovane tečnosti, ugao kvašenja, sadržaj vlage u ravnotežnom stanju i prekidna sila nemodifikovane i pred-tretirane viskoznih tkanina

Uzorak	Količina sorbovane tečnosti, g tečnosti/g tkanine	Ugao kvašenja, °	Sadržaj vlage, %	Prekidna sila, N	
				osnova	potka
CV	0,52±0,04	81±4,72	8,29±0,23	225±1,52	191±3,06
TEMPO CV	0,65±0,12	40±9,34	10,65±0,48	200±5,13	155±2,89
TOCN CV	0,64±0,05	82±1,11	9,13±0,55	257±3,51	215±2,52

U Tabeli 15. prikazane su i vrednosti ugla kvašenja za nemodifikovanu i pred-tretirane viskozne tkanine, s obzirom da je on indikator hidrofilitnosti površine. Ugao kvašenja nemodifikovane viskozne tkanine je 81 °, TEMPO oksidisane 40 °, a TOCN naslojene 82 °. Smanjenje ugla kvašenja viskozne tkanine nakon TEMPO oksidacije ukazuje na povećanje hidrofilitnosti njene površine usled uvođenja funkcionalnih grupa. Ugao kvašenja viskozne tkanine nakon naslojavanja sa TOCN veći je u odnosu na ugao kvašenja nemodifikovane viskozne tkanine i ukazuje na smanjenje hidrofilitnosti njene površine. Dobijeni rezultat nije u skladu sa merenjima zeta potencijala (Slika 43.) kojima je pokazano da površina viskozne tkanine nakon naslojavanja TOCN ima veću gustinu ukupnog negativnog naelektrisanja usled uvođenja funkcionalnih grupa kiselog karaktera. Do povećanja ugla kvašenja viskozne tkanine nakon naslojavanja TOCN došlo je verovatno zbog toga što su se između funkcionalnih grupa TOCN uspostavile izuzetno jake interakcije koje nisu mogle da se raskinu za vreme izvođenja merenja i omogućće učestvovanje funkcionalnih grupa TOCN u interakcijama sa molekulima vode.

Pored kapilarnosti i ugla kvašenja, ispitana je i vlažnost odnosno sadržaj vlage nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina. Na osnovu eksperimentalno dobijenih rezultata (Tabela 15.) utvrđeno je da su vrednosti sadržaja vlage TEMPO oksidisane (10,65 %), kao i TOCN naslojene (9,13 %) viskozne tkanine veće u odnosu na nemodifikovanu viskoznu tkaninu (8,29 %) što se može objasniti uvođenjem hidrofilitnih funkcionalnih grupa u strukturu viskoze tokom pred-tretmana.

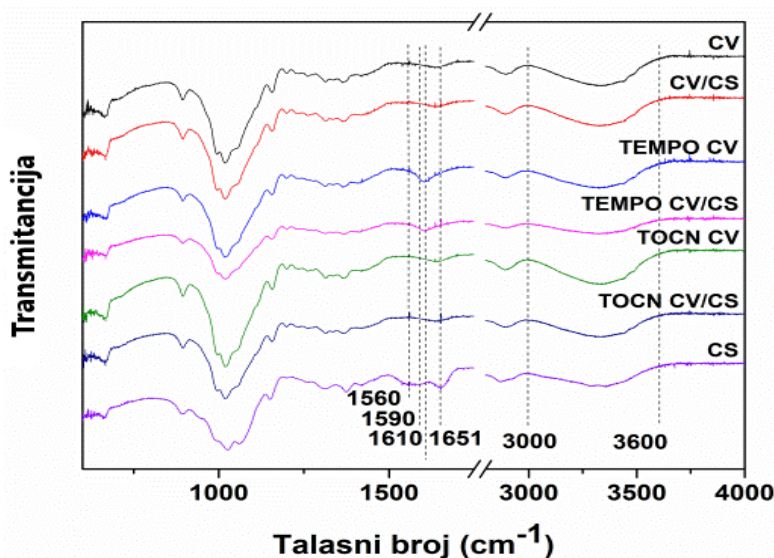
U Tabeli 15. takođe je prikazan uticaj primenjenih pred-tretmana na prekidnu silu viskozne tkanine. U slučaju TEMPO oksidacije, uz promene na molekulskom nivou u vidu različitih tipova i količine funkcionalnih grupa, kompleksna struktura celuloznih vlakana je promenjena, uz već diskutovana oštećenja viskoznih vlakana, što je dovelo do smanjenja prekidne sile za 11% u pravcu osnove i za 19% u pravcu potke. Sa druge strane, naslojavanje TOCN nije dovelo do promena u nadmolekulskoj strukturi celuloze; efekat ojačanja TOCN na površini vlakana jasno je uočljiv, tj. prekidna sila TOCN CV uzorka povećana je za 14% u pravcu osnove i za 13% u pravcu potke.

9.2. Dobijanje viskoznih tkanina funkcionalizovanih hitozanom

U većini slučajeva potrebno je da tekstilni materijali koji se primenjuju u prevenciji i terapiji rana budu na bazi prirodnih polimera i da se odlikuju postojanom bioaktivnošću i dobrim mehaničkim svojstvima³²⁰. Antibakterijska i antioksidativna svojstva neka su od najvažnijih bioaktivnih karakteristika ovih materijala; s obzirom da bakterijske infekcije mogu da odlože ili produže zarastanje rana²²⁸, a da slobodni radikali izazivaju oksidativni stres u ljudskom telu i ubrzavaju napredak mnogih hroničnih bolesti²²⁶. S povećanjem svesti o infekivnim bolestima i rezistenciji na antibiotike, mnoge studije posvećene su funkcionalizaciji tekstilnih materijala radi postizanja njihovog antibakterijskog dejstva upotrebom prirodnih reagensa koji uključuju alternativne i do sada manje korišćene polisaharide i njihove derivate kao što je hitozan^{2, 321}. U cilju dobijanja viskoznih tkanina sa antibakterijskim i antioksidativnim svojstvima postojanim na pranje, viskozne tkanine pred-tretirane na dva različita načina (TEMPO oksidacijom i naslojavanjem TOCN), što je detaljno objašnjeno u prehodnom poglavlju, funkcionalizovane su sa: CS, NCS i NCS+Zn.

9.2.1. Hemijska i elektrokinetička svojstva viskoznih tkanina funkcionalizovanih hitozanom

Promene u hemiji površine viskoznih tkanina funkcionalizovanih hitozanom okarakterisane su FTIR spektroskopijom. FTIR spektri čistog CS i različito pred-tretiranih viskoznih tkanina, pre i posle funkcionalizacije sa CS, prikazani su na Slici 46.



Slika 46. FTIR spektri viskoznih tkanina pre i posle funkcionalizacije sa hitozanom, publikovano u⁶²

Na FTIR spektru CS jasno se mogu uočiti svi pikovi karakteristični za CS: pikovi na 894 i 1153 cm⁻¹ koji odgovaraju strukturi polisaharida, sličnoj kao kod celuloze; pikovi na 1025 i 1062 cm⁻¹ odnose se na C-O valencione vibracije; pik na 1315 cm⁻¹ karakterističan za amide III; pikovi na 1373 i 1420 cm⁻¹ povezani sa C-Hx deformacionim vibracijama; pik na 1560 cm⁻¹ povezan sa valencionim vibracijama amino grupe hitozana; pik na 1590 cm⁻¹ koji se odnosi na N-H deformacione vibracije amida II; pik na

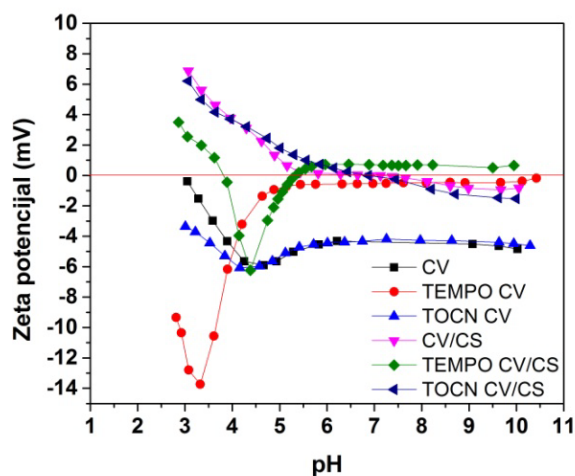
1651 cm^{-1} karakterističan za amide I i koji se preklapa sa pikom za adsorbovanu vodu; pikovi na 2870 i 2921 cm^{-1} za C-H asimetrične i simetrične valencione vibracije, respektivno; i široki pik od 3000 do 3600 cm^{-1} povezan sa O-H valencionim vibracijama, preklopljen sa pikom NH_2 valencionih vibracija u istom regionu^{322, 323}. FTIR spektri viskoze/celuloze i CS su prilično slični zbog strukturnih sličnosti ova dva polimera. Spektri različito pred-tretiranih viskoznih tkanina funkcionalizovanih sa hitozanom pokazuju pikove karakteristične za oba polimera sa malim modifikacijama. Osnovni pikovi CS na 1560, 1590 i 1651 cm^{-1} koji odgovaraju valencionim vibracijama amino grupe, N-H deformacionim vibracijama i karbonilnim valencionim vibracijama acetil grupa, respektivno, su skoro nestali što se može objasniti činjenicom da su ovi pikovi u regionu spektra gde široki pik adsorbovane vode maskira njihov signal, ali i formiranjem vodoničnih veza između viskoze/celuloze i CS. Pored toga, široki pik u opsegu 3000–3600 cm^{-1} , koji odgovara O-H i NH_2 valencionim vibracijama, blago je pomeren prema višim talasnim brojevima i pokazuje niži intenzitet pika, što potvrđuje formiranje intermolekulskih vodoničnih veza između viskoze i CS³²⁴. U slučaju TEMPO CV/CS uzorka, pik koji se odnosi na C=O valencione vibracije karboksilnih anjona, blago je pomeren ka višim talasnim brojevima, od 1600 do 1610 cm^{-1} , i ima niži intenzitet, što ukazuje na jake interakcije između pozitivno naelektrisanih protonovanih amino grupa CS i negativno naelektrisanih karboksilnih grupa TEMPO CV³²⁵. Međutim, FTIR analizom nije potvrđena interakcija između aldehidnih grupa viskoze i amino grupa CS, s obzirom da se pik karakterističan za kovalentno vezivanje CS za celulozu formiranjem *Schiff*-ove baze nalazi u oblasti spektra gde absorbancija vode vezane za oba polimera može maskirati njegov signal. Dobijeni rezultati ukazuju da je CS fizički vezan za nemodifikovanu i različito pred-tretirane viskozne tkanine, dok su u slučaju TEMPO CV/CS potvrđene i elektrostatičke interakcije (jonsko vezivanje) između CS i TEMPO CV⁶².

Sadržaj hitozana u funkcionalizovanim nemodifikovanim i pred-tretiranim viskoznim tkaninama određen je elementalnom analizom, a na osnovu procenta azota koji potiče od hitozana (Tabela 16.). U poređenju sa nemodifikovanom viskoznom tkaninom, pred-tretmani su povećali sposobnost viskozne tkanine da veže CS, tj. sadržaj CS se povećao za 131% u slučaju TEMPO oksidisane viskozne tkanine, odnosno za 47% u slučaju TOCN naslojene viskozne tkanine. Dobijeni rezultati mogu se objasniti novim vezujućim mestima za CS koja se uvode na površinu vlakana/tkanine upotrebom oba pred-tretmana (Tabela 14.).

Tabela 16. Sadržaj hitozana u viskoznim tkaninama funkcionalizovanim sa hitozanom

Uzorak	Sadržaj hitozana, g/100 g celuloze
CV/CS	0,77
TEMPO CV/CS	1,78
TOCN CV/CS	1,13

Pored rezultata dobijenih pomoću FTIR spektroskopije i elementalne analize, uspešna funkcionalizacija viskoznih tkanina sa CS uočljiva je i iz promena vrednosti zeta potencijala u zavisnosti od pH za nemodifikovanu i pred-tretirane viskozne tkanine nakon adsorpcije hitozana iz rastvora (Slika 47.).

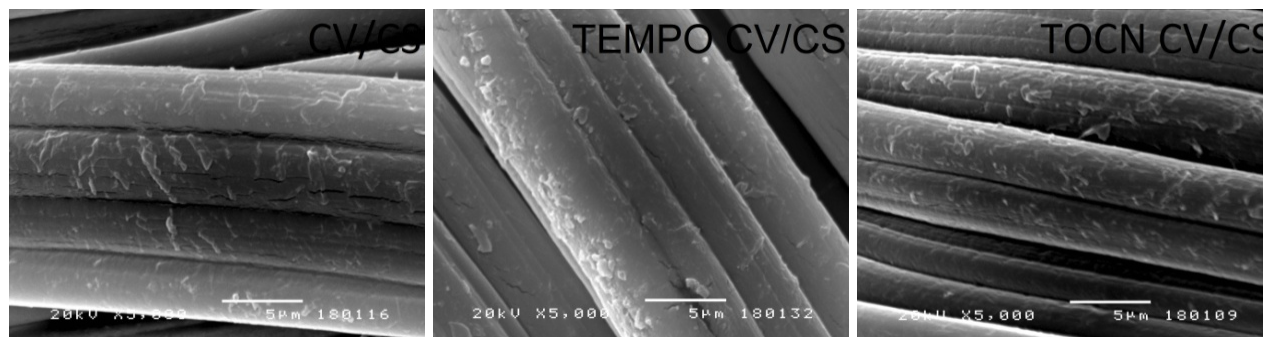


Slika 47. Zeta potencijal nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina pre i posle funkcionalizacije sa hitozanom

Krive zavisnosti zeta potencijala od pH za nemodifikovanu i TOCN naslojenu viskoznu tkaninu nakon funkcionalizacije sa CS ukazuju na tipično amfoterno ponašanje ovih tkanina zbog prisustva amino grupa CS na njihovoj površini. Takođe, IET su pomerene ka višim pH vrednostima (oko pH 7), a same krive zavisnosti zeta potencijala od pH pomerene su ka manje negativnim vrednostima u područjima viših pH vrednosti, dok u područjima nižih pH pokazuju pozitivne vrednosti. Uočene, manje negativne vrednosti platoa zeta potencijala ukazuju na manji broj slobodnih karboksilnih grupa na površini vlakana/tkanine. Količina slobodnih karboksilnih grupa na hitozanom funkcionalizovanim viskoznim tkaninama zavisi od intenziteta jonskih interakcija ovih grupa sa amino grupama. Pri nižim pH vrednostima, površina hitozanom funkcionalizovanih viskoznih tkanina je pozitivno naelektrisana zbog potisnute disocijacije slobodnih kiselih grupa celuloze i izražene protonizacije slobodnih amino grupa hitozana. U slučaju TEMPO oksidisanе viskoze, funkcionalizacija sa CS dovodi do pomeranja njene IET ka višim pH (pH 4,0), dok je čitava kriva zavisnosti zeta potencijala od pH pomerena ka višim vrednostima zbog manjeg broja dostupnih kiselih grupa na površini vlakana/tkanine. Tačnije, kriva zavisnosti zeta potencijala od pH pomerena je ka pozitivnim vrednostima u regionu višeg pH, ali i ka manje negativnim vrednostima u regionu nižeg pH. Manje negativne vrednosti zeta potencijala ukazuju da površina TEMPO oksidisanе viskozne tkanine nakon funkcionalizacije sa CS nije potpuno prekrivena sa CS, tj., na površini viskozne tkanine, pored amino grupa CS, takođe postoje slobodne kisele grupe celuloze, koje su dostupne za disocijaciju na kiselom pH. S druge strane, u području alkalnog pH protonizacija amino grupa CS bi trebalo da bude potisnuta (IET CS je oko 6,8³²⁶), pa je negativni zeta potencijal TEMPO oksidisanе viskozne tkanine nakon funkcionalizacije sa CS bio očekivan. Blago pozitivne vrednosti zeta potencijala dobijene na višim pH vrednostima mogu biti objašnjene, prema literaturi³²⁷, inverzijom naelektriranja na površini tkanine usled adsorpcije jona natrijuma prisutnih u rastvoru hitozana korišćenom za funkcionalizaciju, ali i kao kontrajona karboksilnih grupa u TEMPO oksidisanj viskozi.

9.2.2. Morfološke karakteristike viskoznih tkanina funkcionalizovanih hitozanom

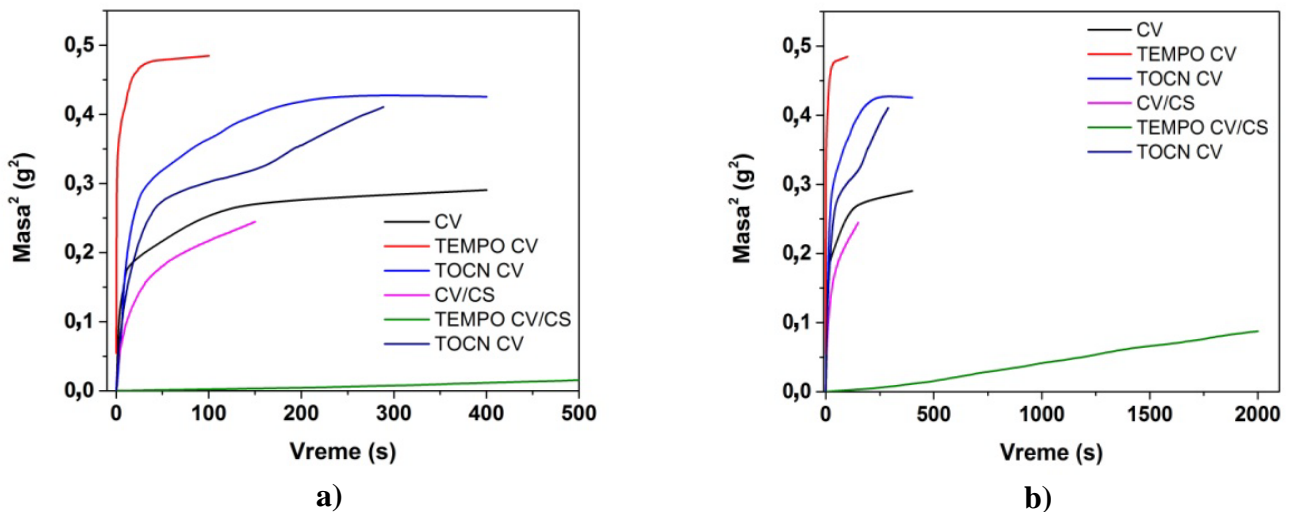
Morfologija površine nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih vlakana/tkanina posle funkcionalizacije sa CS ispitana je skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Uticaj hemije površine i topografije nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina na stepen adsorpcije i strukturu formiranog sloja CS, može biti uočen kroz promene u morfologiji površine vlakana naslojenih sa CS (tj. hrapavosti površine vlakana, veličini i gustini raspodele čestica CS), kao što je prikazano na Slici 48.. Molekuli CS formiraju pločaste čestice na površini nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih vlakana. Površine pred-tretiranih viskoznih vlakana uslovljavaju efikasniju adsorpciju, koja je u slučaju TEMPO oksidisanog uzorka rezultirala najgušćim rasporedom čestica.



Slika 48. SEM fotografije nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina posle funkcionalizacije sa CS, publikovano u ⁶²

9.2.3. Sorpciona i mehanička svojstva viskoznih tkanina funkcionalizovanih hitozanom

Sorpciona svojstva nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina određena su i nakon njihove funkcionalizacije sa hitozanom. Krive kvašenja za nemodifikovanu i pred-tretirane viskozne tkanine pre i posle funkcionalizacije sa hitozanom predstavljane su na Slici 49., sa koje se može uočiti da se brzina apsorpcije smanjuje nakon funkcionalizacije sa hitozanom kako za nemodifikovanu tako i za obe pred-tretirane viskozne tkanine. Smanjenje brzine apsorpcije može biti objašnjeno smanjenjem razvijenosti sistema kapilara tkanina i smanjenja poroznosti vlakana usled adsorpcije hitozana na njihovu površinu. Najdrastičnije smanjenje brzine apsorpcije zabeleženo je za TEMPO CV/CS što se može objasniti kako najvećom količinom adsorbovanog hitozana (Tabela 16.), tako i njegovom adsorpcijom u pukotine karakteristične za površinu TEMPO oksidisanih viskoznih vlakna (Slika 44.) čime je smanjena njihova poroznost.



Slika 49. Krive kvašenja za nemodifikovanu i pred-tretirane viskozne tkanine pre i posle funkcionalizacije sa hitozanom nakon 500 s (a) i 2000 s (b)

Funkcionalizacija hitozanom nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina odrazila se, takođe, i na njihov kapacitet sorpcije (Tabele 15. i 17.), kao i na vreme potrebno za uspostavljanje stanja ravnoteže prilikom sorpcije tečnosti. Kapacitet sorpcije generalno se smanjio nakon funkcionalizacije sa hitozanom: 7,70% za nemodifikovanu, 58,46% za TEMPO oksidisanu i 9,38% za TOCN naslojenu viskoznu tkaninu. Ovakav trend može biti objašnjen deponovanjem hitozana u spoljašnje pore/pukotine vlakana što je doprinelo smanjenju mogućnosti penetracije molekula tečnosti u amorfna područja vlakana. Nakon funkcionalizacije sa hitozanom, ravnotežno stanje prilikom sorpcije tečnosti uspostavilo se 7 s brže za nemodifikovanu, 26 s brže za TOCN naslojenu, a preko 2000 s sporije za TEMPO oksidisanu viskoznu tkaninu (Slika 49.).

Tabela 17. Količina sorbovane tečnosti u ravnotežnom stanju, ugao kvašenja, sadržaj vlage i prekidna sila viskoznih tkanina funkcionalizovanih hitozanom

Uzorak	Količina sorbovane tečnosti, g tečnosti/g tkanine	Ugao kvašenja, °	Sadržaj vlage, %	Prekidna sila, N	
				osnova	potka
CV/CS	0,48±0,08	48±20,92	8,46±0,16	221±2,65	147±1,53
TEMPO CV/CS	0,27±0,08	89±0,24	10,37±0,50	182±5,69	145±0
TOCN CV/CS	0,58±0,03	29±8,20	9,61±0,32	230±5,00	148±7,22

Poređenjem vrednosti uglova kvašenja za nemodifikovanu i pred-tretirane viskozne tkanine pre (Tabela 15.) i posle (Tabela 17.) funkcionalizacije sa hitozanom uočava se da je nakon funkcionalizacije sa hitozanom, ugao kvašenja nemodifikovane viskozne tkanine sa 81 ° smanjen na 48 °, TEMPO oksidisan sa 40 ° povećan na 89 °, a TOCN naslojene sa 82 ° smanjen na 29 °. Poznato je da je hitozan izuzetno hidrofilan molekul²⁹³, pa je smanjenje uglova kvašenja odnosno povećanje hidrofilnosti površina nemodifikovane i TOCN naslojene viskozne tkanine nakon adsorpcije hitozana bilo očekivano. Međutim, u slučaju TEMPO oksidisanu viskozne tkanine došlo je do povećanja ugla kvašenja odnosno smanjenja hidrofilnosti njene površine nakon adsorpcije hitozana najverovatnije

usled uspostavljenih interakcija između TEMPO oksidisane viskozne tkanine i molekula hitozana koje su istovremeno smanjile broj slobodnih hidrofilnih grupa, kako TEMPO oksidisane viskozne tkanine, tako i molekula hitozana.

Za razliku od brzine apsorpcije, kapaciteta sorpcije i ugla kvašenja, sadržaj vlage nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina nakon funkcionalizacije sa hitozanom nije se značajno promenio što se može videti poređenjem rezultata dobijenim pre (Tabela 15.) i posle (Tabela 17.) funkcionalizacije sa hitozanom.

Funkcionalizacije sa CS na kiselom pH značajno pogoršavaju mehanička svojstva celuloznih materijala^{320, 258, 265} što se direktno odražava na njihova upotreba svojstva. Poređenjem rezultata dobijenim za prekidnu silu nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina (Tabela 15.) i funkcionalizovanih sa CS (Tabela 17.) vidi se da je funkcionalizacija sa CS praćena smanjenjem prekidne sile. Ovo može biti objašnjeno interakcijama CS sa celulozom, koje se očigledno dešavaju i u unutrašnjosti vlakana što utiče na njihovu fibrilarnu strukturu, ali i sa uticajem kiselih uslova kojima su molekuli celuloze izloženi tokom funkcionalizacije sa CS¹⁷.

9.2.4. Antibakterijska svojstva viskoznih tkanina funkcionalizovanih hitozanom

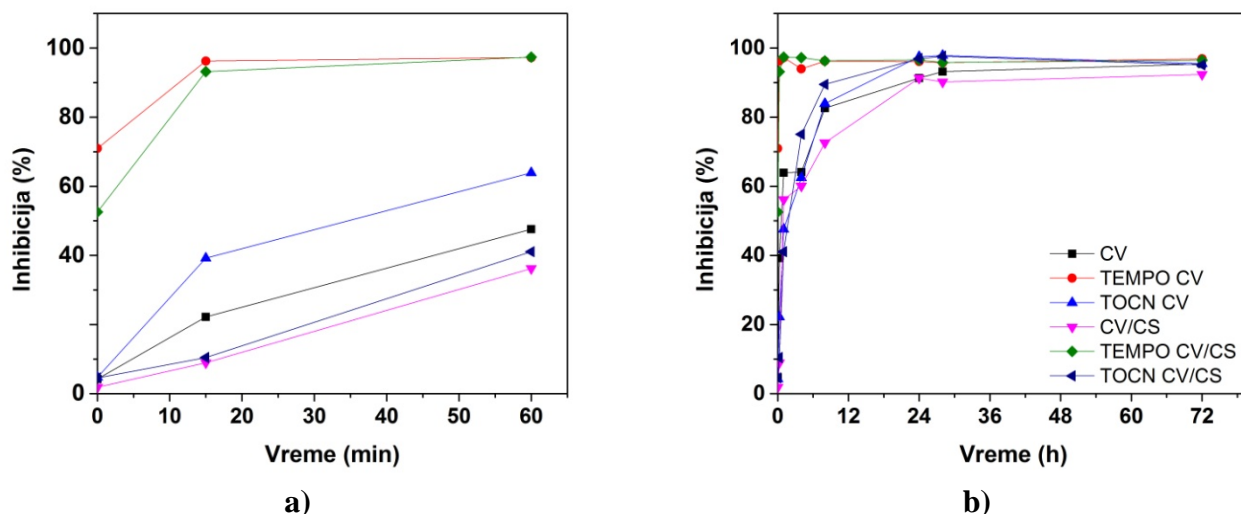
Antibakterijska svojstva funkcionalizovanih viskoznih tkanina određena su prema Gram-pozitivnoj (*S.aureus*) i Gram-negativnoj (*E.coli*) bakteriji. Prema korišćenom standardu ASTM E2149-01, uzorak pokazuje antibakterijsku aktivnost ako je bakterijska redukcija veća od 75%. Rezultati pokazani u Tabeli 18. ukazuju na efikasnu antimikrobnu redukciju sa tkaninama funkcionalizovanim sa CS. Maksimalna redukcija *S.aureus* je ustanovljena za sve ispitivane uzorke. U slučaju *E.coli*, samo je TEMPO CV/CS uzorak obezbedio maksimalnu redukciju, dok su nemodifikovana i TOCN naslojena tkanina funkcionalizovane CS obezbedile sličnu, izuzetnu antimikrobnu aktivnost. Rezultati bakterijske redukcije su vrlo slični, a male razlike mogu se objasniti razlikama u sadržaju CS, najveći sadržaj vezanog CS u slučaju TEMPO CV/CS uzorka (Tabela 16.), kao i pristupačnošću amino grupa (Slika 46.). Naime, kao što je već rečeno, antibakterijska aktivnost CS zasniva se na više različitih mehanizmima (remećenje ćelijske membrane/ćelijskog zida bakterija, interakcija sa DNA bakterija, helacija nutrijenata neophodnih za opstanak bakterija, i formiranje gustog polimernog filma na površini bakterija) koji se odvijaju istovremeno, ali u različitim intenzitetima, pri čemu je najdominantniji mehanizam zasnovan na mehanizmima remećenja ćelijske membrane/ćelijskog zida bakterija u kome protonovane amino grupe CS imaju ključnu ulogu¹⁶⁷.

Tabela 18. Redukcija bakterija sa viskoznim tkaninama funkcionalizovanim hitozanom, publikovano u⁶²

Uzorak	Redukcija bakterija, %	
	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>
CV/CS	99,9	97,9
TEMPO CV/CS	99,9	99,9
TOCN CV/CS	99,9	99,3

9.2.5. Antioksidativna svojstva viskoznih tkanina funkcionalizovanih hitozanom

Slobodni radikali predstavljaju toksične vrste za organizam. Imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi što im omogućava da lako reaguju sa drugim molekulima. Reakcijom slobodnih radikala sa drugim molekulima nastaju novi slobodni radikali. Sa druge strane, jedinjenja koja smanjuju štetan uticaj slobodnih radikala, njihove reakcije sa drugim molekulima i stvaranje novih slobodnih radikala su antioksidansi. Uloga antioksidansa je u 'neutralizaciji' slobodnih radikala, pri čemu sami antioksidansi postaju oksidovani²⁴⁴. Na Slici 50. prikazani su rezultati antioksidativne aktivnosti nemodifikovane i pred-tretiranih tkanina pre i posle funkcionalizacije hitozanom. Za sve ispitane uzorke, uočen je rast inhibicije ABTS radikala prvih 24 h nakon čega se postiže maksimum, u intervalu od 90 do 99% (Slika 50. (b)). S obzirom na hemijsku strukturu odnosno prisustvo hidroksilnih, karboksilnih i aldehidnih grupa, celuloza je supstrat koji ima potencijal za doniranje vodonika kojim bi mogao da redukuje slobodne radikale. Međutim, mehanizam njene antioksidativne aktivnosti još uvek nije poznat. Sa Slike 50. (a) se vidi da nemodifikovana i pred-tretirane viskozne tkanine postižu značajnu inhibiciju ABTS radikala već nakon 60 min: 47% za CV, 64% za TOCN CV i 97% za TEMPO CV. Inhibicija ABTS radikala za nemodifikovanu i pred-tretirane viskozne tkanine je u korelaciji sa sadržajem njihovih karboksilnih grupa: 0,064 mmol·g⁻¹ celuloze za CV, 0,086 mmol·g⁻¹ celuloze za TOCN CV i 0,438 mmol·g⁻¹ celuloze za TEMPO CV. Imajući u vidu da su joni natrijuma iz natrijum-karboksilatnih grupa pred-tretiranih tkanina podložniji disocijaciji od jona vodonika iz hidroksilnih, karboksilnih i aldehidnih grupa nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina, verovatno je da su oni imali dodatnu ulogu u poboljšanju redukcije ABTS radikala pred-tretiranim tkaninama. Mnoge studije su pokazale da CS redukuje slobodne radikale doniranjem vodonika iz hidroksilnih i amino grupa^{328, 329}. Međutim, sve tkanine nakon funkcionalizacije sa CS su pokazale nešto nižu inhibiciju (Slika 50.) što može biti objašnjeno uspostavljenim interakcijama između vodonik/natrijum donirajućih grupa viskoznih tkanina i CS tokom funkcionalizacije.

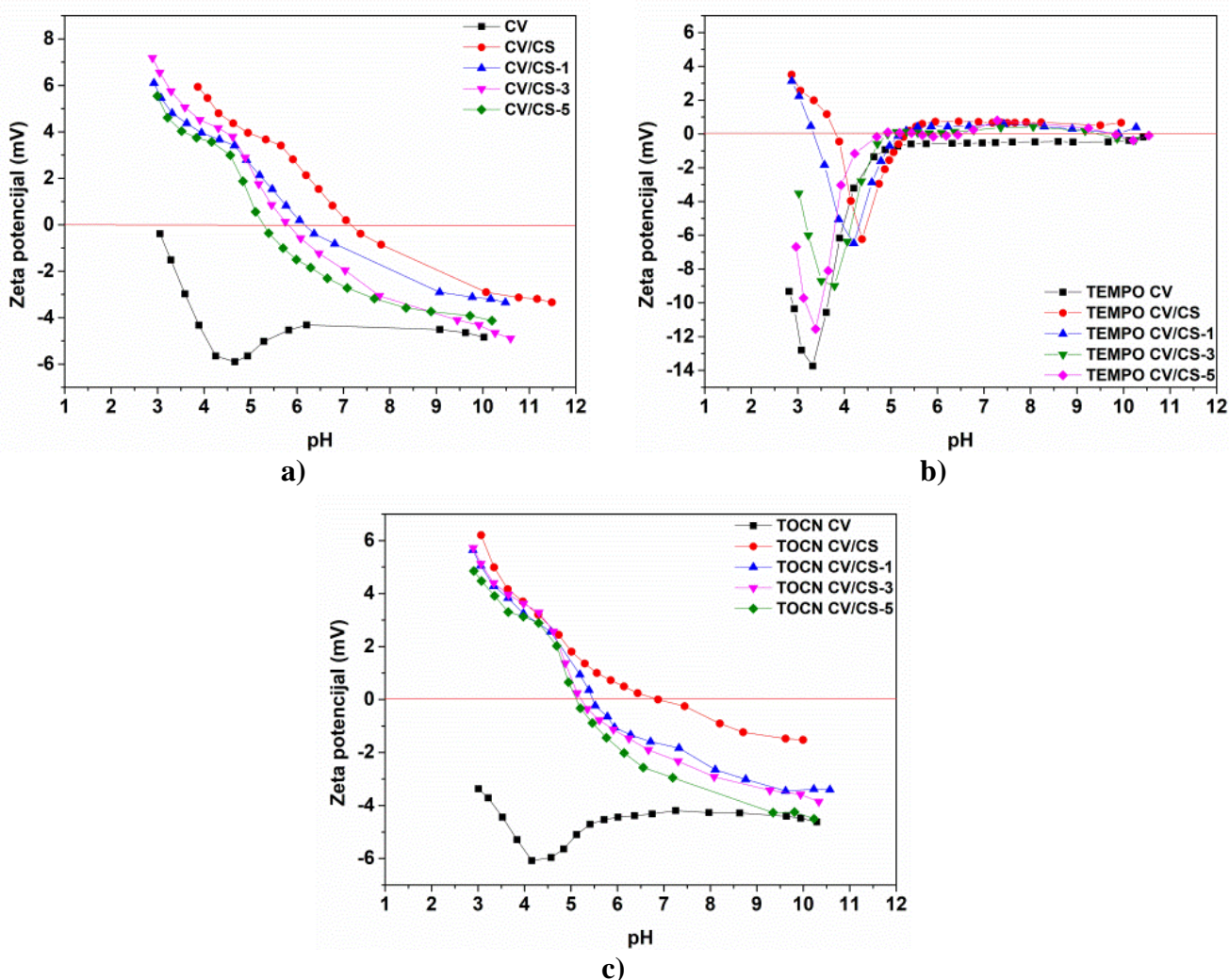


Slika 50. Antioksidativna aktivnost nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina pre i posle funkcionalizacije sa hitozanom tokom 1 h (a) i 72 h (b); legenda je ista za obe slike

9.2.6. Postojanost na pranje viskoznih tkanina funkcionalizovanih hitozanom

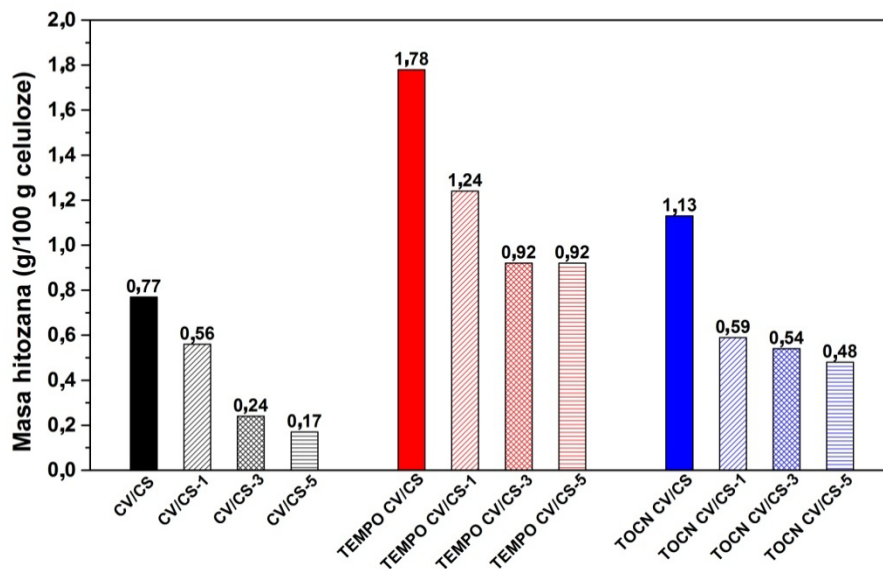
Postojanost na pranje viskoznih tkanina funkcionalizovanih CS praćena je kroz promene u njihovim elektrokinetićkim svojstvima, sadržaju hitozana, antibakterijskim i antioksidativnim svojstvima nakon višestrukih ciklusa pranja tj. 1, 3 i 5 ciklusa pranja.

Promene elektrokinetićkih svojstava nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina funkcionalizovanih CS pre i posle više ciklusa pranja se mogu videti sa Slike 51. Za sve uzorke, nakon svakog ciklusa pranja krive zavisnosti zeta potencijala od pH su se fazno pomerile ka nižem pH, odnosno nižim IET, što ukazuje na oslobađanje reverzibilno vezanih molekula CS tokom pranja. Upoređujući krive zavisnosti zeta potencijala od pH nemodifikovanih i pred-retiranih viskoznih tkanina pre funkcionalizacije sa CS i tkanina funkcionalizovanih sa CS nakon 5 ciklusa pranja, jasno je da je CS još uvek prisutan na površini tkanina.



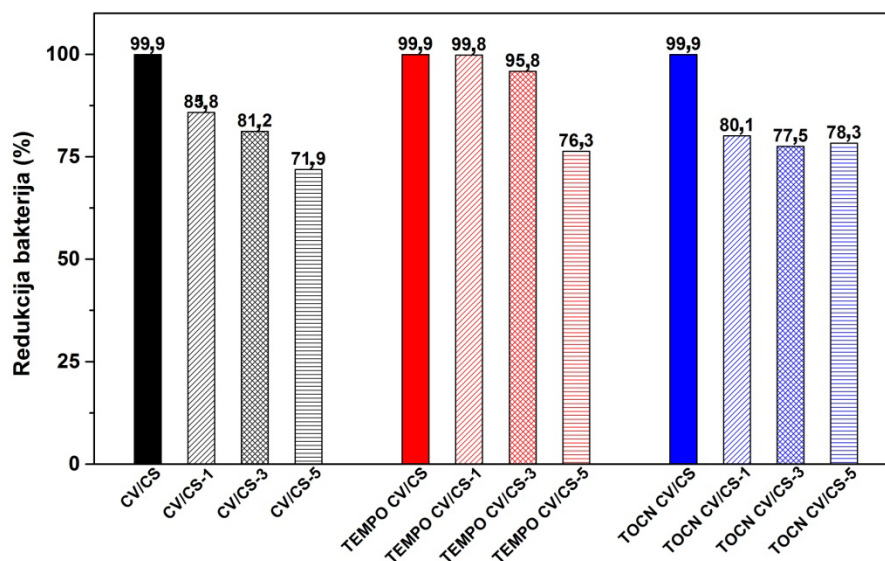
Slika 51. Zeta potencijal nemodifikovanih (a), TEMPO oksidisanih (b) i TOCN naslojenih (c) viskoznih tkanina funkcionalizovanih hitozanom pre i posle 1, 3 i 5 ciklusa pranja, publikovano u⁶²

U poređenju sa nemodifikovanom, pred-tretmani su povećali stabilnost vezanog CS tokom pranja, i samim tim njegov sadržaj u tkaninama nakon 5 ciklusa pranja. Uzimajući u obzir sadržaj CS određen nakon 1, 3 i 5 ciklusa pranja (Slika 52.), smanjenje zabeleženo nakon 1 ciklusa pranja je 27,27% za nemodifikovanu, 30,34% za TEMPO oksidisanu i 47,79% za TOCN naslojenu viskozu. Dodatno smanjenje sadržaja CS zabeleženo je nakon 3 ciklusa pranja za sve uzorke, od kojih je najizraženije (oko 57%) za CS nemodifikovanu viskozu funkcionalizovanu sa CS (CV/CS-3). Nakon 5 ciklusa pranja ponovo je zabeleženo najveće smanjenje sadržaja CS, od oko 29%, za nemodifikovanu viskozu funkcionalizovanu sa CS pokazujući najslabiju postojanost na pranje sa ukupnim smanjenjem sadržaja CS od oko 78%, posle 5 ciklusa pranja, i ujedno najnižim sadržajem CS (0,17 g/100 g celuloze). TOCN CV/CS je pokazao bolju postojanost na pranje, sa ukupnim smanjenjem sadržaja CS od oko 57% i većim sadržajem CS (0,48 g/100 g celuloze) nakon 5 ciklusa pranja. Najbolju postojanost na pranje pokazao je TEMPO CV/CS uzorak; nakon 3 ciklusa pranja ukupno smanjenje sadržaja CS je bilo oko 48%, odnosno 0,92 g hitozana/100 g celuloze, bez promena tokom daljeg pranja. Nevedeno smanjenje sadržaja hitozana može se objasniti činjenicom da je određena količina hitozana reverzibilno vezana na površini celuloze²⁹³.

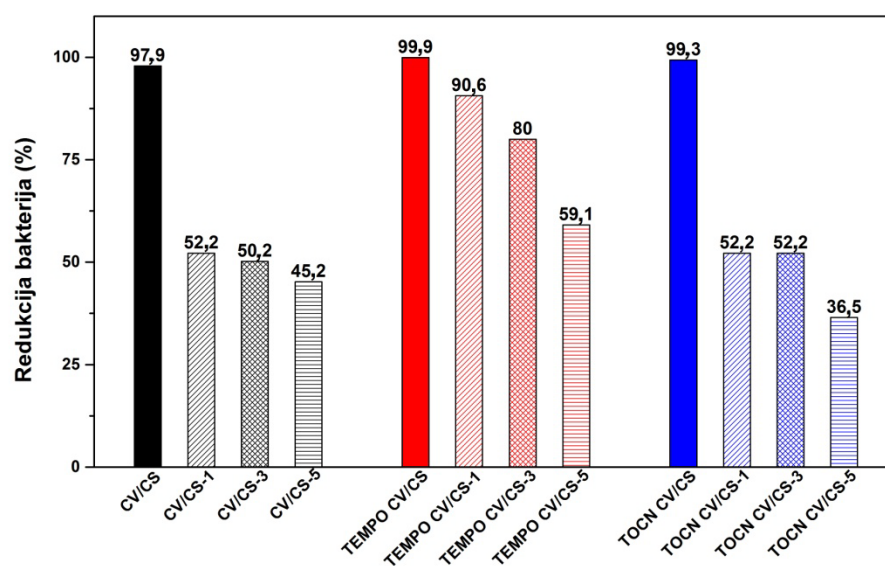


Slika 52. Sadržaj hitozana u viskoznim tkaninama funkcionalizovanim hitozanom posle 1, 3 i 5 ciklusa pranja, publikovano u⁶²

Uprkos činjenici da se sadržaj hitozana na viskoznim tkaninama smanjuje nakon višekratnih ciklusa pranja, antibakterijska aktivnost viskoznih tkanina funkcionalizovanih sa CS prema Gram-pozitivnim (*S.aureus*) bakterijama je potvrđena za sve uzorke nakon 1, 3 i 5 ciklusa pranja, sa izuzetkom uzorka CV/CS-5 (Slika 53. (a)), dok se u slučaju Gram-negativnih (*E.coli*) bakterija, antibakterijska aktivnost smanjuje sa povećanjem broja ciklusa pranja (Slika 53. (b)). Imajući u vidu navedeno, bolja aktivnost viskoze funkcionalizovane sa CS prema Gram-pozitivnim (*S.aureus*) u odnosu na Gram-negativne bakterije (*E.coli*), verovatno je posledica prisustva spoljašnje membrane u Gram-negativnim bakterijama, koja deluje kao barijera prema spoljašnjim uticajima, što je već detaljno objašnjeno²⁶³.



a)



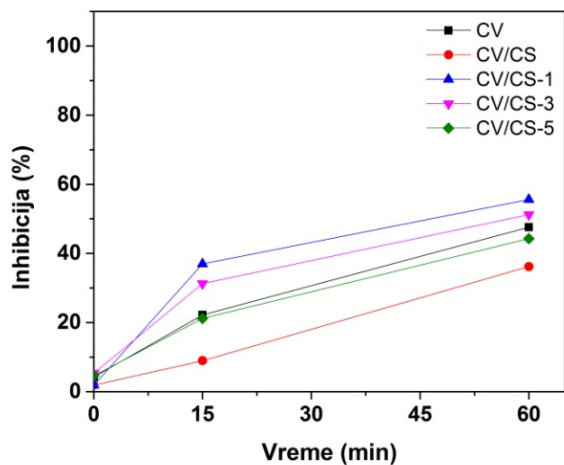
b)

Slika 53. Redukcija bakterija nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina funkcionalizovanih hitozanom pre i posle 1, 3 i 5 ciklusa pranja prema *S.aureus* (a) i *E.coli* (b), publikovano u⁶²

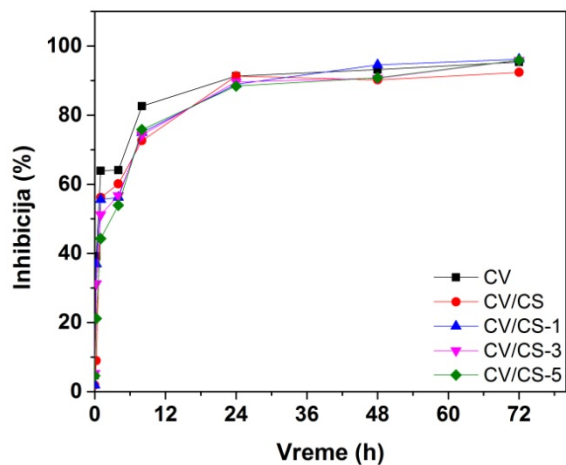
Uporedna analiza količine vezanog CS (Tabela 16.) i antibakterijska aktivnost nakon pranja (Slika 53.) ukazuje da je postizanje antimikrobne aktivnosti postojane na pranje za viskozu funkcionalizovanu CS bio veliki izazov zbog dva suprotstavljena uslova, koja treba da budu ispunjena: 1) dovoljna količina mesta za vezivanje u/na viskozi, na koju potrebna količina CS može biti ireverzibilno vezana, i, u isto vreme 2) potrebna količina slobodnih amino grupa CS, koje su odgovorne za antibakterijsku aktivnost. Nemodifikovana viskozna tkanina funkcionalizovana CS je ostvarila efikasnu bakterijsku redukciju prema *S.aureus* do 3 ciklusa pranja, a prema *E.coli* samo pre pranja. Ovo sugerise da fizičke interakcije

između viskoze i CS ostvaruju dovoljno jak aditivan efekat, obezbeđujući istovremeno potrebnu količinu vezanog CS i potrebnu količinu slobodnih amino grupa CS, koji omogućava antibakterijsku aktivnost pre pranja i antibakterijsku aktivnost postojanu na pranje prema *S.aureus*. TOCN naslojena viskozna tkanina funkcionalizovana CS je ostvarila efikasnu bakterijsku redukciju prema *S.aureus* do 5 ciklusa pranja, dok je prema *E.coli* efekat bio prisutan samo pre pranja, slično nemodifikovanoj viskozi. U poređenju sa nemodifikovanom, TOCN naslojena viskoza pokazala je nešto nižu antibakterijsku aktivnost prema *S.aureus* nakon 1 i 3 ciklusa pranja, bez obzira na viši sadržaj hitozana u TOCN naslojenoj viskozi nakon odgovarajućih ciklusa pranja (Slika 52.). Ovo se može objasniti većom gustinom površinskog naelektrisanja nemodifikovane viskoze funkcionalizovane CS u kiselom pH području (Slika 51.) usled veće količine slobodnih amino grupa. Upoređujući rezultate dobijene za sve ispitivane uzorke, očigledno je da je TEMPO oksidisana viskozna tkanina funkcionalizovana sa CS pokazala najefikasniju i najpostojaniju antibakterijsku aktivnost prema oba tipa bakterija tj. efikasnu bakterijsku redukciju prema *S.aureus* do 5 ciklusa pranja i prema *E.coli* do 3 ciklusa pranja. Generalno, TEMPO oksidacija i naslojavanje sa TOCN je rezultiralo većim stepenom adsorpcije CS u/na tkaninama, njegovom boljom stabilnošću tokom pranja i posledično većom količinom CS nakon pranja (Slika 52.). Pored toga, nakon funkcionalizacije sa CS, pred-tretirane tkanine su pokazale efikasniju i postojaniju antibakterijsku aktivnost u poređenju sa nemodifikovanom viskoznom tkaninom (Slika 53.), što može biti objašnjeno većom količinom slobodnih amino grupa CS (Slika 51.).

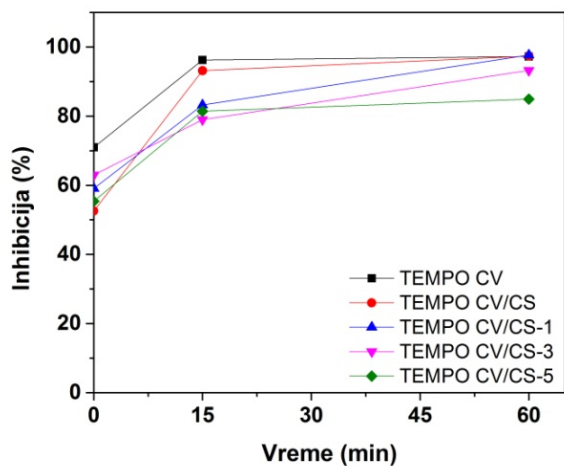
S obzirom da su dobijene slične vrednosti za antioksidativnu aktivnost viskoznih tkanina pre i posle funkcionalizacije sa CS (Slika 50.), zabeleženo otpuštanje CS (Slika 52.) se nije značajno odrazilo na antioksidativnu aktivnost viskoznih tkanina funkcionalizovanih CS nakon višestrukih ciklusa pranja (Slika 54.).



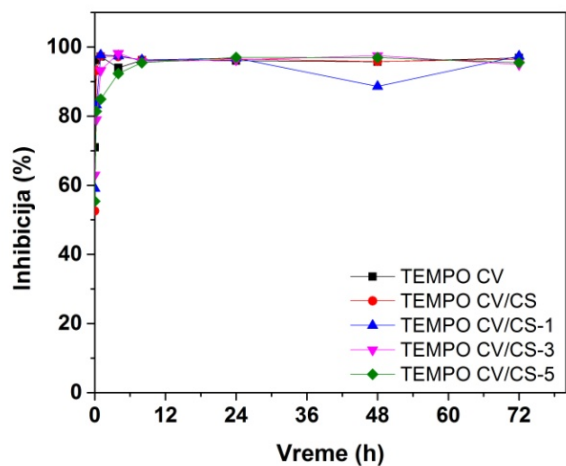
a)



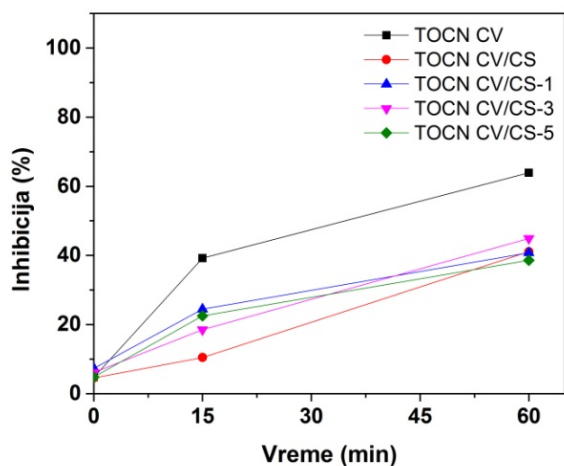
b)



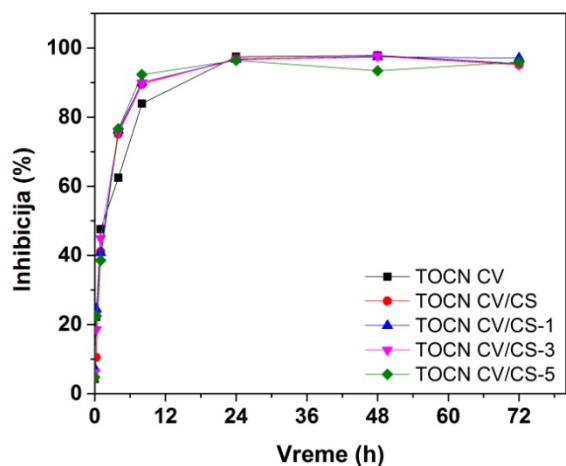
c)



d)



e)



f)

Slika 54. Antioksidativna aktivnost nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina funkcionalizovanih hitozanom pre i posle 1, 3 i 5 ciklusa pranja nakon (a, c, e) 1 h i (b, d, f) 72 h

Iz svega navedenog proizilazi da su TEMPO oksidacija i naslojavanje TOCN omogućili poboljšanu funkcionalizaciju viskozne tkanine CS, uvođenjem karboksilnih i aldehidnih grupa u/na viskoznu tkaninu za ireverzibilno vezivanje CS. Oba pred-tretmana doprinela su povećanju sadržaja karboksilnih i aldehidnih grupa, a time i sposobnosti viskozne tkanine da adsorbuje CS. Kao posledica povećane količine ireverzibilno vezanog CS, antibakterijska aktivnost pred-tretiranih viskoznih tkanina pokazala se kao efikasnija i postojanija na pranje. TEMPO oksidisana viskozna tkanina funkcionalizovana CS ostvarila je na pranje najpostojaniju antibakterijsku aktivnost prema obe ispitivane bakterije (*S.aureus* i *E.coli*). Sve viskozne tkanine funkcionalizovane CS pokazale su dobra antioksidativna svojstva, bez značajnog pogoršanja nakon višestrukih ciklusa pranja. Iz dobijenih rezultata utvrđeno je da TEMPO oksidacija narušava mehanička svojstva viskozne tkanine, a da ih naslojavanje TOCN poboljšava. Imajući to u vidu, viskozna tkanina naslojena TOCN i naknadno funkcionalizovana CS je materijal visoke dodatne vrednosti zbog istovremenog poboljšanja bioaktivnih i mehaničkih svojstava, i predstavlja dobru polaznu osnovu za unapređenje ovog nanostrukturnog materijala u cilju intenzivnijeg istovremenog poboljšanja pomenutih svojstva. Zahvaljujući odličnim bioaktivnim svojstvima, sve tkanine funkcionalizovane CS imaju veliki potencijal da budu primenjene kao medicinski tekstilni materijali postojani na pranje.

S obzirom na literaturne podatke o prednostima korišćenja hitozana u formi nanočestica kao i njegovih kompleksa sa cinkom, prikazane u teorijskom delu ove doktorske disertacije, u narednom poglavlju predstavljeno je unapređenje funkcionalizacije nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina primenom hitozana u formi nanočestica sa i bez inkorporiranih jona cinka.

9.3. Karakterizacija viskoznih tkanina funkcionalizovanih NCS sa i bez inkorporiranih jona cinka

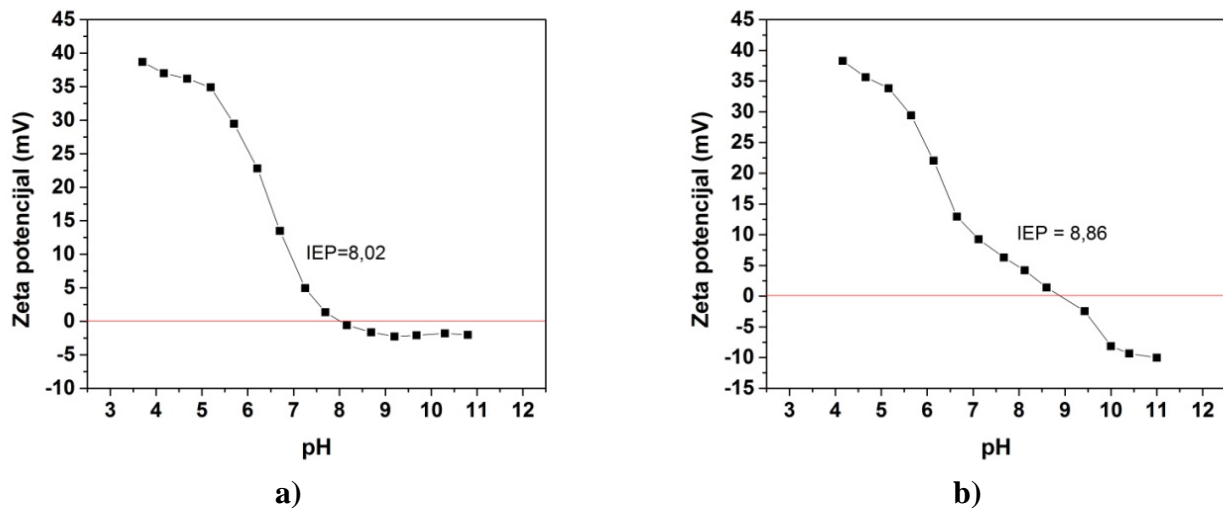
Imajući u vidu da su najnovija istraživanja¹⁹² pokazala da se NCS odlikuju odličnom propustljivošću, imunološkom modulacijom i netoksičnošću za humane ćelije, antimikrobnim svojstvima (NCS poseduje poboljšana antibakterijska svojstva u poređenju sa hitozanom u masi¹⁹³), kao i rezultate postignute u razvoju hibrida na bazi NCS i jona metala, u cilju povezivanja helacionih svojstava hitozana sa antibakterijskim svojstvima jona metala (helacija jona metala od strane NCS trebalo bi da dovede do povećane gustine pozitivnog naelektrisanja NCS a time i do njihove pobojšane adsorpcije na negativno naelektrisane površine bakterija, uzrokujući inhibiciju rasta bakterija¹⁵), funkcionalizacija nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina unapređena je funkcionalizacijom NCS sa i bez inkorporiranih jona cinka. Cink je izabran s obzirom da pored odličnih antibakterijskih svojstava²²⁹ istovremeno pokazuje odlična antioksidativna svojstva²²⁷ i ubrzava zarastanje rana²³⁴.

9.3.1. Zeta potencijal i veličina čestica NCS sa i bez inkorporiranih jona cinka

Površinsko naelektiranje i veličina čestica NCS sa i bez inkorporiranih jona cinka su parametri koji utiču na stabilnost samih disperzija, interakciju nanočestica i viskoznih tkanina u procesima njihovih funkcionalizacija, ali i na svojstva funkcionalizovanih viskoznih materijala.

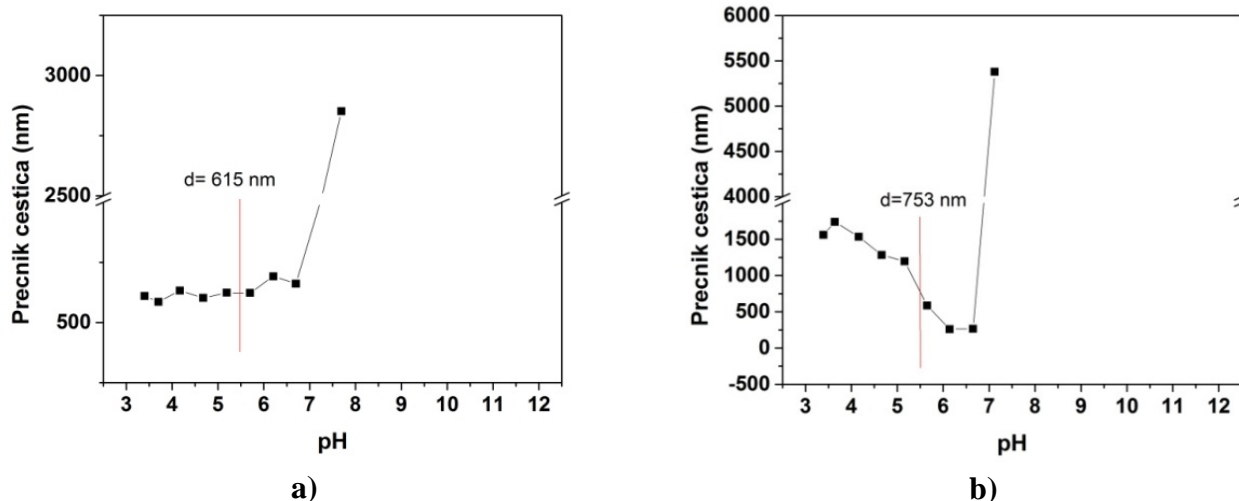
Sa Slike 55. može se uočiti da je na pH vrednostima nižim od 6 zeta potencijal NCS i NCS+Zn viši od 25 mV što ukazuje da su njihove disperzije stabilne na pH vrednostima nižim od 6 odnosno da je njihova primena moguća na tim uslovima. U poređenju sa hitozanom, NCS i NCS+Zn pokazale su veću ukupnu gustinu pozitivnog naelektrisanja tj. došlo je do pomeranja IET sa 6,8326 za CS na 8,02 za NCS i na 8,86 za NCS+Zn (Slika 55.). Do povećanja vrednosti IET za NCS verovatno je došlo usled inkorporiranja jona natrijuma u njihovu strukturu iz rastvora natrijum-tripolifosfata, korišćenog za njihovo dobijanje. Još veća vrednost IET za NCS+Zn posledica je inkorporiranja i jona cinka u strukturu NCS iz rastvora cink-acetata, dodatno korišćenog za njihovo dobijanje. Poređenjem vrednosti IET za NCS i NCS+Zn jasno je da je helacijom cinka sa NCS postignuto povećanje ukupne gustine pozitivnog naelektrisanja NCS+Zn (Slika 55.).

U području kiselog pH, usled protonovanja amino grupa i potisnute disocijacije hidroksilnih grupa hitozana dobijene su pozitivne vrednosti zeta potencijala za NCS i NCS+Zn (Slika 55.) što ukazuje na pozitivno naelektrisanje površina NCS i NCS+Zn u tim uslovima. S druge strane, u području alkalnog pH, usled disocijacije hidroksilnih grupa i potisnutog protonovanja amino grupa dobijene su negativne vrednosti zeta potencijala za NCS i NCS+Zn (Slika 55.) što ukazuje na negativno naelektrisanje površina NCS i NCS+Zn u tim uslovima. Na dobijene negativne vrednosti zeta potencijala verovatno je uticalo i vezivanje negativnih jona tripolifosfata iz rastvora natrijum-tripolifosfata za NCS i dodatno negativnih jona acetata iz rastvora cink-acetata za NCS+Zn tokom procedure njihovog dobijanja.



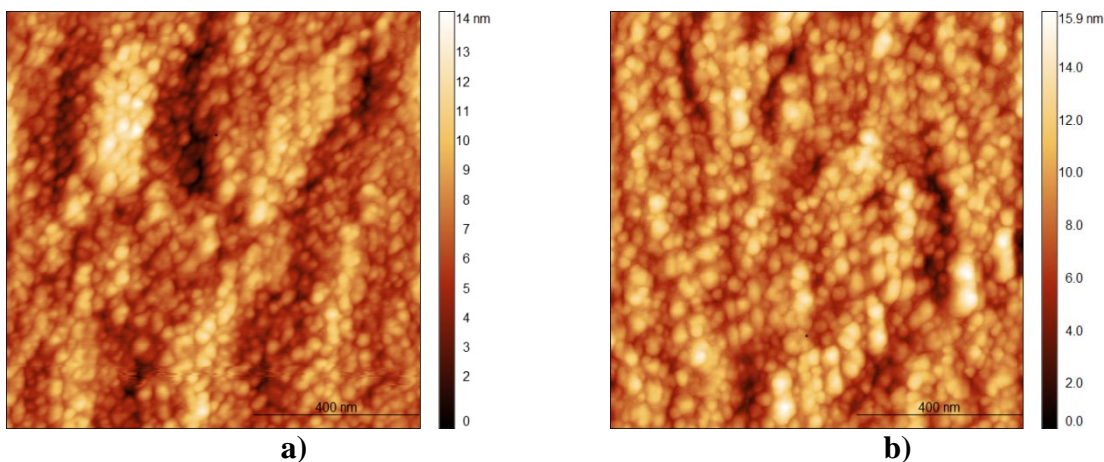
Slika 55. Zeta potencijal NCS (a) i NCS sa inkorporiranim jonima cinka (b) u zavisnosti od pH

Izmerena veličina čestica za NCS je između 600 i 700 nm, dok je za NCS+Zn između 250 i 1500 nm, u opsegu pH vrednosti od 3,5 do 6,8 (Slika 56.). Sa Slike 56. može se videti da na pH vrednostima višim od 6,8 dolazi do nagle agregacije NCS i NCS+Zn usled potisnutog protonovanja amino grupa hitozana odnosno smanjenog površinskog naelektrisanja nanočestica koje je neophodno za njihovo međusobno odbijanje.



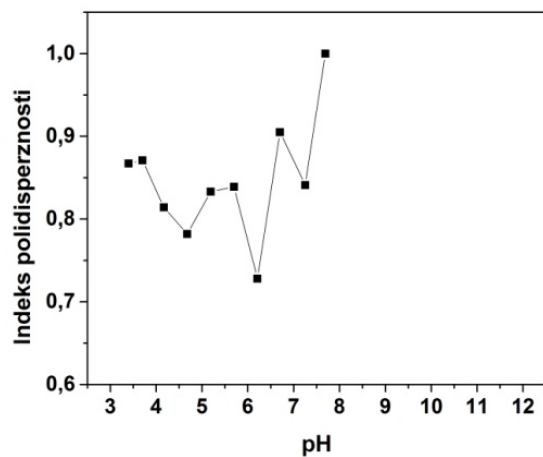
Slika 56. Veličina čestica NCS (a) i NCS sa inkorporiranim jonima cinka (b) u zavisnosti od pH

Sa Slike 56. može se videti da je na pH 5,5, na kojem su rađene funkcionalizacije viskoznih tkanina sa NCS i NCS+Zn, veličina čestica NCS+Zn (753 nm) veća u odnosu na NCS (615 nm) što, pored merenja zeta potencijala, ukazuje na inkorporaciju cinka u NCS tokom postupka dobijanja NCS+Zn. S obzirom na izraženu sklonost hitozana ka hidrataciji u kontaktu sa tečnostima²⁹³ i da je primenjenom metodom izmerena veličina čestica NCS i NCS+Zn u hidratisanom obliku, upotrebljena je AFM analiza za utvrđivanje njihovih dimenzija u suvom stanju (Slika 57.). Sa Slike 57. se može videti da su dimenzije čestica NCS i NCS+Zn oko 30 nm u suvom stanju tj. više od 20 puta manje nego u hidratisanom. Ovako velika razlika u dimenzijama NCS i NCS+Zn u hidratisanom i suvom stanju ukazuje na njihovu sklonost ka hidratisanju ali i agregaciji.

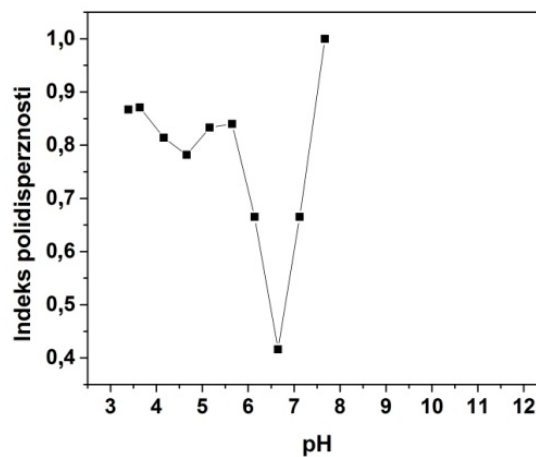


Slika 57. AFM fotografija NCS (a) i NCS sa inkorporiranim jonima cinka (b). Veličina slike $1 \times 1 \mu\text{m}^2$.

Za NCS i NCS+Zn može se reći da imaju veoma široku raspodelu dimenzija čestica s obzirom da im je indeks polidisperznosti na pH vrednostima na kojima nisu u agregiranom stanju (imeđu pH 3,5 i 6,8) veći od 0,7 (Slika 58.).



a)



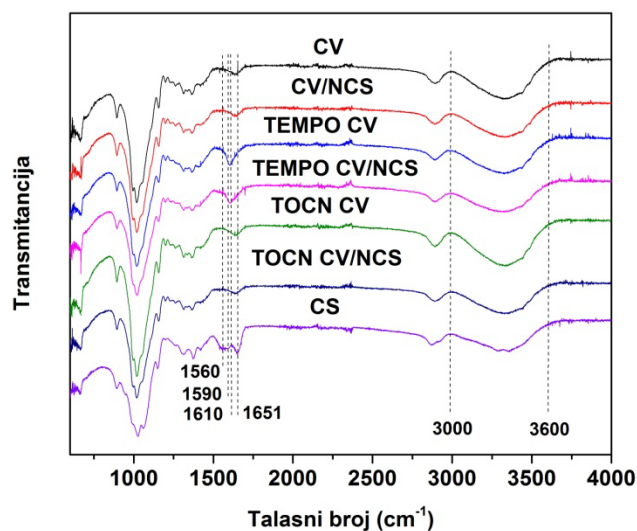
b)

Slika 58. Indeks polidisperznosti NCS (a) i NCS sa inkorporiranim jonima cinka (b) u zavisnosti od pH

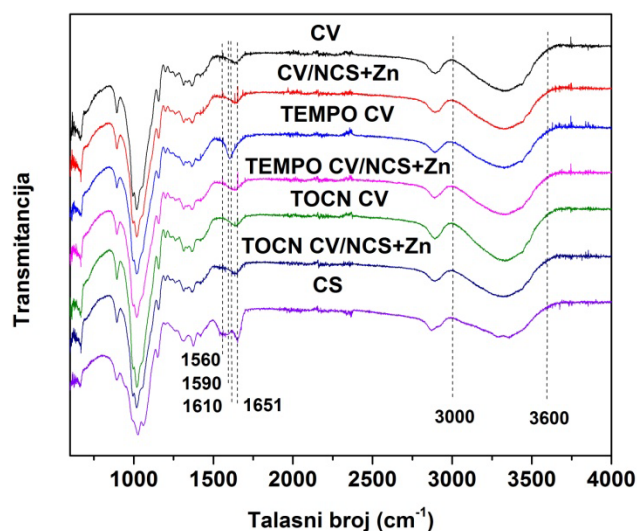
9.3.2. Hemijska i elektrokinetička svojstva viskoznih tkanina funkcionalizovanih NCS sa i bez inkorporiranih jona cinka

Za karakterizaciju hemijskih i elektrokinetičkih svojstava viskoznih tkanina funkcionalizovanih NCS sa i bez inkorporiranih jona cinka primenjene su FTIR tehnika, elementalna i ICP-OES analiza, kao i merenja zeta potencijala.

FTIR spektri čistog CS, nemodifikovane viskozne tkanine i različito pred-tretiranih viskoznih tkanina, pre i posle funkcionalizacije sa NCS/NCS+Zn, su prikazani na Slici 59.



a)



b)

Slika 59. FTIR spektri viskoznih tkanina pre i posle funkcionalizacije sa (a) NCS i (b) NCS+Zn

FTIR spektri nemođifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina posle funkcionalizacije sa NCS/NCS+Zn pokazuju pikove karakteristične za celulozu i CS sa malim modifikacijama. Osnovni pikovi hitozana u FTIR spektrima nemođifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina posle funkcionalizacije sa NCS/NCS+Zn (na 1560, 1590 i 1651 cm^{-1} koji odgovaraju valencionim vibracijama amino grupe, N-H deformacionim vibracijama i karbonilnim valencionim vibracijama acetil grupe, respektivno) su skoro nestali. To mođe biti objašnjeno činjenicom da su ovi pikovi u regionu spektra gde široki pik adsorbovane vode maskira njihov signal, kao i formiranjem vodoničnih veza između viskoze i NCS/NCS+Zn. Intermolekulske vodonične veze između viskoznih tkanina i NCS/NCS+Zn su potvrđene blagim pomeranjem pika prema višim talasnim brojevima i nižim

intenzitetom širokog pika između 3000–3600 cm^{-1} , koji odgovara O-H NH_2 valencionim vibracijama³²⁴. Jake interakcije između pozitivno naelektrisanih amonijum grupa NCS/NCS+Zn i negativno naelektrisanih karboksilnih grupa TEMPO CV su potvrđene za TEMPO CV/NCS i TEMPO CV/NCS+Zn blagim pomeranjem pika na više talasne brojeve (od 1600 do 1610 cm^{-1}) i značajnim smanjenjem intenziteta pika koji se odnosi na C=O valencione vibracije karboksilnih anjona³²⁵. Reakcija između aldehidnih grupa viskoznih tkanina i amino grupa NCS/NCS+Zn nije zabeležena. Naime, karakterističan pik za kovalentno vezivanje NCS/NCS+Zn i viskoze formiranjem *Schiff*-ove baze je u oblasti spektra gde absorbancija vode vezane za celulozu i hitozan može maskirati njegov signal. Generalno, dobijeni rezultati su potvrdili da su NCS/NCS+Zn fizički vezane za nemodifikovanu i pred-tretirane viskozne tkanine. Pored toga, potvrđene su i elektrostatičke interakcije (jonsko vezivanje) između TEMPO CV i NCS/NCS+Zn.

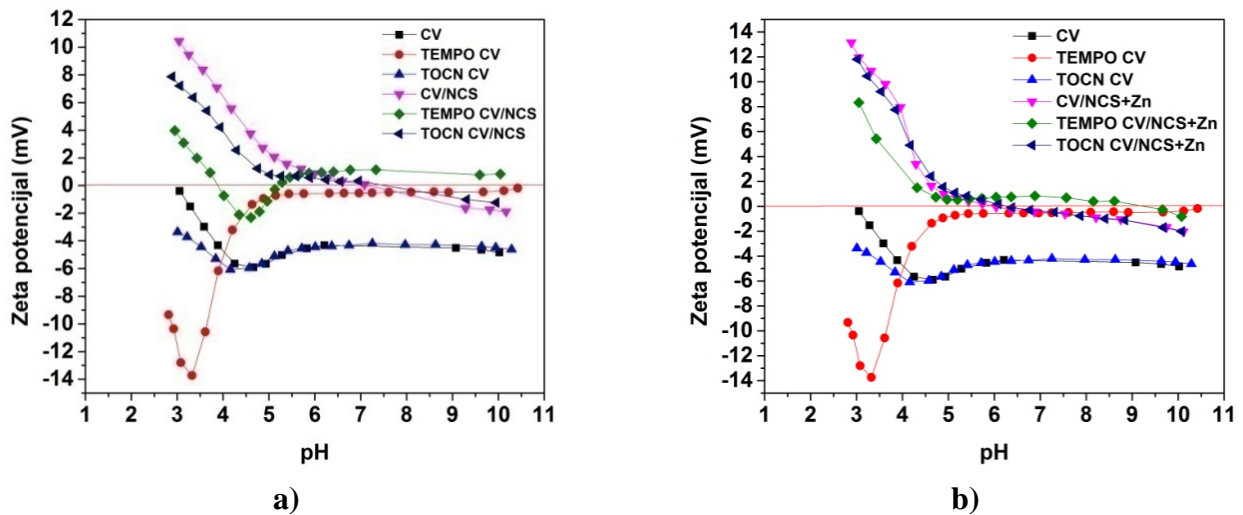
Sadržaj hitozana i cinka u viskoznim tkaninama nakon funkcionalizacije sa NCS/NCS+Zn su kvantifikovani (Tabela 19.). U poređenju sa nemodifikovanom, pred-tretirane viskozne tkanine su vezale veći sadržaj hitozana (2,74, 1,47, 1,65 i 1,59 puta za TEMPO CV/NCS, TOCN CV/NCS, TEMPO CV/NCS+Zn i TOCN CV/NCS+Zn, respektivno) usled povećanog sadržaja funkcionalnih grupa. Posledično, u poređenju sa nemodifikovanom, u pred-tretiranim viskoznim tkaninama nakon funkcionalizacije sa NCS+Zn je prisutan i povećan sadržaj cinka (1,83 i 1,10 puta za TEMPO CV/NCS+Zn i TOCN CV/NCS+Zn, respektivno). Na osnovu činjenice da je odnos sadržaj cinka/sadržaj hitozana različit za sve NCS+Zn funkcionalizovane tkanine može biti zaključeno da ukupan sadržaj cinka u tkaninama ne potiče samo od cinka iz NCS+Zn, već se određena količina disosovanih jona cinka iz NCS+Zn disperzije vezuje direktno na viskozne tkanine tokom procesa funkcionalizacije.

Tabela 19. Sadržaj hitozana i cinka posle funkcionalizacije viskoznih tkanina sa NCS/NCS+Zn

Uzorak	CS, g/100 g cel	Zn, g/100 g cel
CV/NCS	0,43	
TEMPO CV/NCS	1,18	
TOCN CV/NCS	0,63	
CV/NCS+Zn	0,63	1,86
TEMPO CV/NCS+Zn	1,04	3,40
TOCN CV/NCS+Zn	1,00	2,05

Promene u hemijskom sastavu i hemiji površine viskoznih tkanina funkcionalizovanih NCS/NCS+Zn utiču i na površinsko naelektrisanje odnosno njihova elektrokinetička svojstva. Nakon funkcionalizacije nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina sa NCS/NCS+Zn njihove IET su pomerene na više pH vrednosti, a cele krive zavisnosti zeta potencijala od pH su pomerene ka višim vrednostima (Slika 60.). U području alkalnog pH više vrednosti zeta potencijala funkcionalizovanih tkanina ukazuju na manji broj slobodnih karboksilnih grupa usled depozicije NCS/NCS+Zn i jona cinka (u slučaju NCS+Zn funkcionalizovanih uzoraka) na površini vlakana/tkanine. U regionu alkalnog pH protonizacija amino grupa hitozana je potisnuta (IET hitozana je oko 6,8³²⁶) pa je dobijeni negativan zeta potencijal za nemodifikovanu i TOCN naslojenu viskoznu tkaninu nakon funkcionalizacije sa NCS/NCS+Zn bio očekivan. Međutim, za TEMPO oksidisanu viskoznu tkaninu funkcionalizovanu sa NCS/NCS+Zn su dobijene blago pozitivne vrednosti zeta potencijala u regionu

alkalnog pH. Ova inverzija naelektrisanja je verovatno povezana sa adsorbovanim jonima natrijuma³²⁷ u slučaju TEMPO CV/NCS i dodatno jonima cinka u slučaju TEMPO CV/NCS+Zn. Joni natrijuma su prisutni u NCS/NCS+Zn disperzijama i verovatno su se adsorbovali na TEMPO CV tokom procesa funkcionalizacije. Pored toga, oni su takođe prisutni i kao kontrajoni karboksilnih grupa u TEMPO CV. Na nižim pH vrednostima površine funkcionalizovanih tkanina su pozitivno naelektrisane zbog potisnute disocijacije slobodnih kiselih grupa celuloze i izražene protonizacije amino grupa hitozana.

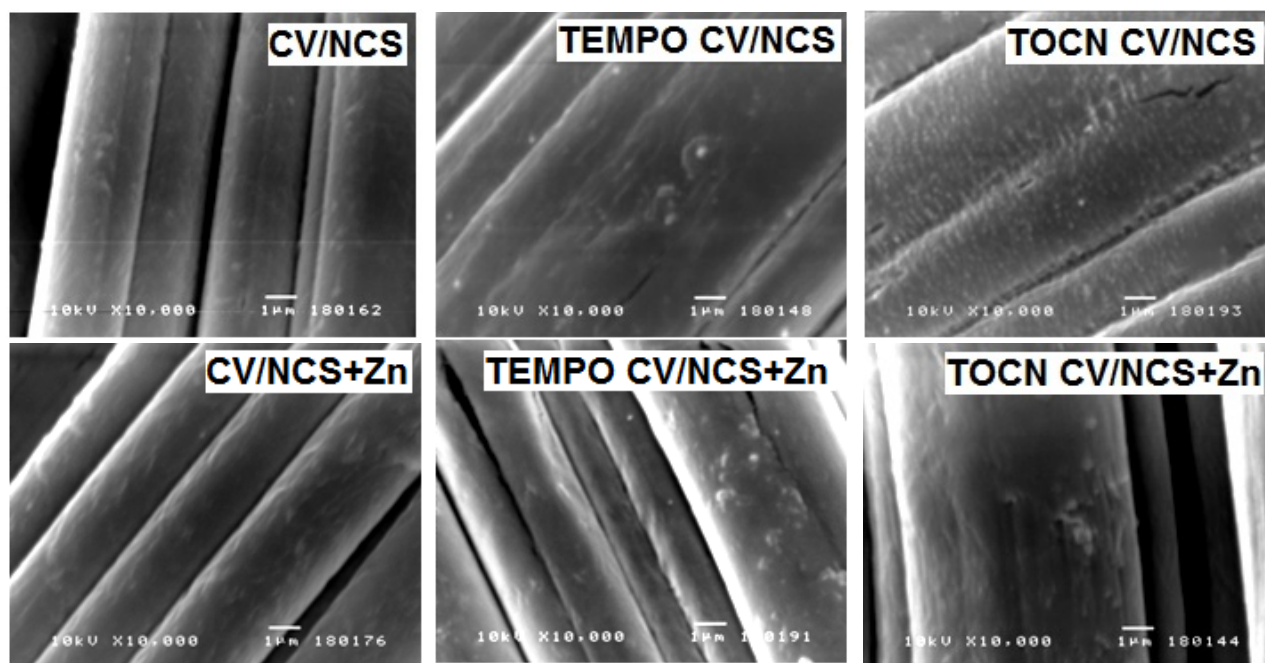


Slika 60. Zeta potencijal nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina pre i posle funkcionalizacije sa NCS (a) i NCS+Zn (b)

U čitavom opsegu pH NCS+Zn funkcionalizovane tkanine pokazuju viši zeta potencijal u poređenju sa NCS funkcionalizovanim tkaninama, usled prisustva jona cinka na površini tkanina i činjenice da joni cinka povećavaju gustinu pozitivnog naelektrisanja NCS, pomak IET od 8,02 za NCS na 8,86 za NCS+Zn (Slika 55.) je potvrdio da helacija cinka sa hitozanom povećava pozitivno naelektrisanje NCS.

9.3.3. Morfološke karakteristike viskoznih tkanina funkcionalizovanih NCS sa i bez inkorporiranih jona cinka

Morfologija površina vlakana/tkanina nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina posle funkcionalizacije sa NCS/NCS+Zn je prikazana na Slici 61. Sa jasno se može uočiti da veličina NCS/NCS+Zn na funkcionalizovanim viskoznim tkaninama iznosi oko 200 nm, kao i uticaj hemije površine i topografije nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina na stepen adsorpcije NCS/NCS+Zn. SEM fotografije su potvrdile da površine pred-tretiranih viskoznih tkanina diktiraju efikasniju adsorpciju NCS/NCS+Zn, pri čemu TEMPO oksidisana viskozna vlakna usled strukturnih oštećenja u formi pukotina (Slika 44.) predstavljaju najefikasniju površinu za vezivanje NCS/NCS+Zn (Tabela 19.).

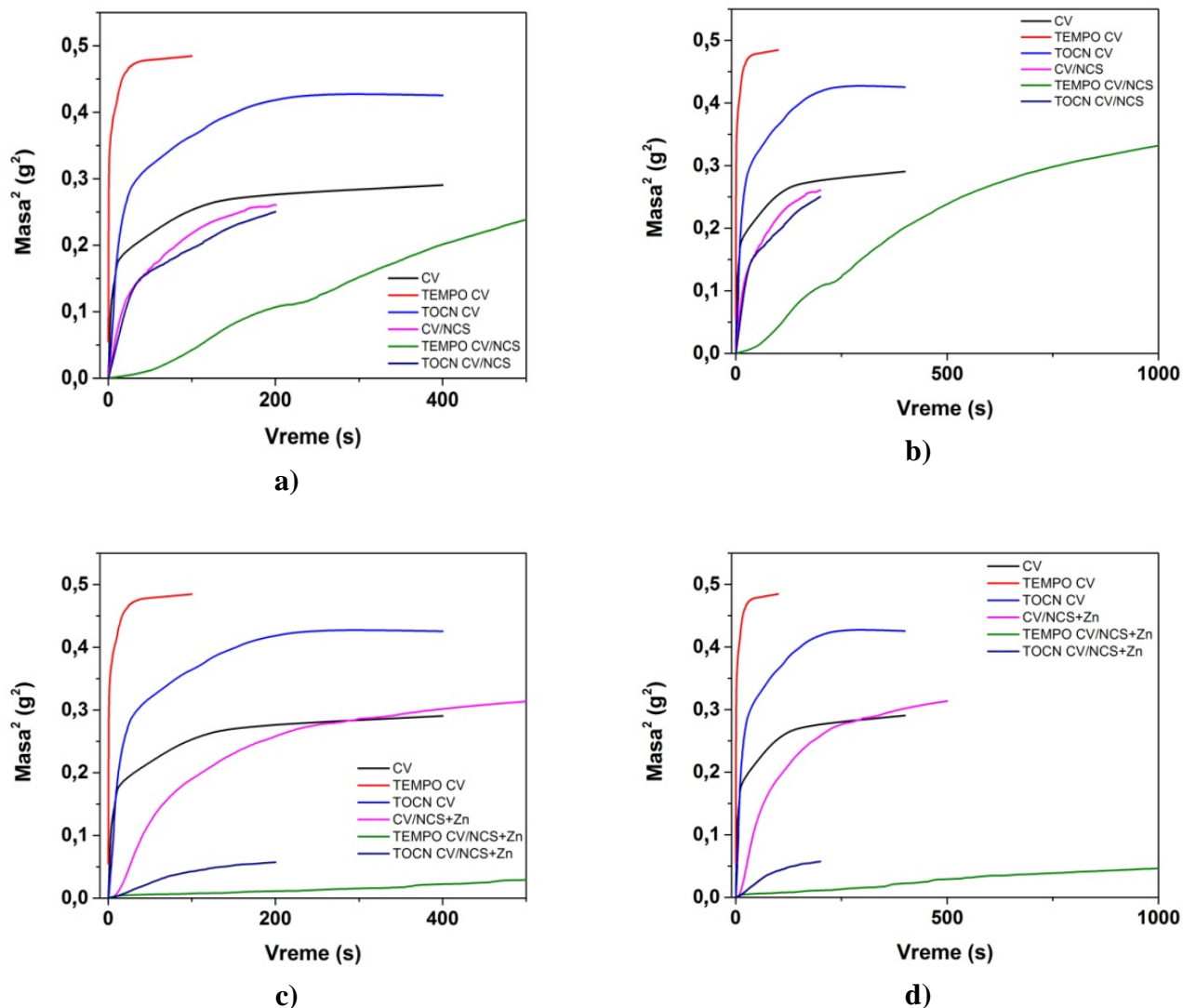


Slika 61. SEM fotografije nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina posle funkcionalizacije sa NCS i NCS+Zn

9.3.4. Sorpciona i mehanička svojstva viskoznih tkanina funkcionalizovanih NCS sa i bez inkorporiranih jona cinka

Brzina apsorpcije, kapacitet sorpcije, ugao kvašenja i sadržaj vlage nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina određeni su i nakon njihove funkcionalizacije kako sa NCS tako i sa NCS+Zn.

Na Slici 62. predstavljene su krive kvašenja za nemodifikovanu i pred-tretirane viskozne tkanine pre i posle funkcionalizacije sa NCS/NCS+Zn. Nakon funkcionalizacije sa NCS/NCS+Zn smanjenja je brzina apsorpcije nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina. Funkcionalizacije sa NCS/NCS+Zn verovatno su uticale na smanjenje razvijenosti sistema kapilara tkanina i smanjenje poroznosti vlakana usled adsorpcije nanočestica na njihovu površinu. Najdrastičnije smanjenje brzine apsorpcije uočeno je za TEMPO oksidisanu viskoznu tkaninu. Činjenica da TEMPO oksidisana viskozna vlakna na površini imaju oštećenja u formi pukotina koja predstavljaju pogodna mesta za poboljšanu sorpciju NCS/NCS+Zn (Slika 44. (b)) pri čemu se smanjuje njihova površinska poroznost verovatno je, pored smanjenja razvijenosti sistema kapilara, značajno uticala na smanjenje brzine apsorpcije TEMPO oksidisane viskozne tkanine nakon funkcionalizacija sa NCS/NCS+Zn.



Slika 62. Krive kvašenja za nemodifikovanu i pred-tretirane viskozne tkanine pre i posle funkcionalizacija sa NCS i NCS+Zn nakon 500 s (a, c) i 1000 s (b, d)

Kapacitet sorpcije nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina generalno se smanjio nakon funkcionalizacija sa NCS/NCS+Zn (Tabela 20.) što može biti objašnjeno deponovanjem nanočestica u pore/pukotine, ali i na površinu vlakana što je smanjilo mogućnost penetracije molekula tečnosti u amorfnu područja vlakana. Nakon funkcionalizacije sa NCS kapacitet sorpcije smanjio se: 3,85% za nemodifikovanu, 12,31% za TEMPO oksidisanu i 21,88% za TOCN naslojenu viskoznu tkaninu, a nakon funkcionalizacije sa NCS+Zn kapacitet sorpcije smanjio se: 1,93% za nemodifikovanu, 67,70% za TEMPO oksidisanu i 64,07% za TOCN naslojenu viskoznu tkaninu.

Funkcionalizacije sa NCS/NCS+Zn nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina, takođe, su se odrazile i na vreme potrebno za uspostavljanje stanja ravnoteže prilikom sorpcije tečnosti (Slika 62.). Nakon funkcionalizacija sa NCS/NCS+Zn ravnotežno stanje uspostavilo se sporije, kako za nemodifikovanu, tako i za pred-tretirane viskozne tkanine. U slučaju funkcionalizacije sa NCS: 46 s sporije za nemodifikovanu, 10 s sporije za TOCN naslojenu, a preko 1000 s sporije za TEMPO

oksidisanu viskoznu tkaninu, a u slučaju funkcionalizacije sa NCS+Zn: 218 s sporije za nemodifikovanu, 4 s sporije za TOCN naslojenu, a preko 1000 s sporije za TEMPO oksidisanu viskoznu tkaninu.

Tabela 20. Količina sorbovane tečnosti u ravnotežnom stanju, ugao kvašenja, sadržaj vlage, i prekidna sila viskoznih tkanina funkcionalizovanih NCS sa i bez inkorporiranih jona cinka

Uzorak	Količina sorbovane tečnosti, g tečnosti/g tkanine	Ugao kvašenja, °	Sadržaj vlage, %	Prekidna sila, N	
				osnova	potka
CV/NCS	0,50±0,02	37±9,53	8,95±0,43	217±3,44	170±2,32
TEMPO CV/NCS	0,57±0,05	83±1,48	10,20±0,17	191±3,47	137±2,31
TOCN CV/NCS	0,50±0,02	23±9,27	9,65±0,38	243±5,02	201±7,22
CV/NCS+Zn	0,51±0,05	61±8,67	9,15±0,42	205±3,11	171±2,36
TEMPO CV/NCS+Zn	0,21±0,07	89±0,34	9,63±0,40	178±4,45	139±4,51
TOCN CV/NCS+Zn	0,23±0,04	83±2,51	9,85±0,15	235±2,47	160±5,62

Nakon funkcionalizacija sa NCS/NCS+Zn, ugao kvašenja za nemodifikovanu i TOCN naslojenu viskoznu tkaninu se smanjio, a za TEMPO oksidisanu viskoznu tkaninu se povećao. Vrednosti uglova kvašenja za nemodifikovanu i pred-tretirane viskozne tkanine posle funkcionalizacije sa NCS/NCS+Zn prikazane su u Tabeli 20. Smanjenje ugla kvašenja za nemodifikovanu i TOCN naslojenu viskoznu tkaninu ukazuje na povećanje hidrofилnosti usled prisustva NCS/NCS+Zn na njihovoj površini, što je i očekivano s obzirom da je poznato da je hitozan izuzetno hidrofilan molekul (Tabela 17.). Međutim, u slučaju TEMPO oksidisanu viskoznu tkaninu došlo je do povećanja ugla kvašenja odnosno smanjenja hidrofилnosti usled prisustva NCS/NCS+Zn na njenoj površini, kao što je to bio slučaj i pri funkcionalizaciji TEMPO oksidisanu viskoznu tkaninu CS (Tabela 17.). Poslednje može biti objašnjeno time da su uspostavljene interakcije između TEMPO oksidisanu viskoznu tkaninu i NCS/NCS+Zn istovremeno smanjile broj slobodnih hidrofилnih grupa kako TEMPO oksidisanu viskoznu tkaninu tako i NCS/NCS+Zn.

Rezultati prikazani u Tabeli 20. ukazuju da se sadržaj vlage nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina nakon funkcionalizacije sa NCS/NCS+Zn nije značajno promenio, kao što je bio slučaj i nakon funkcionalizacije sa CS (Tabela 17.).

Funkcionalizacije nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina sa NCS i NCS+Zn na kiselom pH, kao i u slučaju funkcionalizacije CS, dovele su do pogoršanja njihovih mehaničkih svojstava (Tabela 20.). Smanjenje prekidne sile svih uzoraka nakon funkcionalizacije sa NCS/NCS+Zn može biti objašnjeno hidrolizom β -1,4-glikozidne veze celuloze za koju je poznato da se dešava u uslovima kiselog pH¹⁷. Najmanje smanjenje prekidne sile u pracu osnove zabeleženo je za viskoznu tkaninu funkcionalizovanu sa NCS, nešto veće za viskoznu tkaninu funkcionalizovanu sa CS i najveće za viskoznu tkaninu funkcionalizovanu sa NCS+Zn.

9.3.5. Antibakterijska svojstva viskoznih tkanina funkcionalizovanih NCS sa i bez inkorporiranih jona cinka

Bakterijska redukcija NCS i NCS+Zn funkcionalizovanih viskoznih tkanina određena je prema Gram-pozitivnoj (*S.aureus*) i Gram-negativnoj (*E.coli*) bakteriji. Iz rezultata prikazanih u Tabeli 21. može se videti maksimalna bakterijska redukcija *S.aureus* i *E.coli* od strane svih funkcionalizovanih tkanina. Izuzetak od ovog trenda evidentiran je za CV/NCS tj. tkaninu sa najnižim sadržajem hitozana, koja je ostvarila nešto nižu bakterijsku redukciju *E.coli*. Bolja bakterijska redukcija *S.aureus* u odnosu na *E.coli* od strane CV/NCS može biti objašnjena kompleksnijom strukturom ćelije bakterije *E.coli* tj. prisustvom spoljašnje membrane u *E.coli*, koja deluje kao barijera prema spoljašnjim uticajima²⁶³, što je ranije detaljno objašnjeno. Upoređivanjem bakterijske redukcije *E.coli* od strane CV/NCS i CV/NCS+Zn može se zaključiti da povećanje pozitivnog naelektrisanja NCS+Zn funkcionalizovanih tkanina usled dodatka jona cinka (Slika 60.) dovodi do intenzivnijih elektrostatičkih interakcija između NCS+Zn funkcionalizovanih tkanina, u odnosu na NCS funkcionalizovane tkanine, i negativno naelektrisanih komponenta ćelijskog zida bakterija, a time i inhibicije ćelijskog rasta bakterija.

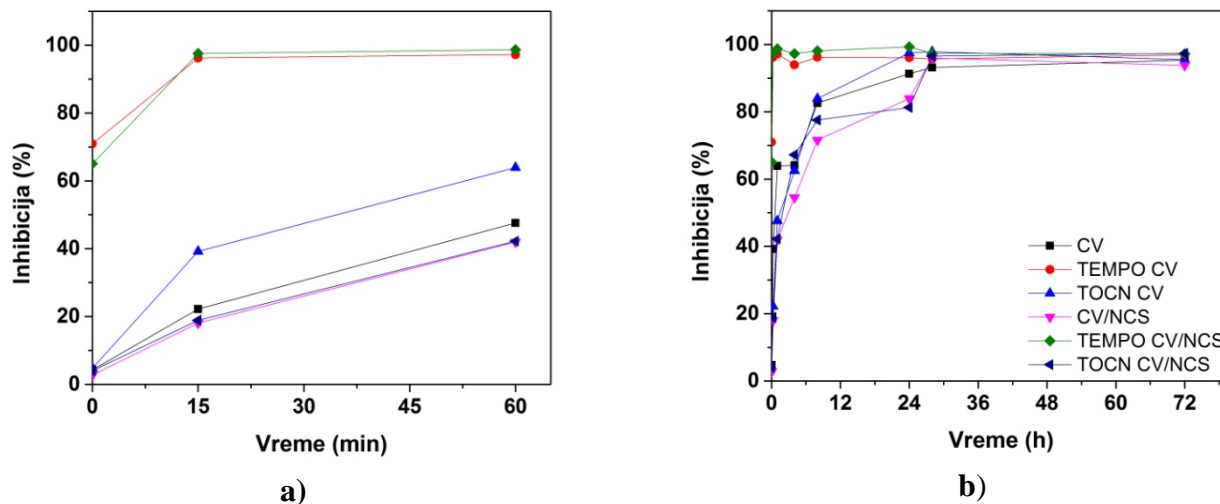
Tabela 21. Redukcija bakterija sa viskoznim tkaninama funkcionalizovanim sa NCS/NCS+Zn

Uzorak	Redukcija bakterija, %	
	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>
CV/NCS	99,9	98,83
TEMPO CV/NCS	99,9	99,9
TOCN CV/NCS	99,9	99,9
CV/NCS+Zn	99,9	99,9
TEMPO CV/NCS+Zn	99,9	99,9
TOCN CV/NCS+Zn	99,9	99,9

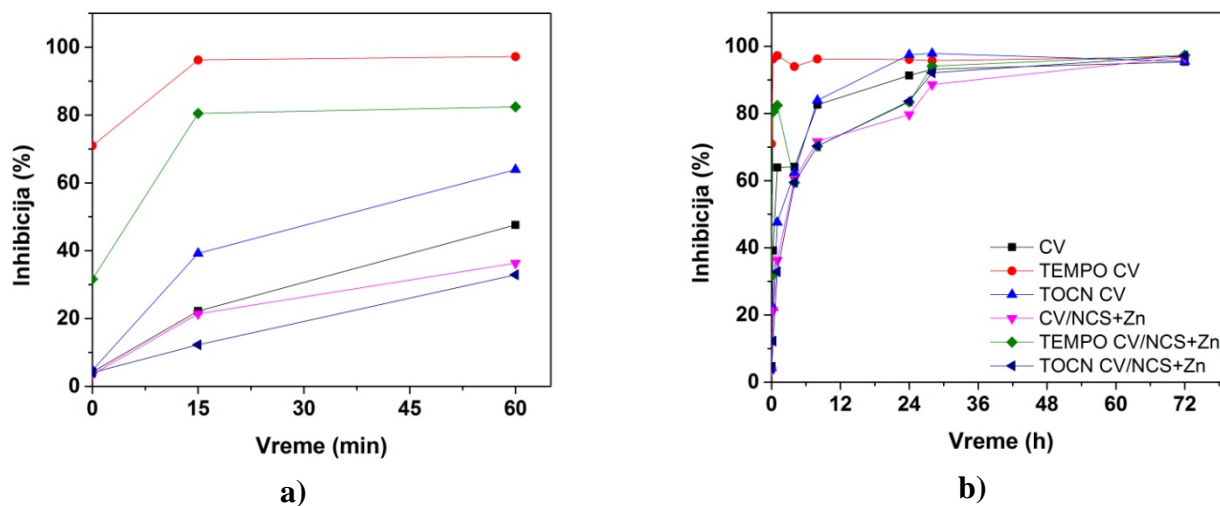
9.3.6. Antioksidativna svojstva viskoznih tkanina funkcionalizovanih NCS sa i bez inkorporiranih jona cinka

Rezultati antioksidativne aktivnosti nemođifikovane i pred-tretiranih tkanina pre i posle funkcionalizacije sa NCS/NCS+Zn prikazani su na Slikama 63. i 64. Nakon 24 h dostignut je maksimum inhibicije ABTS radikala za sve ispitivane tkanine, u intervalu od 90% do 99% (Slika 63. (b) i 64 (b)). Kao što je već rečeno, hitozan redukuje slobodne radikale doniranjem vodonika iz hidroksilnih i amino grupa^{328, 329}. Međutim, sve tkanine nakon funkcionalizacije sa NCS/NCS+Zn, kao i u slučaju funkcionalizacije sa CS, pokazale su nešto nižu inhibiciju (Slika 63. i 64.) što može biti objašnjeno uspostavljenim interakcijama između vodonik/natrijum donirajućih grupa viskoznih tkanina i NCS/NCS+Zn tokom funkcionalizacije. U poređenju sa NCS funkcionalizovanim, NCS+Zn funkcionalizovane viskozne tkanine su pokazale nižu inhibiciju ABTS radikala. S obzirom da cink poseduje antioksidativna svojstva²¹⁴, ovakav trend je verovatno posledica dva istovremena efekta: 1) uspostavljene interakcije cinka sa NCS i viskozom su onemogućile njegovu antioksidativnu aktivnost i 2) uspostavljene interakcije cinka sa NCS i viskozom su smanjile količinu njihovih vodonik/natrijum donirajućih grupa odgovornih za redukciju ABTS radikala. Kako u slučaju NCS tako i u slučaju

NCS+Zn funkcionalizovanih viskoznih tkanina generalno je postignuta niža inhibicija ABTS radikala u odnosu na CS funkcionalizovane viskozne tkanine.



Slika 63. Antioksidativna aktivnost nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina pre i posle funkcionalizacije sa NCS tokom 1 h (a) i 72 h (b); legenda je ista za obe slike



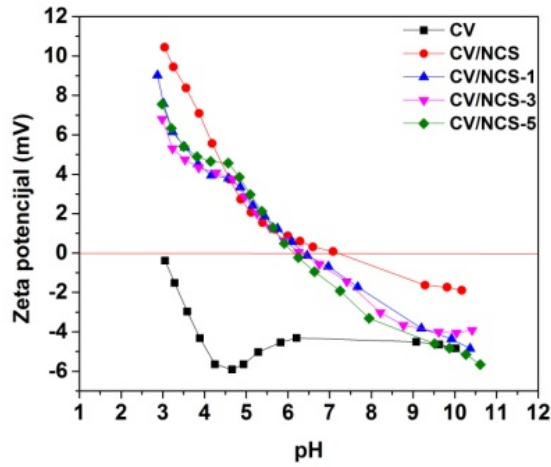
Slika 64. Antioksidativna aktivnost nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina pre i posle funkcionalizacije sa NCS+Zn tokom 1 h (a) i 72 h (b); legenda je ista za obe slike

9.3.7. Postojanost na pranje viskoznih tkanina funkcionalizovanih NCS sa i bez inkorporiranih jona cinka

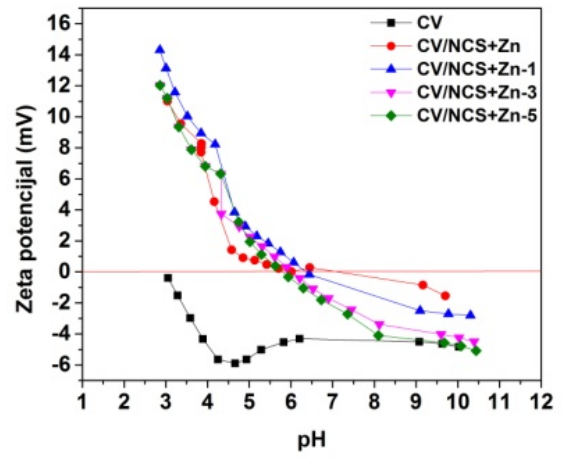
Postojanost na pranje viskoznih tkanina funkcionalizovanih sa NCS/NCS+Zn praćena je kroz promene u njihovim elektrokinetičkim svojstvima površine, sadržaju hitozana, sadržaju cinka, antibakterijskim i antioksidativnim svojstvima nakon višestrukih ciklusa pranja tj. 1, 3 i 5 ciklusa pranja.

Slika 65. pokazuje promene u elektrokinetičkim svojstvima nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina funkcionalizovanih sa NCS/NCS+Zn pre i posle više ciklusa pranja. Za sve uzorke, nakon svakog ciklusa pranja IET su pomerene na niže pH vrednosti ukazujući na otpuštanje reverzibilno vezanog NCS/NCS+Zn i jona cinka (za NCS+Zn funkcionalizovane uzorke) tokom pranja. Upoređujući krive zavisnosti zeta potencijala od pH nemodifikovanih i pred-tretiranih viskoznih tkanina pre funkcionalizacije i funkcionalizovanih tkanina nakon 5 ciklusa pranja, jasno je da su NCS/NCS+Zn i joni cinka (za NCS+Zn funkcionalizovane uzorke) još uvek prisutni na površini tkanina.

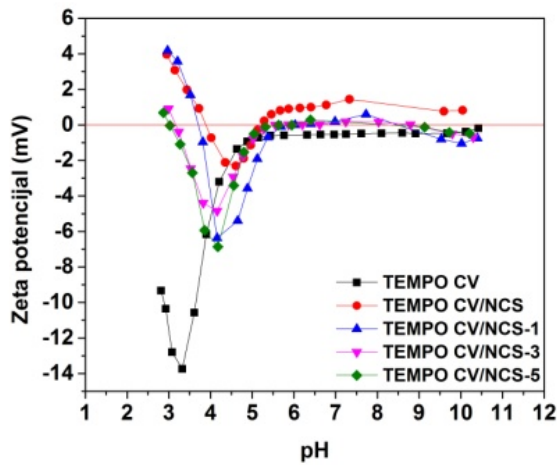
Za sve uzorke, nakon svakog ciklusa pranja krive zavisnosti zeta potencijala od pH su se fazno pomerile ka nižem pH, tj. pokazujući niže IET, što ukazuje na oslobađanje reverzibilno vezanih NCS i molekula CS tokom pranja. Upoređujući krive zavisnosti zeta potencijala od pH nemodifikovanih i pred-tretiranih viskoznih tkanina pre funkcionalizacije sa NCS i tkanina funkcionalizovanih sa NCS nakon 5 ciklusa pranja, jasno je da su NCS još uvek prisutne na površini tkanina.



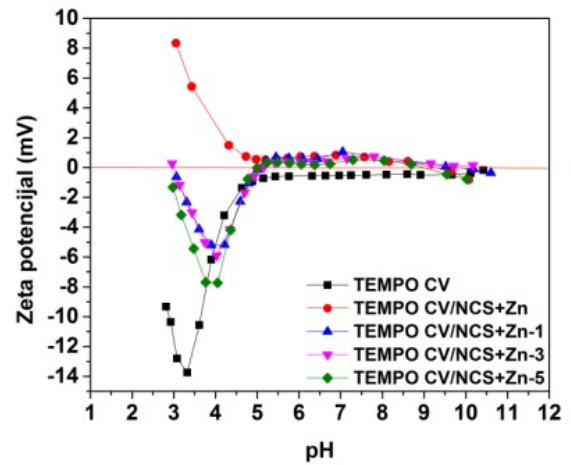
a)



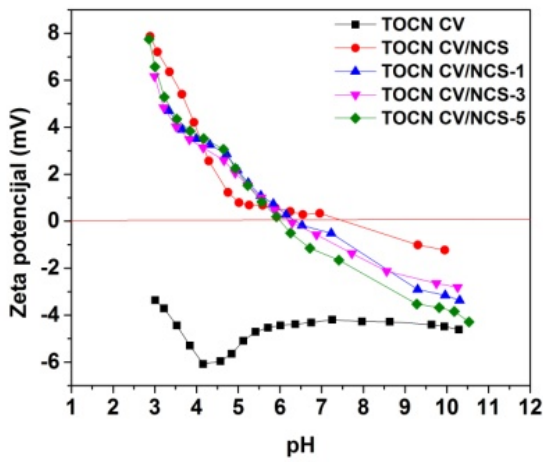
d)



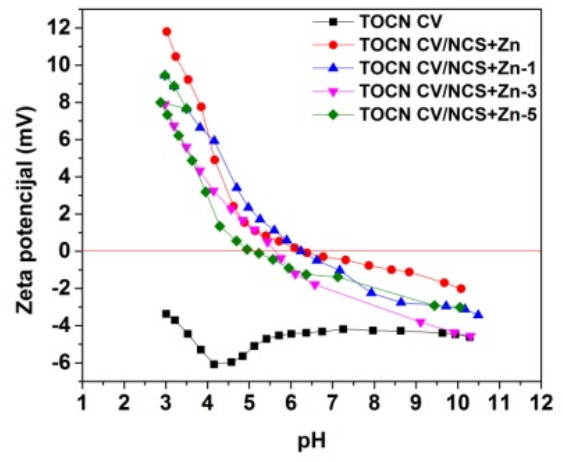
b)



e)



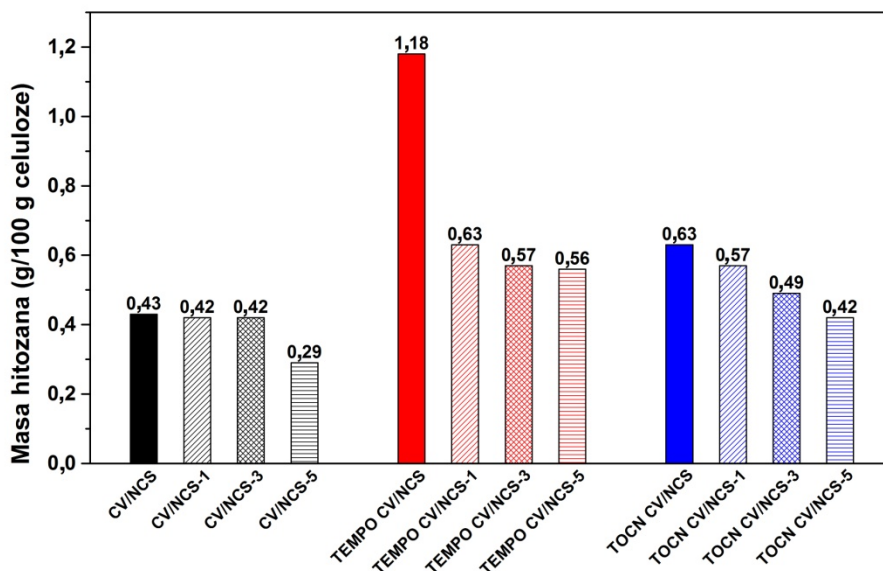
c)



f)

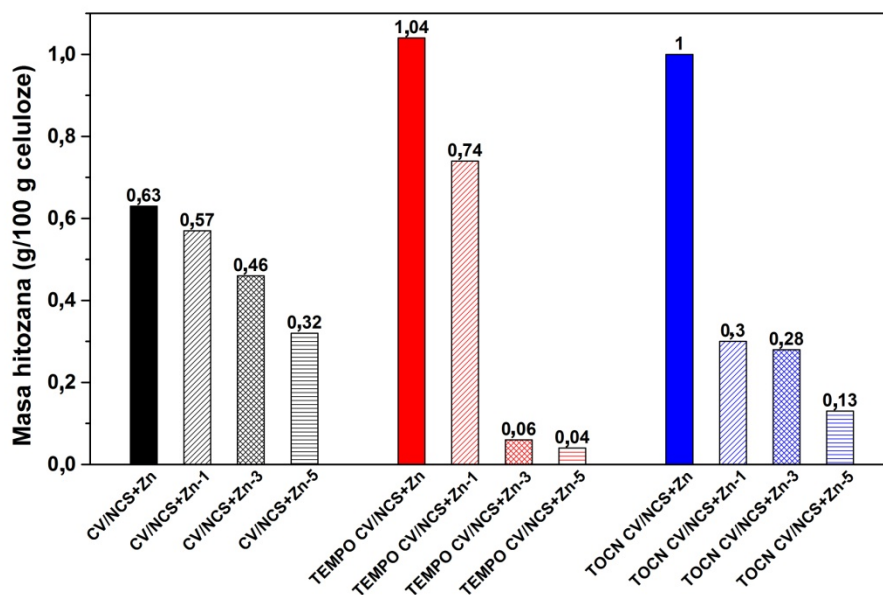
Slika 65. Zeta potencial nemodifikovanih i pred-tretiranih viskoznih tkanina funkcionalizovanih sa NCS (a-c) i NCS+Zn (d-f) pre i posle 1, 3 i 5 ciklusa pranja

Sadržaj hitozana u NCS funkcionalizovanim uzorcima određen nakon 1, 3 i 5 ciklusa pranja prikazan je na Slici 66. Nakon 1 ciklusa pranja zabeleženo je smanjenje u sadržaju hitozana od oko 2% za CV/NCS, 47% za TEMPO CV/NCS i 10% za TOCN CV/NCS. Dodatno smanjenje zabeleženo je i nakon 3 ciklusa pranja za TEMPO CV/NCS (oko 10%) i TOCN CV/NCS (oko 14%), dok za CV/NCS sadržaj hitozana nije promenjen. Nakon 5 ciklusa pranja, dodatno smanjenje u sadržaju hitozana se nastavilo: oko 31% za CV/NCS, 2% za TEMPO CV/NCS i 14% za TOCN CV/NCS. Nakon 5 ciklusa pranja CV/NCS i TOCN CV/NCS su pokazali sličnu postojanost na pranje sa ukupnim smanjenjem u sadržaju hitozana od oko 33%, pri čemu je TOCN CV/NCS pokazao veći sadržaj hitozana (0,42 g/100 g celuloze) u odnosu na CV/NCS (0,29 g/100 g celuloze). TEMPO CV/NCS je pokazao slabiju postojanost na pranje sa ukupnim smanjenjem u sadržaju hitozana od oko 53%, ali i najveći sadržaj hitozana (0,56 g/100 g celuloze) nakon 5 ciklusa pranja.

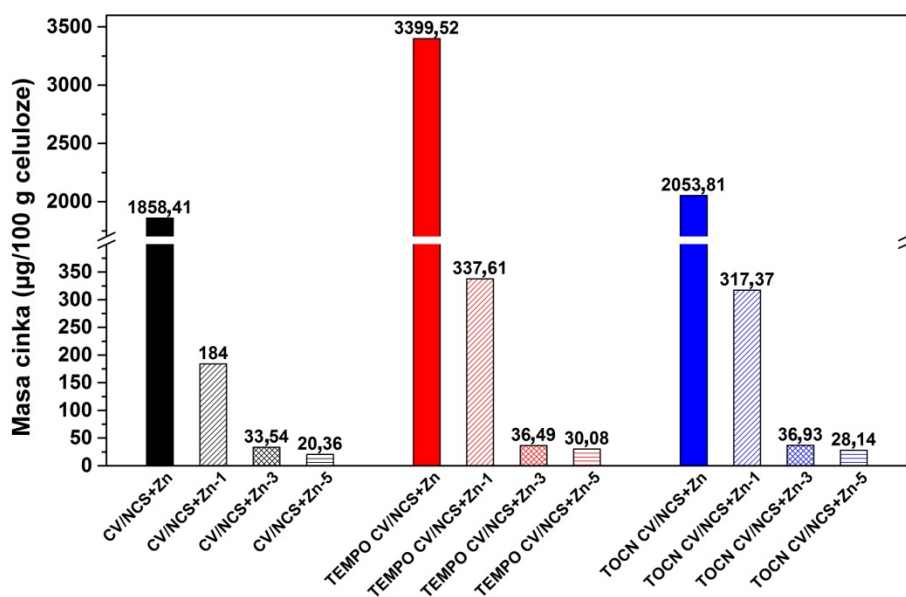


Slika 66. Sadržaj hitozana u NCS funkcionalizovanim viskoznim tkaninama nakon 1, 3 i 5 ciklusa pranja

Sa Slike 67. može se videti da se sadržaj hitozana i cinka u NCS+Zn funkcionalizovanim tkaninama određen nakon 1, 3 i 5 ciklusa pranja smanjuje. Smanjenje u sadržaju hitozana (Slika 67. (a)) nakon 1 ciklusa pranja bilo je oko 10% za CV/NCS+Zn, 29% za TEMPO CV/NCS+Zn i 70% za TOCN CV/NCS+Zn. Dodatno smanjenje u sadržaju hitozana nastavilo se i nakon 3 ciklusa pranja za sve uzorke, pri čemu je najizraženije (oko 92%) bilo za TEMPO CV/NCS+Zn. Nakon 5 ciklusa pranja najmanje dodatno smanjenje u sadržaju hitozana od oko 30% zabeleženo je za CV/NCS+Zn koji je pokazao najbolju postojanost na pranje sa ukupnim smanjenjem u sadržaju hitozana od oko 49% i istovremeno najvećim sadržajem hitozana (0,32 g/100 g celuloze). TOCN CV/NCS+Zn je pokazao slabiju postojanost na pranje sa ukupnim smanjenjem u sadržaju hitozana od oko 87% i niži sadržaj hitozana (0,13 g/100 g celuloze). TEMPO CV/NCS+Zn je pokazao najslabiju postojanost na pranje sa ukupnim smanjenjem u sadržaju hitozana od oko 96% i najniži sadržaj hitozana (0,04 g/100 g celuloze).



a)



b)

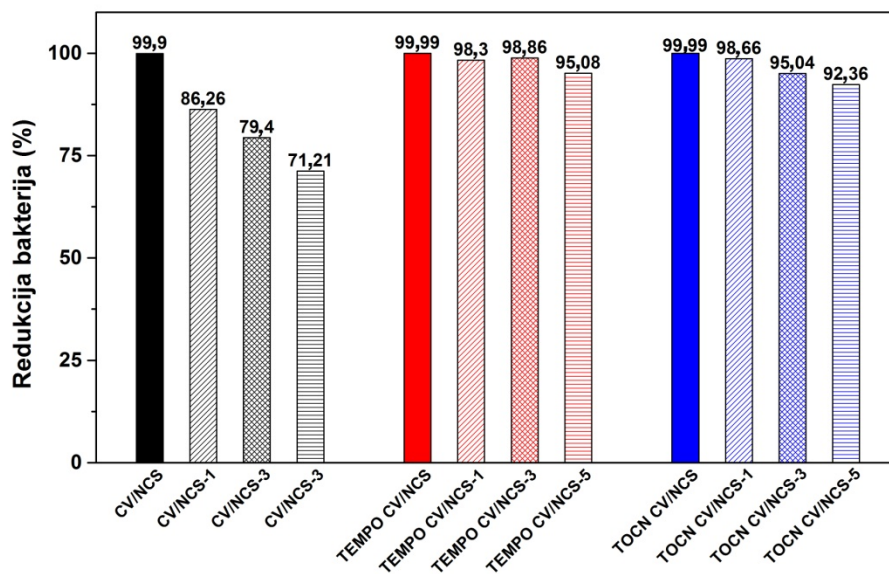
Slika 67. Sadržaj hitozana (a) i cinka (b) u NCS+Zn funkcionalizovanim viskoznim tkaninama nakon 1, 3 i 5 ciklusa pranja

Najveće smanjenje u sadržaju cinka (Slika 67. (b)) je zabeležno nakon 1 ciklusa pranja (oko 90% za CV/NCS+Zn, 90% za TEMPO CV/NCS+Zn i 85% za TOCN CV/NCS+Zn). Dodatno smanjenje u sadržaju cinka se nastavilo nakon 3 ciklusa pranja: oko 82% za CV/NCS+Zn, 89% za TEMPO CV/NCS+Zn i 88% za TOCN CV/NCS+Zn, kao nakon i 5 ciklusa pranja: oko 39% za CV/NCS+Zn, 17% za TEMPO CV/NCS+Zn i 24% za TOCN CV/NCS+Zn. Razlika u ukupnom smanjenju za sadržaj cinka i sadržaj hitozana nakon 5 ciklusa pranja za sve NCS+Zn funkcionalizovane tkanine: CV/NCS+Zn (oko 99% i 49%, respektivno), TEMPO CV/NCS+Zn (oko 99% i 96%, respektivno) i TOCN CV/NCS+Zn (oko 99% i 87%, respektivno) je potvrdila da se određena količina disosovanih

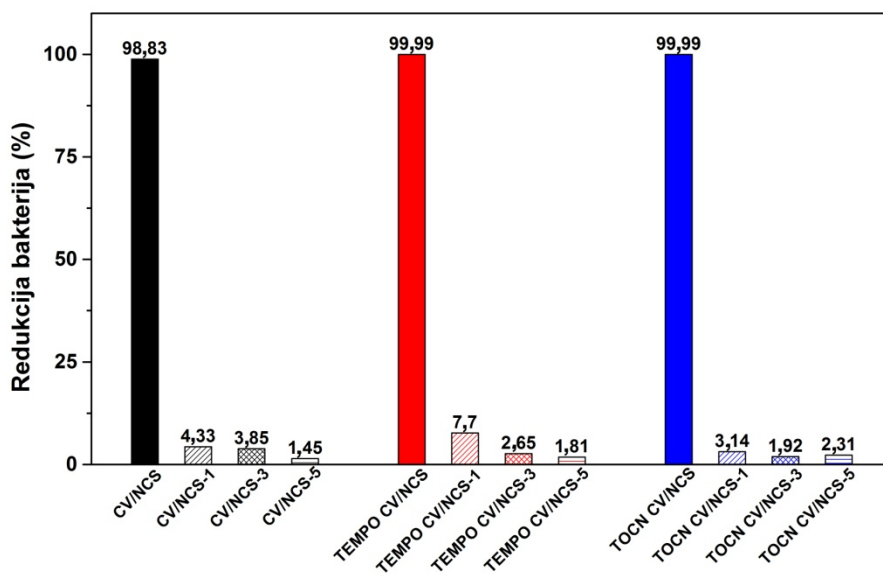
jona cinka, prisutnih u NCS+Zn disperziji, vezala direktno za tkanine tokom postupka funkcionalizacije.

Smanjenje sadržaja hitozana za NCS i NCS+Zn funkcionalizovane viskozne tkanine može se objasniti činjenicom da je određena količina NCS/NCS+Zn i jona cinka reverzibilno vezana na površini viskoze. U poređenju sa NCS, za NCS+Zn funkcionalizovane tkanine zabeleženo je generalno veće smanjenje sadržaja hitozana, verovatno usled manje količine dostupnih slobodnih amino grupa hitozana odgovornih za ireverzibilno vezivanje NCS+Zn i viskoze elektrostatskim privlačenjem i formiranjem *Schiff*-ove baze. Naime, za razliku od NCS, u NCS+Zn određena količina dostupnih slobodnih amino grupa hitozana helirana je jonima cinka. U poređenju sa CS funkcionalizovanim, NCS i NCS+Zn funkcionalizovane viskozne tkanine su generalno pokazale slabiju postojanost na pranje, odnosno veće smanjenje u sadržaju hitozana, što se može objasniti manjom količinom dostupnih slobodnih amino grupa za ireverzibilno vezivanje. Naime, za razliku od hitozana u masi, kod hitozana u formi NCS izvesna količina amino grupa ostvaruje interakcije među pojedinačnim molekulima hitozana, a u formi NCS+Zn dodatno i sa jonima cinka.

Nakon funkcionalizacije sa NCS, nemodifikovana viskozna tkanina ostvarila je efikasnu antibakterijsku aktivnost prema *S.aureus* do 3 ciklusa pranja, dok su pred-tretirane viskozne tkanine očuvale antibakterijsku aktivnost čak i posle 5 ciklusa pranja (Slika 68. (a)). U slučaju *E.coli* ovaj efekat je postojao samo pre pranja, za sve NCS funkcionalizovane tkanine (Slika 68. (b)). U poređenju sa NCS, NCS+Zn funkcionalizovane viskozne tkanine su pokazale antibakterijsku aktivnost postojaniju na pranje: prema *S.aureus* za nemodifikovanu, i prema *E.coli* za pred-tretirane viskozne tkanine (Slike 68. i 69.). NCS+Zn funkcionalizovane viskozne tkanine su pokazale antibakterijsku aktivnost prema *S.aureus* do 5 ciklusa pranja, a u slučaju *E.coli* do 1 ciklusa pranja (Slika 69.). Poredeći rezultate dobijene za nemodifikovanu i pred-tretirane viskozne tkanine funkcionalizovane bilo sa NCS ili NCS+Zn, očigledno je da su pred-tretirane tkanine pokazale efikasniju i postojaniju antibakterijsku aktivnost pri čemu je TEMPO oksidisana viskoza pokazala najefikasniju i najpostojaniju antibakterijsku aktivnost prema oba tipa bakterija. U poređenju sa CS funkcionalizovanim tkaninama, funkcionalizacija sa NCS pokazala se efikasnijom, dok je funkcionalizacija sa NCS+Zn dovela do značajnijeg poboljšanja antibakterijskih svojstava i njihove postojanosti na pranje. U odnosu na CV/CS, CV/NCS+Zn se karakteriše boljom postojanošću antibakterijske aktivnosti na pranje koja je u slučaju *S.aureus* produžena sa 3 na 5 ciklusa pranja, dok je u odnosu na TOCN CV/CS, za TOCN CV/NCS+Zn antibakterijsku aktivnost produžena prema *E.coli* sa 1 na 3 ciklusa pranja. Ista postojanost antibakterijske aktivnosti na pranje prema *S.aureus* (5 ciklusa) postignuta je sa TEMPO CV/CS i TEMPO CV/NCS+Zn, dok je prema *E.coli* smanjena sa 3 na 1 ciklus pranja za TEMPO CV/CS i TEMPO CV/NCS+Zn, respektivno.

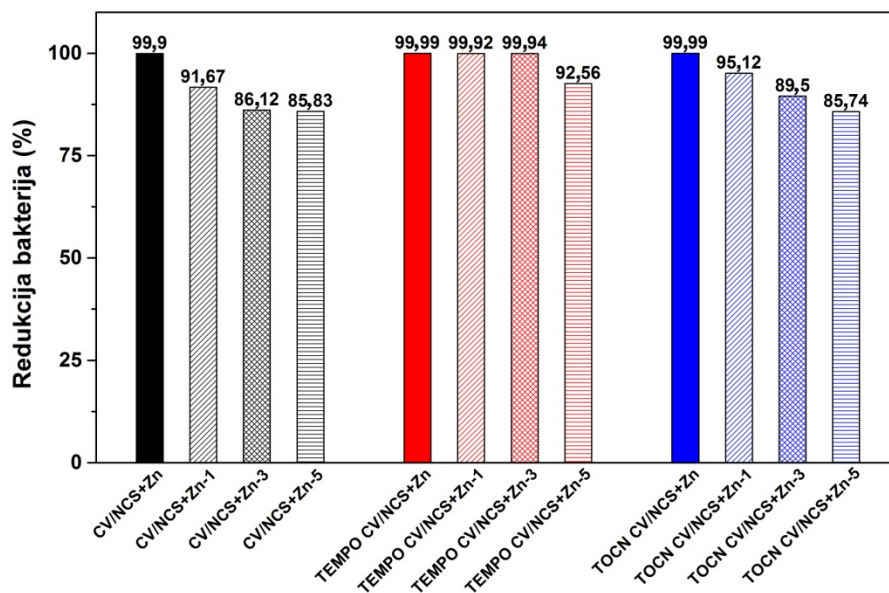


a)

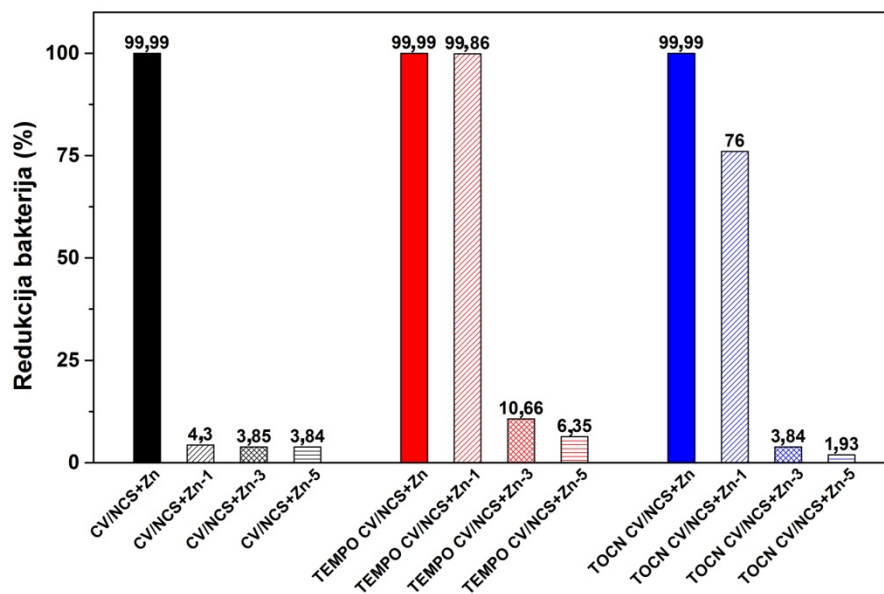


b)

Slika 68. Redukcija bakterija nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina funkcionalizovanih sa NCS nakon 1, 3 i 5 ciklusa pranja prema S.aureus (a) i E.coli (b)



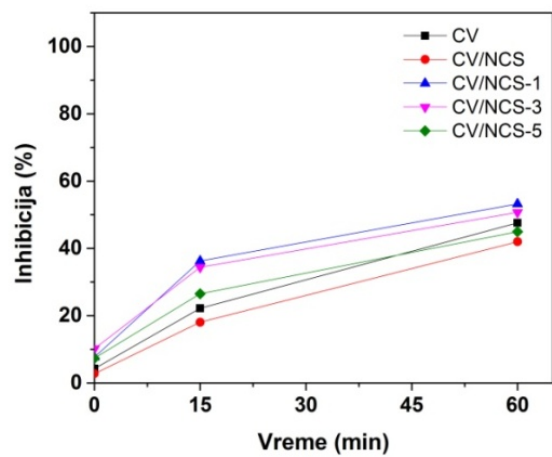
a)



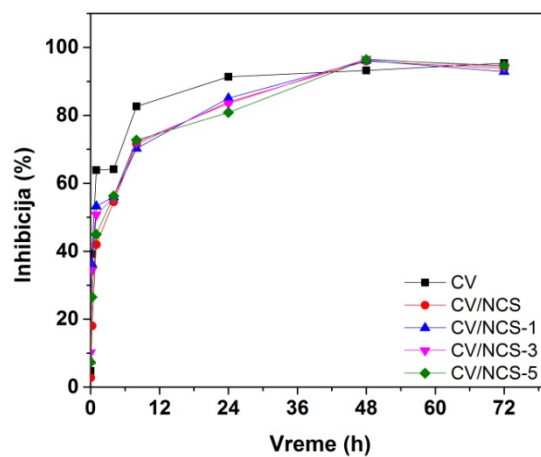
b)

Slika 69. Redukcija bakterija nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina funkcionalizovanih sa NCS+Zn nakon 1, 3 i 5 ciklusa pranja prema *S.aureus* (a) i *E.coli* (b).

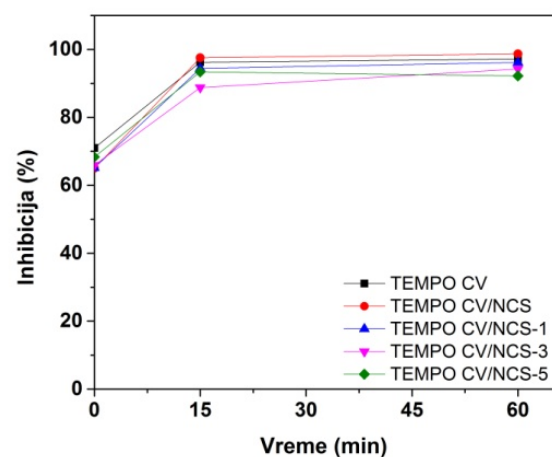
Antioksidativna aktivnost nemodifikovane i pred-tretiranih viskoznih tkanina funkcionalizovanih sa NCS/NCS+Zn pre i posle 1, 3 i 5 ciklusa pranja prikazana je na Slikama 70. i 71.



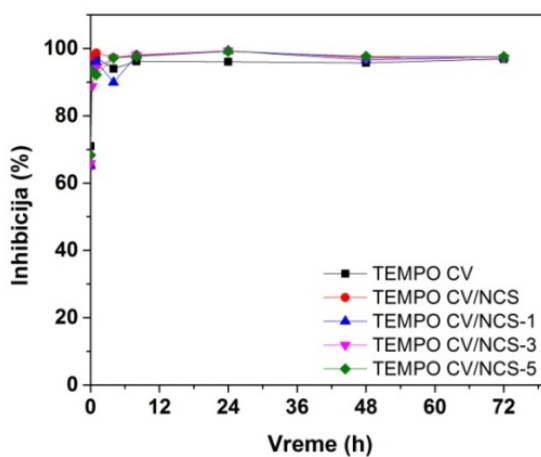
a)



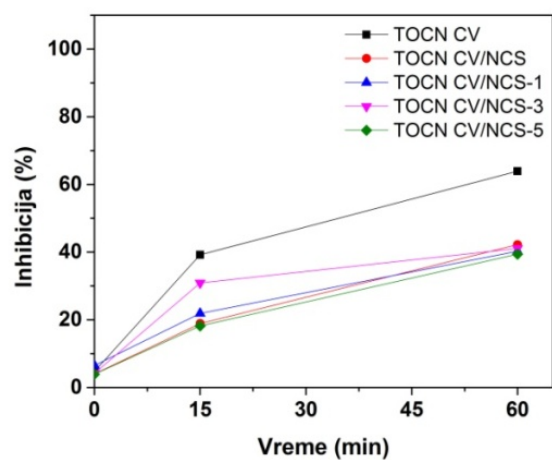
b)



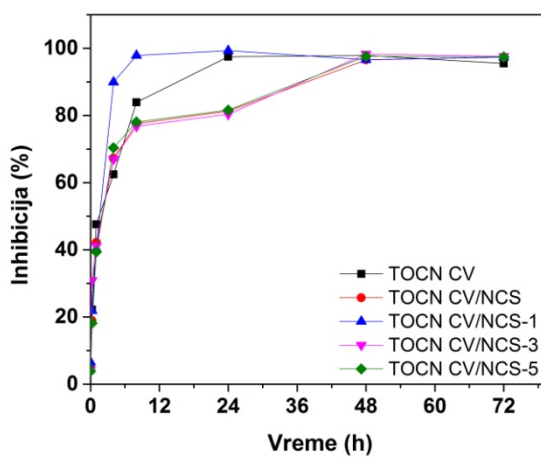
c)



d)

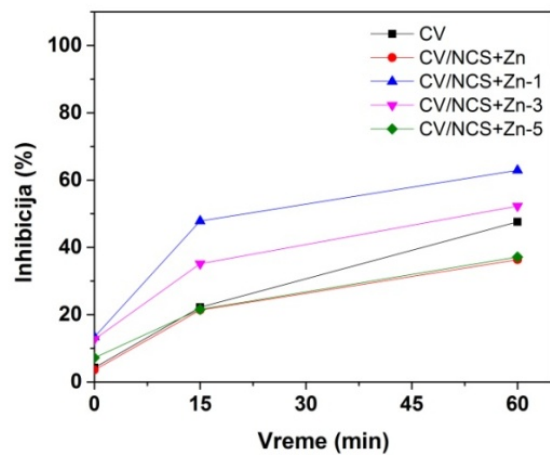


e)

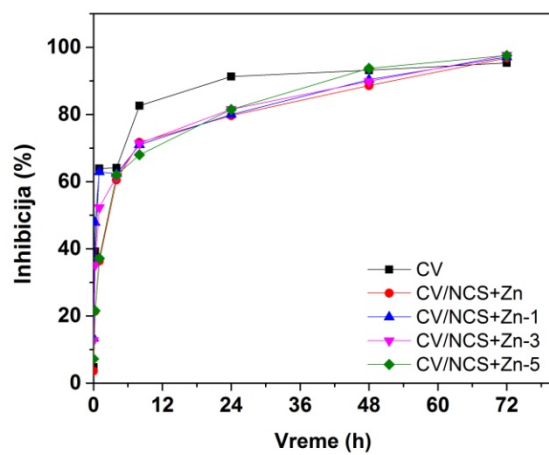


f)

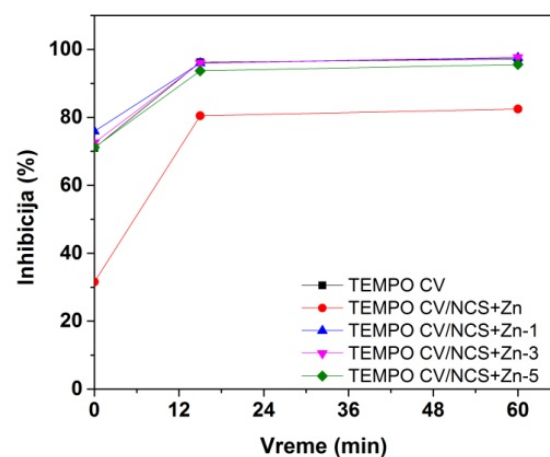
Slika 70. Antioksidativna aktivnost nemođifikovane i pred-tertiranih viskozniã tkanina funkcionalizovaniã sa NCS pre i posle 1, 3 i 5 ciklusa pranja nakon (a, c, e) 1 h i (b, d, f) 72 h



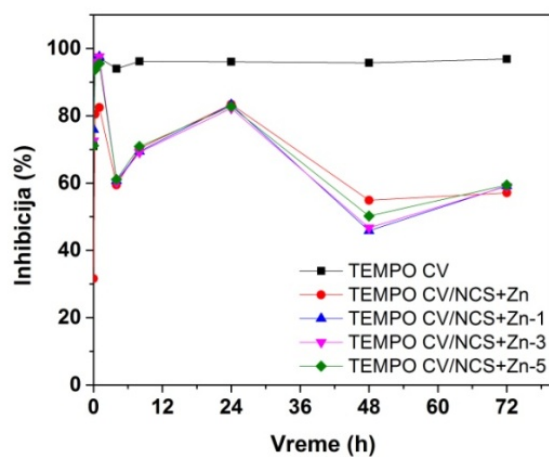
a)



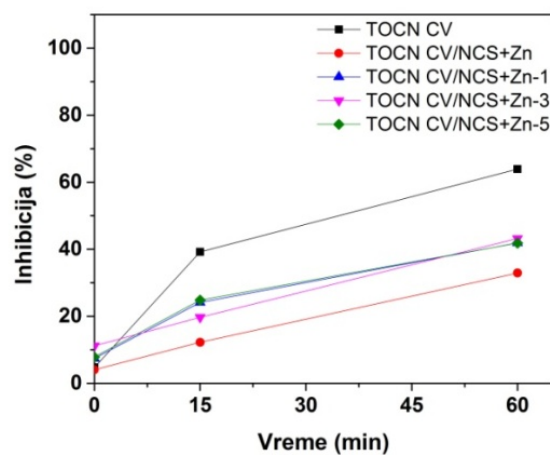
b)



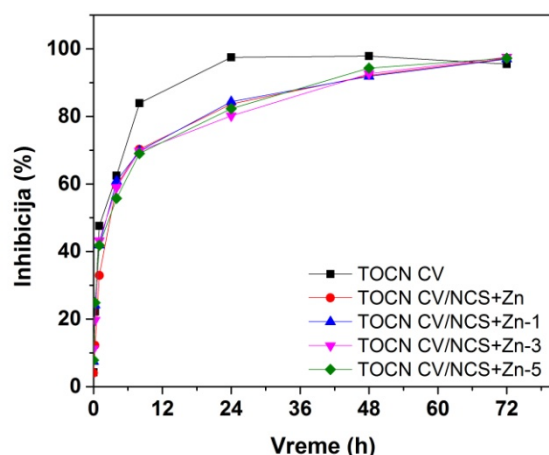
c)



d)



e)



f)

Slika 71. Antioksidativna aktivnost nemodifikovane i pred-tertiranih viskoznih tkanina funkcionalizovanih sa NCS+Zn pre i posle 1, 3 i 5 ciklusa pranja nakon (a, c, e) 1 h i (b, d, f) 72 h

Zabeleženo smanjenje sadržaja NCS u/na funkcionalizovanim tkaninama, odnosno NCS+Zn i jona cinka u slučaju NCS+Zn funkcionalizovanih tkanina, nakon višestrukih ciklusa pranja nije se značajno odrazilo na njihovu antioksidativnu aktivnost (Slike 70. i 71.), s obzirom da su dobijene slične vrednosti za antioksidativnu aktivnost viskoznih tkanina pre i posle funkcionalizacije sa NCS/NCS+Zn (Slike 70. i 71.). Vrlo slični rezultati antioksidativne aktivnosti nakon višestrukih ciklusa pranja takođe su postignuti i sa CS funkcionalizovanim tkaninama.

Iz svega navedenog proizilazi da su TEMPO oksidacija i TOCN naslojavanje viskozne tkanine doprineli ireverzibilnom vezivanju NCS i NCS+Zn (udruženih sa disosovanim jonima cinka iz disperzije NCS+Zn upotrebljene tokom procesa funkcionalizacije). Kao posledica povećane količine ireverzibilno vezanih NCS i NCS+Zn, oba pred-tretmana doprinela su efikasnijoj i na pranje postojanijoj antibakterijskoj aktivnosti ovako funkcionalizovanih viskoznih tkanina. U poređenju sa pred-tretiranim viskoznim tkaninama funkcionalizovanim CS iz rastvora, pred-tretirane viskozne tkanine funkcionalizovane NCS nisu pokazale povećanje antibakterijske aktivnosti niti bolju postojanost na pranje, dok su pred-tretirane viskozne tkanine funkcionalizovane NCS+Zn pokazale bolju postojanost antibakterijske aktivnosti na pranje. Viskozne tkanine funkcionalizovane NCS i NCS+Zn pokazale su dobra antioksidativna svojstva, bez značajnog pogoršanja nakon višestrukih ciklusa pranja. Kako u slučaju NCS tako i u slučaju NCS+Zn, u odnosu na CS funkcionalizovane viskozne tkanine generalno je postignuta niža antioksidativna aktivnost. Međutim, vrlo slični rezultati antioksidativne aktivnosti su postignuti sa NCS, NCS+Zn i CS funkcionalizovanim tkaninama nakon višestrukih ciklusa pranja. Sve funkcionalizovane tkanine, zahvaljujući odličnim bioaktivnim svojstvima, imaju veliki potencijal da budu primenjene kao medicinski tekstilni materijali postojani na pranje.

10. Zaključak

U okviru ove doktorske disertacije ispitane su mogućnosti dobijanja bioaktivnih nanostrukturnih materijala na bazi regenerisane celuloze (RC), TEMPO oksidisanih celuloznih nanofibrila (TOCN) i hitozana (CS)/nanočestica hitozana (NCS)/ nanočestica hitozana sa inkorporiranim jonima cinka (NCS+Zn). Na osnovu teorijskih razmatranja i rezultata eksperimentalnih istraživanja, proistekli su sledeći zaključci:

- Naslojavanjem TOCN na površine RC filmova dolazi do poboljšanja njihove hidrofilnosti i adsorpcije CS. Ukupni sadržaj vode povećava se s povećavanjem količine TOCN na površinama RC filmova kao rezultat intenziviranja interakcija između molekula vode i hidrofilnih karboksilnih grupa na njihovim površinama. Takođe, sadržaj adsorbovanog CS povećava se s povećavanjem količine TOCN na površinama RC filmova naslojenih TOCN, pri čemu je to povećanje veće u uslovima srednje kiselog pH (pH 5,5) u odnosu na jako kiseli pH (pH 2). Ireverzibilno vezanje CS u uslovima jako kiselog pH (pH 2) posledica je specifičnih i niskoenergetskih interakcija, dok je u uslovima srednje kiselog pH (pH 5,5) posledica uspostavljanja jonskih i kovalentnih veza.
- Film sa odličnim antibakterijskim svojstvima prema *S.aureus* i *E.coli* dobijen je deponovanjem CS na površinu RC filma naslojenog TOCN u uslovima srednje kiselog pH (pH 5,5). S obzirom da su proteini skloniji adsorpciji na naelektrisanе nego na nenaelektrisanе površine, film sa superiornim protein-odbijajućim svojstvima dobijen je naslojavanjem 1% amfoterne smeše na bazi TOCN i CS koja ima ukupno nulto naelektrisanje u uslovima fiziološkog pH (-0,04 mmol·g⁻¹ pri pH 7,4) na površinu RC filma. Međutim, usled interakcija između TOCN i CS amfoterne mešavine tj. njihovih vodonik donirajućih grupa, ovaj film nije istovremeno pokazao i zadovoljavajuću antimikrobnu aktivnost.
- S obzirom na odlična antibakterijska i protein-odbijajuća svojstva, dobijeni filmovi na bazi RC, TOCN i CS imaju veliki potencijal za primenu u oblasti medicinskog tekstila tj. kao obloge za rane.
- Tekstilni materijali sa antibakterijskim i antioksidativnim svojstvima dobijeni su funkcionalizacijom viskozne tkanine sa: 1) CS, 2) NCS i 3) NCS+Zn. Poboljšanje navedenih svojstava kao i njihove postojanosti na pranje postignuto je primenom dva različita pred-tretmana: naslojavanjem sa TOCN i TEMPO oksidacijom viskozne tkanine kojim su u strukturu viskozne tkanine uvedene karboksilne i aldehidne grupe kao pogodna mesta za ireverzibilno vezivanje CS, NCS i NCS+Zn.
- Oba pred-tretmana dovela su do povećanja sadržaja karboksilnih i aldehidnih grupa, kao i do poboljšanja sorpcionih svojstava viskozne tkanine. Povećan sadržaj karboksilnih i aldehidnih grupa je doprineo sposobnosti viskoznih tkanina za poboljšanu adsorpciju CS (sadržaj hitozana veći 2,31 puta za TEMPO oksidisanu i 1,48 puta za TOCN naslojenu, u odnosu na nemodifikovanu viskoznu tkaninu), NCS (sadržaj hitozana veći 2,74 puta za TEMPO oksidisanu i 1,47 puta za TOCN naslojenu, u odnosu na nemodifikovanu viskoznu tkaninu), kao i NCS+Zn (sadržaj hitozana veći 1,65 puta za TEMPO oksidisanu i 1,59 puta za TOCN naslojenu, u odnosu na nemodifikovanu tkaninu). Međutim, dok je naslojavanje sa TOCN dovelo do poboljšanja, TEMPO oksidacija je dovela do pogoršanja mehaničkih svojstava (tj. prekidne sile) viskozne tkanine.

- Nakon funkcionalizacije sa CS/NCS/NCS+Zn došlo je do pogoršanja sorpcionih svojstava (smanjenje količine sorbovane tečnosti od 1,92 do 67,69%) i prekidne sile (smanjenje od 1,77 do 31,16%) kako nemodifikovane tako i obe pred-tretirane viskozne tkanine.
- Sve viskozne tkanine, nemodifikovana i pred-tretirane, kao i funkcionalizovane sa CS/NCS/NCS+Zn pokazale su maksimalnu antibakterijsku aktivnost prema *S.aureus* i *E.coli* pre pranja. Kao posledica veće količine ireverzibilno vezanog CS/NCS/NCS+Zn, pred-tretmani su doprineli efikasnijoj i na pranje postojanijoj antibakterijskoj aktivnosti prema *S.aureus* i *E.coli*.
- Viskozne tkanine dobijene TEMPO oksidacijom i naknadnom funkcionalizacijom sa CS/NCS/NCS+Zn pokazale su najefikasniju i na pranje najpostojaniju antibakterijsku aktivnost prema *S.aureus* i *E.coli*.
- Inkorporiranje jona cinka u NCS dovelo je do povećanja gustine pozitivnog naelektrisanja NCS+Zn. S tim u vezi, viskozne tkanine nakon funkcionalizacije sa NCS+Zn, u odnosu na NCS, pokazale su veću gustinu pozitivnog naelektrisanja kako pre tako i posle pranja. Veća gustina pozitivnog naelektrisanja na površini NCS+Zn funkcionalizovanih tkanina verovatno je doprinela poboljšanoj adsorpciji bakterija *S.aureus* i *E.coli*, čija je površina negativno naelektrisana, i inhibiciji njihovog rasta tj. efikasnijoj i na pranje postojanijoj antibakterijskoj aktivnosti.
- Sve viskozne tkanine funkcionalizovane sa CS/NCS/NCS+Zn pokazale su dobra antioksidativna svojstva, bez značajnog pogoršanja nakon višestrukih ciklusa pranja.
- S obzirom na postignuta antibakterijska i antioksidativna svojstva, sve viskozne tkanine, nemodifikovana i pred-tretirane, funkcionalizovane sa CS/NCS/NCS+Zn su proizvodi visoke dodatne vrednosti, i mogu naći primenu kao medicinski tekstilni materijali za primenu u prevenciji i terapiji rana kao i za primenu u higijeni, zaštiti i sigurnosti osoblja i pacijenata u operacionim salama ili u bolničkim odeljenjima.
- Na osnovu rezultata dobijenih u okviru ove doktorke disertacije, moguće je uspostavljanje korelacija između parametara procesa dobijanja bioaktivnih nanostrukturnih filmova i tkanina na bazi RC, TOCN i CS/NCS/NCS+Zn, dobijene strukture i njihovih svojstava. Uspostavljanje pomenutih korelacija omogućava dobijanje bioaktivnih nanostrukturnih filmova i tkanina na bazi RC, TOCN i CS/NCS/NCS+Zn unapred definisanih svojstava, a za ciljanu primenu u terapiji različitih vrsta rana, rana u određenim stadijumima lečenja ili za izradu visokofunkcionalne odeće prema različitim biološkim potrebama.

Literatura

1. Strnad, S., Sauperl, O. & Fras-Zemljic, L. Cellulose fibres functionalised by chitosan: characterization and application, Biopolymers. In *Biopolymers* (ed. Elnashar, M.) (InTech, 2010).
2. Fras Zemljic, L., Peršin, Z., Šauperl, O., Rudolf, A. & Kostić, M. Medical textiles based on viscose rayon fabrics coated with chitosan-encapsulated iodine: antibacterial and antioxidant properties. *Textile Research Journal* **88**, 2519–2531 (2018).
3. Sretković, Lj. M. Doktorska disertacija: Tekstilni materijali za medicinsku namenu sa kombinovanim biološkim dejstvom. (Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2012).
4. Kumar, M. N. V. R., Muzzarelli, R. A. A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H. & Domb, A. J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews* **104**, 6017–6084 (2004).
5. Saito, T. & Isogai, A. TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. The effect of oxidation conditions on chemical and crystal structures of the water-insoluble fractions. *Biomacromolecules* **5**, 1983–1989 (2004).
6. Hirota, M., Tamura, N., Saito, T. & Isogai, A. Oxidation of regenerated cellulose with NaClO₂ catalyzed by TEMPO and NaClO under acid-neutral conditions. *Carbohydrate Polymers* **78**, 330–335 (2009).
7. Praskalo, J., Kostic, M., Potthast, A., Popov, G., Pejic, B. & Skundric, P. Sorption properties of TEMPO-oxidized natural and man-made cellulose fibers. *Carbohydrate Polymers* **77**, 791–798 (2009).
8. Isogai, A. Development of completely dispersed cellulose nanofibers. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **94**, 161–179 (2018).
9. Abitbol, T., Rivkin, A., Cao, Y., Nevo, Y., Abraham, E., Ben-Shalom, T., Lapidot, S. & Shoseyov, O. Nanocellulose, a tiny fiber with huge applications. *Current Opinion in Biotechnology* **39**, 76–88 (2016).
10. Isogai, A., Saito, T. & Fukuzumi, H. TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. *Nanoscale* **3**, 71–85 (2011).
11. Lavoine, N., Desloges, I., Dufresne, A. & Bras, J. Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydrate Polymers* **90**, 735–764 (2012).
12. Isogai, A., Hänninen, T., Fujisawa, S. & Saito, T. Review: Catalytic oxidation of cellulose with nitroxyl radicals under aqueous conditions. *Progress in Polymer Science* **86**, 122–148 (2018).
13. Naseri-Nosar, M. & Ziora, Z. M. Wound dressings from naturally-occurring polymers: A review on homopolysaccharide-based composites. *Carbohydrate Polymers* **189**, 379–398 (2018).
14. Mohammed, M. A., Syeda, J. T. M., Wasan, K. M. & Wasan, E. K. An Overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. *Pharmaceutics* **9**, 53 (2017).

15. Buşilă, M., Muşat, V., Textor, T. & Mahltig, B. Synthesis and characterization of antimicrobial textile finishing based on Ag:ZnO nanoparticles/chitosan biocomposites. *RSC Advances* **5**, 21562–21571 (2015).
16. Lansdown, A. B. G., Mirastschijski, U., Stubbs, N., Scanlon, E. & Ågren, M. S. Zinc in wound healing: Theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair and Regeneration* **15**, 2–16 (2007).
17. Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.-P. & Bohn, A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie International Edition* **44**, 3358–3393 (2005).
18. Credou, J. & Berthelot, T. Cellulose: from biocompatible to bioactive material. *Journal of Materials Chemistry B* **2**, 4767–4788 (2014).
19. Klemm, D., Schmauder, H.-P. & Heinze, T. Cellulose. In *Biopolymers Online* (ed. Steinbüchel, A.) (2005) doi:10.1002/3527600035.bpol6010.
20. Ding, S.-Y. & Himmel, M. E. The Maize Primary Cell Wall Microfibril: A new model derived from direct visualization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 597–606 (2006).
21. Nikolić, T. J. Doktorska disertacija: Dobijanje bioliški aktivnih vlakana na bazi selektivno oksidisane celuloze. (Tehnološko- metalurški fakultet, Beograd, 2011).
22. Cutler, S. & Somerville, C. Cellulose synthesis: Cloning in silico. *Current Biology* **7**, R108–R111 (1997).
23. Praskalo, J. Ž. Doktorska disertacija: Dobijanje celuloznih vlakana specijalnih svojstava metodama hemijskog modifikovanja. (Tehnološko-metalurski fakultet, Beograd, 2010).
24. Piras, C. C., Fernández-Prieto, S. & De Borggraeve, W. M. Ball milling: a green technology for the preparation and functionalisation of nanocellulose derivatives. *Nanoscale Advances* **1**, 937–947 (2019).
25. Kramar, A. D. Doktorska disertacija: Modifikovanje površine celuloznih vlakana primenom dielektričnog barijernog pražnjenja. (Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2015).
26. Kalia, S., Dufresne, A., Cherian, B. M., Kaith, B. S., Avérous, L., Njuguna, J. & Nassiopoulos, E. Cellulose-based bio- and nanocomposites: A Review. *International Journal of Polymer Science* **2011**, 837875 (2011).
27. Roy, D., Semsarilar, M., Guthrie, J. T. & Perrier, S. Cellulose modification by polymer grafting: a review. *Chemical Society Reviews* **38**, 2046–2064 (2009).
28. Zhou, C. & Wu, Q. Recent development in applications of cellulose nanocrystals for advanced polymer-based nanocomposites by novel fabrication strategies. in *Nanocrystals* (ed. Neralla, S.) (IntechOpen, 2012). doi:10.5772/48727.
29. Klemm, D., Philipp, B., Heinze, T., Heinze, U. & Wagenknecht, W. *Comprehensive cellulose chemistry. Volume 1: Fundamentals and analytical methods*. (Wiley-VCH Verlag GmbH, 1998).
30. Karimian, A., Parsian, H., Majidinia, M., Rahimi, M., Mir, S. M., Kafil, H. S., Shafiei-Irannejad, V., Kheyrollah, M., Ostadi, H. & Yousefi, B. Nanocrystalline cellulose: Preparation,

- physicochemical properties, and applications in drug delivery systems. *International Journal of Biological Macromolecules* **133**, 850–859 (2019).
31. Liese, A. & Hilterhaus, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chemical Society Reviews*. **42**, 6236–6249 (2013).
 32. Tavares, D. T., Antunes, C. J., Ferreira, F. & Felgueiras, P. H. Biofunctionalization of natural fiber-reinforced biocomposites for biomedical applications. *Biomolecules* **10:1**, (2020).
 33. Pelton, R. Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **28**, 925–942 (2009).
 34. Rusmini, F., Zhong, Z. & Feijen, J. Protein Immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules* **8**, 1775–1789 (2007).
 35. Secundo, F. Conformational changes of enzymes upon immobilisation. *Chemical Society Reviews*. **42**, 6250–6261 (2013).
 36. Lengyel, M., Kállai-Szabó, N., Antal, V., Laki, A. J. & Antal, I. Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. *Scientia Pharmaceutica* **3:87**, 20 (2019).
 37. Sassolas, A., Blum, L. J. & Leca-Bouvier, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances* **30**, 489–511 (2012).
 38. Sicard, C. & Brennan, J. D. Bioactive paper: Biomolecule immobilization methods and applications in environmental monitoring. *MRS Bulletin* **38**, 331–334 (2013).
 39. Fras Zemljic, L., Sauperl, O., But, I., Zabret, A. & Lusicky, M. Viscose material functionalized by chitosan as a potential treatment in gynecology. *Textile Research Journal* **81**, 1183–1190 (2011).
 40. Barbiroli, A., Bonomi, F., Capretti, G., Iametti, S., Manzoni, M., Piergiovanni, L. & Rollini, M. Antimicrobial activity of lysozyme and lactoferrin incorporated in cellulose-based food packaging. *Food Control* **26**, 387–392 (2012).
 41. Beekmann, U., Schmölz, L., Lorkowski, S., Werz, O., Thamm, J., Fischer, D. & Kralisch, D. Process control and scale-up of modified bacterial cellulose production for tailor-made anti-inflammatory drug delivery systems. *Carbohydrate Polymers* **236**, 116062 (2020).
 42. Risio, S. N. Di. Doctoral dissertation: Fundamental investigation of inkjet deposition and physical immobilization of horseradish peroxidase on cellulosic substrates. (University of Toronto, 2009).
 43. Cao, Y., Zhang, Q., Wang, C., Zhu, Y. & Bai, G. Preparation of novel immunomagnetic cellulose microspheres via cellulose binding domain-protein A linkage and its use for the isolation of interferon α -2b. *Journal of Chromatography A* **1149**, 228–235 (2007).
 44. Weishaupt, R., Zünd, J. N., Heuberger, L., Zuber, F., Faccio, G., Robotti, F., Ferrari, A., Fortunato, G., Ren, Q., Maniura-Weber, K. & Guex, A. G. Antibacterial, cytocompatible, sustainably sourced: cellulose membranes with bifunctional peptides for advanced wound dressings. *Advanced Healthcare Materials* **9**, 1901850 (2020).

45. Kong, F. & Hu, Y. F. Biomolecule immobilization techniques for bioactive paper fabrication. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **403**, 7–13 (2012).
46. Nikolic, T., Kostic, M., Praskalo, J., Pejic, B., Petronijevic, Z. & Skundric, P. Sodium periodate oxidized cotton yarn as carrier for immobilization of trypsin. *Carbohydrate Polymers* **82**, 976–981 (2010).
47. Chen, S., Chen, S., Jiang, S., Xiong, M., Luo, J., Tang, J. & Ge, Z. Environmentally Friendly Antibacterial Cotton Textiles Finished with Siloxane Sulfopropylbetaine. *ACS Applied Materials & Interfaces* **3**, 1154–1162 (2011).
48. Chun, D.T.W. & Gamble, G.R. Using the reactive dye method to covalently attach antibacterial compounds to cotton. *Journal of cotton science* **11:3**, 154 (2007).
49. Nogueira, F., Vaz, J., Mouro, C., Piskin, E. & Gouveia, I. Covalent modification of cellulosic-based textiles: A new strategy to obtain antimicrobial properties. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **19**, 526–533 (2014).
50. Durand, H., Jaouen, P., Faure, E., Sillard, C., Belgacem, N., Zeno, E. & Bras, J. Pure cellulose nanofibrils membranes loaded with ciprofloxacin for drug release and antibacterial activity. *Cellulose* (2020) doi:10.1007/s10570-020-03231-5.
51. Ge, L., Yan, J., Song, X., Yan, M., Ge, S. & Yu, J. Three-dimensional paper-based electrochemiluminescence immunodevice for multiplexed measurement of biomarkers and point-of-care testing. *Biomaterials* **33**, 1024–1031 (2012).
52. Ge, L., Wang, S., Song, X., Ge, S. & Yu, J. 3D Origami-based multifunction-integrated immunodevice: low-cost and multiplexed sandwich chemiluminescence immunoassay on microfluidic paper-based analytical device. *Lab on a Chip* **12**, 3150–3158 (2012).
53. Wang, S., Ge, L., Song, X., Yu, J., Ge, S., Huang, J. & Zeng, F. Paper-based chemiluminescence ELISA: Lab-on-paper based on chitosan modified paper device and wax-screen-printing. *Biosensors and Bioelectronics* **31**, 212–218 (2012).
54. Ornatska, M., Sharpe, E., Andreescu, D. & Andreescu, S. Paper bioassay based on ceria nanoparticles as colorimetric probes. *Analytical Chemistry* **83**, 4273–4280 (2011).
55. Liu, W., Cassano, C. L., Xu, X. & Fan, Z. H. Laminated Paper-Based Analytical Devices (LPAD) with Origami-Enabled Chemiluminescence Immunoassay for Cotinine Detection in Mouse Serum. *Analytical Chemistry* **85**, 10270–10276 (2013).
56. Elnashar, M. The Art of Immobilization Using Biopolymers, Biomaterials and Nanobiotechnology, *Biotechnology of Biopolymers*. (ed. Elnashar, M.) (IntechOpen, 2011).
57. Sheldon, R. a. & Pelt, S. van. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews* **42**, 6223–6235 (2013).
58. Gericke, M., Trygg, J. & Fardim, P. Functional cellulose beads: Preparation, characterization, and applications. *Chemical Reviews* **113**, 4812–4836 (2013).
59. Arola, S., Tammelin, T., Setälä, H., Tullila, A. & Linder, M. B. Immobilization–stabilization of proteins on nanofibrillated cellulose derivatives and their bioactive film formation.

Biomacromolecules **13**, 594–603 (2012).

60. Orelma, H., Johansson, L., Filpponen, I., Rojas, O. J. & Laine, J. Generic method for attaching biomolecules via avidin–biotin complexes immobilized on films of regenerated and nanofibrillar cellulose. *Biomacromolecules* **13**, 2802–2810 (2012).
61. Kostić, M., Nikolić, T., Korica, M., Milanović, J. Kramar, A., Petronijević, Ž. Patent No. RS 57753 B1: Biološki aktivna vlakna pamuka sa imobilisanim tripsinom. (2018).
62. Korica, M., Peršin, Z., Trifunović, S., Mihajlovski, K., Nikolić, T., Maletić, S., Fras Zemljič, L. & Kostić, M. M. Influence of different pretreatments on the antibacterial properties of chitosan functionalized viscose fabric: TEMPO oxidation and coating with TEMPO oxidized cellulose nanofibrils. *Materials* **12**, 3144 (2019).
63. Nikolic, T., Korica, M., Milanovic, J., Kramar, A., Petronijevic, Z. & Kostic, M. TEMPO-oxidized cotton as a substrate for trypsin immobilization: impact of functional groups on proteolytic activity and stability. *Cellulose* **24**, 1863–1875 (2017).
64. Marković, D., Korica, M., Kostić, M., Radovanović, Ž., Šaponjić, Z., Mitrić, M. & Radetić, M. In situ synthesis of Cu/Cu₂O nanoparticles on the TEMPO oxidized cotton fabrics. *Cellulose* **25**, 829–841 (2018).
65. Semmelhack, M.F., Chou, C.S. & Cortes, D. A. Nitroxyl-mediated electrooxidation of alcohols to aldehydes and ketones. *Journal of the American Chemical Society* **105**, 4492–4494 (1983).
66. de Nooy, A. E. J., Besemer, A. C. & van Bekkum, H. Highly selective nitroxyl radical-mediated oxidation of primary alcohol groups in water-soluble glucans. *Carbohydrate Research* **269**, 89–98 (1995).
67. Saito, T., Okita, Y., Nge, T. T., Sugiyama, J. & Isogai, A. TEMPO-mediated oxidation of native cellulose: Microscopic analysis of fibrous fractions in the oxidized products. *Carbohydrate Polymers* **65**, 435–440 (2006).
68. Milanovic, J., Schiehser, S., Potthast, A. & Kostic, M. Stability of TEMPO-oxidized cotton fibers during natural aging. *Carbohydrate Polymers* **230**, 115587 (2020).
69. Fukuzumi, H., Saito, T. & Isogai, A. Influence of TEMPO-oxidized cellulose nanofibril length on film properties. *Carbohydrate Polymers* **93**, 172–177 (2013).
70. Cheng, D., Wen, Y., An, X., Zhu, X. & Ni, Y. TEMPO-oxidized cellulose nanofibers (TOCNs) as a green reinforcement for waterborne polyurethane coating (WPU) on wood. *Carbohydrate Polymers* **151**, 326–334 (2016).
71. Chauhan, V. S. & Chakrabarti, S. K. Use of nanotechnology for high performance cellulosic and papermaking products. *Cellulose Chemistry and Technology* **46**, 389–400 (2012).
72. Khalil, H. P. S. A., Bhat, A. H. & Yusra, A. F. I. Green composites from sustainable cellulose nanofibrils: A review. *Carbohydrate Polymers* **87**, 963–979 (2012).
73. Kargarzadeh, H., Mariano, M., Gopakumar, D., Ahmad, I., Thomas, S., Dufresne, A., Huang, J. & Lin, N. Advances in cellulose nanomaterials. *Cellulose* **25**, 2151–2189 (2018).

74. Khalil, H. P. S. A., Davoudpour, Y., Islam, Md. N., Mustapha, A., Sudesh, K., Dungani, R. & Jawaid, M. Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review. *Carbohydrate Polymers* **99**, 649–665 (2014).
75. Siró, I. & Plackett, D. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. *Cellulose* **17**, 459–494 (2010).
76. Kian, L. K., Saba, N., Jawaid, M. & Sultan, M. T. H. A review on processing techniques of bast fibers nanocellulose and its polylactic acid (PLA) nanocomposites. *International Journal of Biological Macromolecules* **121**, 1314–1328 (2019).
77. Lu, J., Askeland, P. & Drzal, L. T. Surface modification of microfibrillated cellulose for epoxy composite applications. *Polymer* **49**, 1285–1296 (2008).
78. Turbak, F., Snyder, W. & Sandberg, R. Patent No. CH 648071 (A5): Micro-fibrillated cellulose and process for producing it. (1985).
79. Iwamoto, S., Nakagaito, A. N., Yano, H. & Nogi, M. Optically transparent composites reinforced with plant fiber-based nanofibers. *Applied Physics A* **81**, 1109–1112 (2005).
80. Nakagaito, A. N. & Yano, H. The effect of morphological changes from pulp fiber towards nano-scale fibrillated cellulose on the mechanical properties of high-strength plant fiber based composites. *Applied Physics A* **78**, 547–552 (2004).
81. Iwamoto, S., Nakagaito, A. N. & Yano, H. Nano-fibrillation of pulp fibers for the processing of transparent nanocomposites. *Applied Physics A* **89**, 461–466 (2007).
82. Herrick, F. W., Casebier, R. L., Hamilton, J. K. & Sandberg, K. R. Microfibrillated cellulose: morphology and accessibility. in *9. Cellulose conference* 797–813 (1983).
83. Nechyporchuk, O., Belgacem, M. N. & Bras, J. Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances. *Industrial Crops and Products* **93**, 2–25 (2016).
84. Karande, V. S., Bharimalla, A. K., Hadge, G. B., Mhaske, S. T. & Vigneshwaran, N. Nanofibrillation of cotton fibers by disc refiner and its characterization. *Fibers and Polymers* **12**, 399–404 (2011).
85. Turbak, A. F., Snyder, F. W. & Sandberg, K. R. Microfibrillated cellulose, a new cellulose product: properties, uses, and commercial potential. in *Ninth Cellulose Conference, Applied Polymer Symposia* 815–827 (Wiley, 1983).
86. Dufresne, A., Dupeyre, D. & Vignon, M. R. Cellulose microfibrils from potato tuber cells: Processing and characterization of starch-cellulose microfibril composites. *Journal of Applied Polymer Science* **76**, 2080–2092 (2000).
87. Henriksson, M., Henriksson, G., Berglund, L. A. & Lindström, T. An environmentally friendly method for enzyme-assisted preparation of microfibrillated cellulose (MFC) nanofibers. *European Polymer Journal* **43**, 3434–3441 (2007).
88. Besbes, I., Vilar, M. R. & Boufi, S. Nanofibrillated cellulose from Alfa, Eucalyptus and Pine fibres: Preparation, characteristics and reinforcing potential. *Carbohydrate Polymers* **86**, 1198–1206 (2011).

89. Taipale, T., Österberg, M., Nykänen, A., Ruokolainen, J. & Laine, J. Effect of microfibrillated cellulose and fines on the drainage of kraft pulp suspension and paper strength. *Cellulose* **17**, 1005–1020 (2010).
90. Pääkkö, M., Ankerfors, M., Kosonen, H., Nykänen, A., Ahola, S., Österberg, M., Ruokolainen, J., Laine, J., Larsson, P. T., Ikkala, O. & Lindström, T. Enzymatic hydrolysis combined with mechanical shearing and high-pressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels. *Biomacromolecules* **8**, 1934–1941 (2007).
91. Aulin, C., Johansson, E., Wågberg, L. & Lindström, T. Self-organized films from cellulose I nanofibrils using the layer-by-layer technique. *Biomacromolecules* **11**, 872–882 (2010).
92. Eriksen Øyvind, Syverud, K. & Gregersen, Ø. The use of microfibrillated cellulose produced from kraft pulp as strength enhancer in TMP paper. *Nordic Pulp & Paper Research Journal* **23:3**, 299–304 (2008).
93. Ankerfors, M., Aulin, C. & Lindström, T. Nanocellulose research and developments at Innventia. in *TAPPI International Conference on Nanotechnology for Renewable Materials* 35 (2011).
94. Spence, K. L., Venditti, R. A., Rojas, O. J., Habibi, Y. & Pawlak, J. J. A comparative study of energy consumption and physical properties of microfibrillated cellulose produced by different processing methods. *Cellulose* **18**, 1097–1111 (2011).
95. Uetani, K. & Yano, H. Nanofibrillation of wood pulp using a high-speed blender. *Biomacromolecules* **12**, 348–353 (2011).
96. Chaker, A. & Boufi, S. Cationic nanofibrillar cellulose with high antibacterial properties. *Carbohydrate Polymers* **131**, 224–232 (2015).
97. Dufresne, A., Cavailé, J.-Y. & Vignon, M. R. Mechanical behavior of sheets prepared from sugar beet cellulose microfibrils. *Journal of Applied Polymer Science* **64**, 1185–1194 (1997).
98. Cheng, Q., Wang, S. & Rials, T. G. Poly(vinyl alcohol) nanocomposites reinforced with cellulose fibrils isolated by high intensity ultrasonication. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* **40**, 218–224 (2009).
99. Saito, T., Nishiyama, Y., Putaux, J.-L., Vignon, M. & Isogai, A. Homogeneous suspensions of individualized microfibrils from TEMPO-catalyzed oxidation of native cellulose. *Biomacromolecules* **7**, 1687–1691 (2006).
100. Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindström, T., Ankerfors, M., Gray, D. & Dorris, A. nanocelluloses: A new family of nature-based materials. *Angewandte Chemie International Edition* **50**, 5438–5466 (2011).
101. Bolaski, W. & Gallatin, J. C. Patent No. U.S. 3041246: Enzymatic conversion of cellulosic fibers. (1962).
102. Tangnu, S. K. Process development for ethanol production based on enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Process Biochemistry* **17**, 36–45 (1982).
103. Berlin, A., Balakshin, M., Gilkes, N., Kadla, J., Maximenko, V., Kubo, S. & Saddler, J.

- Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. *Journal of Biotechnology* **125**, 198–209 (2006).
104. Engström, A.-C., Ek, M. & Henriksson, G. Improved accessibility and reactivity of dissolving pulp for the viscose process: Pretreatment with monocomponent endoglucanase. *Biomacromolecules* **7**, 2027–2031 (2006).
 105. Tingaut, P., Zimmermann, T. & Lopez-Suevos, F. Synthesis and characterization of bionanocomposites with tunable properties from poly(lactic acid) and acetylated microfibrillated cellulose. *Biomacromolecules* **11**, 454–464 (2010).
 106. Aulin, C., Ahola, S., Josefsson, P., Nishino, T., Hirose, Y., Österberg, M. & Wågberg, L. Nanoscale cellulose films with different crystallinities and mesostructures—their surface properties and interaction with water. *Langmuir* **25**, 7675–7685 (2009).
 107. Saito, T. & Isogai, A. Introduction of aldehyde groups on surfaces of native cellulose fibers by TEMPO-mediated oxidation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **289**, 219–225 (2006).
 108. Eichhorn, S. J., Dufresne, A., Aranguren, M., Marcovich, N. E., Capadona, J. R., Rowan, S. J., Weder, C., Thielemans, W., Roman, M., Renneckar, S., Gindl, W., Veigel, S., Keckes, J., Yano, H., Abe, K., Nogi, M., Nakagaito, A. N., Mangalam, A., Simonsen, J., Benight, A. S., Bismarck, A., Berglund, L. A. & Peijs, T. Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. *Journal of Materials Science* **45**, 1–33 (2010).
 109. Johnson, R. K., Zink-Sharp, A., Renneckar, S. H. & Glasser, W. G. A new bio-based nanocomposite: fibrillated TEMPO-oxidized celluloses in hydroxypropylcellulose matrix. *Cellulose* **16**, 227–238 (2009).
 110. Li, Q. & Renneckar, S. Molecularly thin nanoparticles from cellulose: isolation of sub-microfibrillar structures. *Cellulose* **16**, 1025–1032 (2009).
 111. Cai, X., Riedl, B. & Ait-Kadi, A. Effect of surface-grafted ionic groups on the performance of cellulose-fiber-reinforced thermoplastic composites. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **41**, 2022–2032 (2003).
 112. Saito, T., Kimura, S., Nishiyama, Y. & Isogai, A. Cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. *Biomacromolecules* **8**, 2485–2491 (2007).
 113. Lasseguette, E., Roux, D. & Nishiyama, Y. Rheological properties of microfibrillar suspension of TEMPO-oxidized pulp. *Cellulose* **15**, 425–433 (2008).
 114. Wang, Q., Sun, J., Yao, Q., Ji, C., Liu, J. & Zhu, Q. 3D printing with cellulose materials. *Cellulose* **25**, 4275–4301 (2018).
 115. Kontturi, E. & Spirk, S. Ultrathin films of cellulose: A materials perspective. *Frontiers in Chemistry* **7**, 488 (2019).
 116. Fukuzumi, H., Saito, T., Iwata, T., Kumamoto, Y. & Isogai, A. Transparent and high gas barrier films of cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated oxidation. *Biomacromolecules* **10**, 162–165 (2009).

117. Saito, T., Hirota, M., Tamura, N., Kimura, S., Fukuzumi, H., Heux, L. & Isogai, A. Individualization of nano-sized plant cellulose fibrils by direct surface carboxylation using TEMPO catalyst under neutral conditions. *Biomacromolecules* **10**, 1992–1996 (2009).
118. Fukui, S., Ito, T., Saito, T., Noguchi, T. & Isogai, A. Surface-hydrophobized TEMPO-nanocellulose/rubber composite films prepared in heterogeneous and homogeneous systems. *Cellulose* **26**, 463–473 (2019).
119. Poyraz, B., Tozluoğlu, A., Candan, Z., Demir, A., Yavuz, M., Büyüksarı, Ü., Ünal, H. İ., Fidan, H. & Saka, R. C. TEMPO-treated CNF composites: Pulp and matrix effect. *Fibers and Polymers* **19**, 195–204 (2018).
120. Chin, K.-M., Sung Ting, S., Ong, H. L. & Omar, M. Surface functionalized nanocellulose as a veritable inclusionary material in contemporary bioinspired applications: A review. *Journal of Applied Polymer Science* **135**, 46065 (2018).
121. Wilson, B. P., Yliniemi, K., Gestranus, M., Hakalahti, M., Putkonen, M., Lundström, M., Karppinen, M., Tammelin, T. & Kontturi, E. Structural distinction due to deposition method in ultrathin films of cellulose nanofibres. *Cellulose* **25**, 1715–1724 (2018).
122. Hakalahti, M., Faustini, M., Boissière, C., Kontturi, E. & Tammelin, T. Interfacial mechanisms of water vapor sorption into cellulose nanofibril films as revealed by quantitative models. *Biomacromolecules* **18**, 2951–2958 (2017).
123. Periyah, M. H., Halim, A. S. & Saad, A. Z. M. Chitosan: A promising marine polysaccharide for biomedical research. *Pharmacognosy reviews* **10**, 39–42 (2016).
124. Crini, G. Historical review on chitin and chitosan biopolymers. *Environmental Chemistry Letters* **17**, 1623–1643 (2019).
125. Janjić, S. D. Doktorska disertacija: Prilog proučavanju dobijanja hemijskih dvokomponentnih vlakana specijalnih svojstava na bazi polisaharida. (Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2010).
126. Kumar, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers* **46**, 1–27 (2000).
127. Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* **31**, 603–632 (2006).
128. Ahmed, S., Ahmad, M. & Ikram, S. Chitosan: A natural antimicrobial agent-a review. *Journal of Applicable Chemistry* **3**, 493–503 (2014).
129. Frank, L. A., Onzi, G. R., Morawski, A. S., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S. & Contri, R. V. Chitosan as a coating material for nanoparticles intended for biomedical applications. *Reactive and Functional Polymers* **147**, 104459 (2020).
130. Arkoun, M., Ardila, N., Heuzey, M. & Ajji, A. 17-Chitosan-based structures/coatings with antibacterial properties. in *Handbook of Antimicrobial Coatings* (ed. Tiwari, A.) 357–389 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-811982-2.00017-2.
131. Aranaz, I. Mengibar, M., Harris, R., Panos, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G. & Heras, A.

- functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology* **2:3**, 203–230 (2009).
132. Mittal, H., Ray, S. S., Kaith, B. S., Bhatia, J. K., Sukriti, Sharma, J. & Alhassan, S. M. Recent progress in the structural modification of chitosan for applications in diversified biomedical fields. *European Polymer Journal* **109**, 402–434 (2018).
 133. Morin-Crini, N., Lichtfouse, E., Torri, G. & Crini, G. Applications of chitosan in food, pharmaceuticals, medicine, cosmetics, agriculture, textiles, pulp and paper, biotechnology, and environmental chemistry. *Environmental Chemistry Letters* **17**, 1667–1692 (2019).
 134. Pillai, C. K. S., Paul, W. & Sharma, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science* **34**, 641–678 (2009).
 135. Fernández, R., Bonarodd, S., Algar, I., Barandiaran, I., Kortaberria, G., Gutierrez, J. & Tercjak, A. Photo-active chitosan-based hybrid films. *European Polymer Journal* **122**, 109373 (2020).
 136. Lavanya, K., Chandran, S. V., Balagangadharan, K. & Selvamurugan, N. Temperature- and pH-responsive chitosan-based injectable hydrogels for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C* **111**, 110862 (2020).
 137. Sabourian, P., Tavakolian, M., Yazdani, H., Frounchi, M., Theo G. M. van de Ven, Maysinger, D. & Kakkar, A. Stimuli-responsive chitosan as an advantageous platform for efficient delivery of bioactive agents. *Journal of Controlled Release* **317**, 216–231 (2020).
 138. Cho, Y.-W., Jang, J., Park, C. R. & Ko, S.-W. Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. *Biomacromolecules* **1**, 609–614 (2000).
 139. Jocić, D. & Topalović, T. Biopolimer hitozan: svojstva, interakcije i primena u obradi tekstilnog materijala. *Hemijska industrija* **58**, 457–469 (2004).
 140. Guibal, E., Vincent, T. & Navarro, R. Metal ion biosorption on chitosan for the synthesis of advanced materials. *Journal of Materials Science* **49**, 5505–5518 (2014).
 141. Sarmiento, B. & das Neves, J. *Chitosan-based systems for biopharmaceuticals: Delivery, targeting and polymer therapeutics*. (Wiley, 2012).
 142. Sorlier, P., Viton, C. & Domard, A. Relation between solution properties and degree of acetylation of chitosan: Role of aging. *Biomacromolecules* **3**, 1336–1342 (2002).
 143. Wyatt, N. B., Gunther, C. M. & Liberatore, M. W. Increasing viscosity in entangled polyelectrolyte solutions by the addition of salt. *Polymer* **52**, 2437–2444 (2011).
 144. Dotto, G. L., Campana-Filho, S. P. & de Almeida Pinto, L. A. *Chitosan based materials and its applications*. (Bentham Science Publishers, 2017).
 145. Hamman, J. H. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Marine Drugs* **4:8**, (2010).
 146. Krayukhina, M. A., Samoilova, N. A. & Yamskov, I. A. Polyelectrolyte complexes of chitosan: formation, properties and applications. *Russian Chemical Reviews* **77**, 799–813 (2008).
 147. Danielsen, S., Strand, S., de Lange Davies, C. & Stokke, B. T. Glycosaminoglycan

- destabilization of DNA–chitosan polyplexes for gene delivery depends on chitosan chain length and GAG properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1721**, 44–54 (2005).
148. Bernabé, P., Peniche, C. & Argüelles-Monal, W. Swelling behavior of chitosan/pectin polyelectrolyte complex membranes. Effect of thermal cross-linking. *Polymer Bulletin* **55**, 367–375 (2005).
 149. Islam, S., Siddiki, A., Begum, S. & Salam, M. Synthesis, spectral characterization and thermal behavior of newly derived La(III), Co(III) and Mn(II) complexes with schiff base derived from methionine and salicylaldehyde. *Open Journal of Inorganic Chemistry* **8**, 55–69 (2018).
 150. Fras Zemljič, L., Strnad, S., Šauperl, O. & Stana-Kleinschek, K. Characterization of amino groups for cotton fibers coated with chitosan. *Textile Research Journal* **79**, 219–226 (2009).
 151. Kumar, A. & Kumar, A. Chitosan as a biomedical material: Properties and applications. in *Biopolymers: Structure, performance and applications* (eds. Mishra, A. K., Hussain, C. M. & Mishra, S. B.) 139–153 (Nova Science Publishers, Inc., 2017).
 152. Čalijski, B., Milić, J., Krajišnik, D. & Račić, A. Karakteristike i primena hitozana u farmaceutskim/biomedicinskim preparatima. *Arhiv za farmaciju* **63**, 347–364 (2013).
 153. Maezaki, Y., Tsuji, K., Nakagawa, Y., Kawai, Y., Akimoto, M., Tsugita, T., Takekawa, W., Terada, A., Hara, H. & Mitsuoka, T. Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **57**, 1439–1444 (1993).
 154. Čalijski, B. R. Doktorska disertacija: Funkcionalnost hitozana u formulaciji alginat-hitozan mikročestica kao nosača za nesteroidne antiinflamatorne lekove. (Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2013).
 155. He, P., Davis, S. S. & Illum, L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* **166**, 75–88 (1998).
 156. Dhawan, S., Singla, A. K. & Sinha, V. R. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. *AAPS PharmSciTech* **5**, 122–128 (2004).
 157. Radwan-Pragłowska, J., Piątkowski, M., Deineka, V., Janus, Ł., Korniienko, V., Husak, E., Holubnycha, V., Liubchak, I., Zhurba, V., Sierakowska, A., Pogorielov, M. & Bogdał, D. Chitosan-based bioactive hemostatic agents with antibacterial properties—synthesis and characterization. *Molecules* **14:24**, 2629 (2019).
 158. Zhang, W., Xin, Y., Yin, B., Ye, G. L., Wang, J. X., Shen, J. F., Li, L. & Yang, Q. H. Synthesis and properties of crosslinked carboxymethyl chitosan and its hemostatic and wound healing effects on liver injury of rats. *Journal of Biomaterials Applications* **34**, 442–450 (2019).
 159. Huang, Y., Feng, L., Zhang, Y., He, L., Wang, C., Xu, J., Wu, J., Kirk, T. B., Guo, R. & Xue, W. Hemostasis mechanism and applications of N-alkylated chitosan sponge. *Polymers for Advanced Technologies* **28**, 1107–1114 (2017).
 160. Edwards, J. V., Howley, P., Prevost, N., Condon, B., Arnold, J. & Diegelmann, R. Positively and negatively charged ionic modifications to cellulose assessed as cotton-based protease-lowering and hemostatic wound agents. *Cellulose* **16**, 911–921 (2009).

161. Zhou, X., Zhang, X., Zhou, J. & Li, L. An investigation of chitosan and its derivatives on red blood cell agglutination. *RSC Advances* **7**, 12247–12254 (2017).
162. Sagnella, S. & Mai-Ngam, K. Chitosan based surfactant polymers designed to improve blood compatibility on biomaterials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **42**, 147–155 (2005).
163. Chou, T.-C., Fu, E., Wu, C.-J. & Yeh, J.-H. Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **302**, 480–483 (2003).
164. Fischer, T. H., Connolly, R., Thatte, H. S. & Schwaitzberg, S. S. Comparison of structural and hemostatic properties of the poly-N-acetyl glucosamine Syvek Patch with products containing chitosan. *Microscopy Research and Technique* **63**, 168–174 (2004).
165. Dowling, M. B., Kumar, R., Keibler, M. A., Hess, J. R., Bochicchio, G. V. & Raghavan, S. R. A self-assembling hydrophobically modified chitosan capable of reversible hemostatic action. *Biomaterials* **32**, 3351–3357 (2011).
166. Younes, I. & Rinaudo, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs* **13**, 1133–1174 (2015).
167. Matica, M. A., Aachmann, F. L., Tøndervik, A., Sletta, H. & Ostafe, V. Chitosan as a wound dressing starting material: Antimicrobial properties and mode of action. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 5889 (2019).
168. Raafat, D. & Sahl, H.-G. Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey. *Microbial Biotechnology* **2**, 186–201 (2009).
169. Xing, K., Zhu, X., Peng, X. & Qin, S. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. *Agronomy for Sustainable Development* **35**, 569–588 (2015).
170. Fu, X., Shen, Y., Jiang, X., Huang, D. & Yan, Y. Chitosan derivatives with dual-antibacterial functional groups for antimicrobial finishing of cotton fabrics. *Carbohydrate Polymers* **85**, 221–227 (2011).
171. Li, X., Feng, X.-q., Yang, S., Fu, G.-q., Wang, T.-p. & Su, Z.-x. Chitosan kills Escherichia coli through damage to be of cell membrane mechanism. *Carbohydrate Polymers* **79**, 493–499 (2010).
172. Fei Liu, X., Lin Guan, Y., Zhi Yang, D., Li, Z. & De Yao, K. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science* **79**, 1324–1335 (2001).
173. Sebti, I., Martial-Gros, A., Carnet-Pantiez, A., Grelier, S. & Coma, V. Chitosan polymer as bioactive coating and film against *Aspergillus niger* contamination. *Journal of Food Science* **70**, M100–M104 (2005).
174. Kravanja, G., Primožič, M., Knez, Ž. & Leitgeb, M. Chitosan-based (nano)materials for novel biomedical applications. *Molecules* **10:24**, (2019).
175. Helander, I. M., Nurmiäho-Lassila, E.-L., Ahvenainen, R., Rhoades, J. & Roller, S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **71**, 235–244 (2001).

176. Croisier, F. & Jérôme, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal* **49**, 780–792 (2013).
177. Ahmed, S. & Ikram, S. Chitosan based scaffolds and their applications in wound healing. *Achievements in the Life Sciences* **10**, 27–37 (2016).
178. Adhikari, H. S. & Yadav, P. N. Anticancer activity of chitosan, chitosan derivatives, and their mechanism of action. *International Journal of Biomaterials* **2018**, 2952085 (2018).
179. Alamry, K. A., Hussein, M. A., Al-Ghamdi, Y. O., Saleh, T. S., Asiri, A. M. & Alhebshi, A. M. Potential anti-cancer performance of chitosan-based β -ketosulfone derivatives. *Cogent Chemistry* **4**, 1559435 (2018).
180. Wimardhani, Y. S., Suniarti, D. F., Freisleben, H. J., Wanandi, S. I., Siregar, N. C. & Ikeda, M-A. Chitosan exerts anticancer activity through induction of apoptosis and cell cycle arrest in oral cancer cells. *Journal of Oral Science* **56**, 119–126 (2014).
181. Chiang, M.-T., Yao, H.-T. & Chen, H.-C. Effect of dietary chitosans with different viscosity on plasma lipids and lipid peroxidation in rats fed on a diet enriched with cholesterol. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **64**, 965–971 (2000).
182. Azuma, K., Osaki, T., Minami, S. & Okamoto, Y. Anticancer and anti-inflammatory properties of chitin and chitosan oligosaccharides. *Journal of Functional Biomaterials* **1:6**, (2015).
183. Cheung, R. C. F., Ng, T. B., Wong, J. H. & Chan, W. Y. Chitosan: An update on potential biomedical and pharmaceutical applications. *Marine Drugs* **13**, 5156–5186 (2015).
184. Sun, T., Xie, W. & Xu, P. Antioxidant activity of graft chitosan derivatives. *Macromolecular Bioscience* **3**, 320–323 (2003).
185. Pu, H.-L., Chiang, W.-L., Maiti, B., Liao, Z.-X., Ho, Y.-C., Shim, M. S., Chuang, E.-Y., Xia, Y. & Sung, H.-W. Nanoparticles with dual responses to oxidative stress and reduced pH for drug release and anti-inflammatory applications. *ACS Nano* **8**, 1213–1221 (2014).
186. Wang, T., Hou, J., Su, C., Zhao, L. & Shi, Y. Hyaluronic acid-coated chitosan nanoparticles induce ROS-mediated tumor cell apoptosis and enhance antitumor efficiency by targeted drug delivery via CD44. *Journal of Nanobiotechnology* **15**, 7 (2017).
187. Nguyen, T. V., Nguyen, T. T. H., Wang, S.-L., Vo, T. P. K. & Nguyen, A. D. Preparation of chitosan nanoparticles by TPP ionic gelation combined with spray drying, and the antibacterial activity of chitosan nanoparticles and a chitosan nanoparticle–amoxicillin complex. *Research on Chemical Intermediates* **43**, 3527–3537 (2017).
188. Shambayati, M. H., Mehrabi, M., Mohammadpour Dounighi, N., Ramazani, A., Zare Mirakabadi, A. & Ahmadi, E. Characterizing and controlling the loading of Vipera albicornuta venom in chitosan nanoparticles as an adjuvant and vaccine delivery system. *Nanomedicine Research Journal* **4**, 220–227 (2019).
189. Madureira, A. R., Pereira, A., Castro, P. M. & Pintado, M. Production of antimicrobial chitosan nanoparticles against food pathogens. *Journal of Food Engineering* **167**, 210–216 (2015).
190. Paomephan, P., Assavanig, A., Chaturongakul, S., Cady, N. C., Bergkvist, M. & Niamsiri, N.

- Insight into the antibacterial property of chitosan nanoparticles against *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* and their application as vegetable wash disinfectant. *Food Control* **86**, 294–301 (2018).
191. Zhao, L.-M., Shi, L.-E., Zhang, Z.-L., Chen, J.-M., Shi, D.-D., Yang, J. & Tang, Z.-X. Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **28**, 353–362 (2011).
 192. Mihai, M. M., Dima, M. B., Dima, B. & Holban, A. M. Nanomaterials for wound healing and infection control. *Materials* **12**, (2019).
 193. Wazed, A. S., Joshi, M. & Rajendran, S. Novel, self-assembled antimicrobial textile coating containing chitosan nanoparticles. *AATCC Review* **11**, 49–55 (2011).
 194. Ahmed, T. A. & Aljaeid, B. M. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug design, development and therapy* **10**, 483–507 (2016).
 195. Tiyaaboonchai, W. Chitosan nanoparticles : A promising system for drug delivery. *Naresuan University Journal* **11**, 51–66 (2003).
 196. Wang, J. J., Zeng, Z. W., Xiao, R. Z., Xie, T., Zhou, G. L., Zhan, X. R. & Wang, S. L. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine* **6**, 765–774 (2011).
 197. Guzman-Villanueva, D., El-Sherbiny, I. M., Herrera-Ruiz, D. & Smyth, H. D. C. Design and *in vitro* evaluation of a new nano-microparticulate system for enhanced aqueous-phase solubility of curcumin. *BioMed Research International* **2013**, 724763 (2013).
 198. Maestrelli, F., Garcia-Fuentes, M., Mura, P. & Alonso, M. J. A new drug nanocarrier consisting of chitosan and hydroxypropylcyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **63**, 79–86 (2006).
 199. Wang, J., Tan, H., Yu, A., Ling, P., Lou, H., Zhai, G. & Wu, J. Preparation of chitosan-based nanoparticles for delivery of low molecular weight heparin. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **5:7**, 696–703 (2011).
 200. Lee, S. J., Park, K., Oh, Y.-K., Kwon, S.-H., Her, S., Kim, I.-S., Choi, K., Lee, S. J., Kim, H., Lee, S. G., Kim, K. & Kwon, I. C. Tumor specificity and therapeutic efficacy of photosensitizer-encapsulated glycol chitosan-based nanoparticles in tumor-bearing mice. *Biomaterials* **30**, 2929–2939 (2009).
 201. Prabakaran, M. Chitosan-based nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* **72**, 1313–1322 (2015).
 202. Pilipenko, I., Korzhikov-Vlakh, V., Sharoyko, V., Zhang, N., Schäfer-Korting, M., Rühl, E., Zoschke, C. & Tennikova, T. pH-sensitive chitosan–heparin nanoparticles for effective delivery of genetic drugs into epithelial cells. *Pharmaceutics* **7:11**, (2019).
 203. Cui, Z. & Mumper, R. J. Chitosan-based nanoparticles for topical genetic immunization. *Journal of Controlled Release* **75**, 409–419 (2001).

204. Prego, C., Paolicelli, P., Díaz, B., Vicente, S., Sánchez, A., González-Fernández, Á. & Alonso, M. J. Chitosan-based nanoparticles for improving immunization against hepatitis B infection. *Vaccine* **28**, 2607–2614 (2010).
205. Ma, Z., Lim, T. M. & Lim, L.-Y. Pharmacological activity of peroral chitosan–insulin nanoparticles in diabetic rats. *International Journal of Pharmaceutics* **293**, 271–280 (2005).
206. Ehterami, A., Salehi, M., Farzamfar, S., Vaez, A., Samadian, H., Sahrapeyma, H., Mirzaii, M., Ghorbani, S. & Goodarzi, A. In vitro and in vivo study of PCL/COLL wound dressing loaded with insulin-chitosan nanoparticles on cutaneous wound healing in rats model. *International Journal of Biological Macromolecules* **117**, 601–609 (2018).
207. El-Feky, G. S., Sharaf, S. S., Shafei, A. El & Hegazy, A. A. Using chitosan nanoparticles as drug carriers for the development of a silver sulfadiazine wound dressing. *Carbohydrate Polymers* **158**, 11–19 (2017).
208. Ali, S. W., Rajendran, S. & Joshi, M. Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester. *Carbohydrate Polymers* **83**, 438–446 (2011).
209. Blažević, F., Milekić, T., Romić Duvnjak, M., Juretić, M., Pepić, I., Filipović-Grčić, J., Lovrić, J. & Hafner, A. Nanoparticle-mediated interplay of chitosan and melatonin for improved wound epithelialisation. *Carbohydrate Polymers* **146**, 445–454 (2016).
210. Karri, V. V. S. R., Kuppusamy, G., Talluri, S. V., Mannemala, S. S., Kollipara, R., Wadhvani, A. D., Mulukutla, S., Raju, K. R. S. & Malayandi, R. Curcumin loaded chitosan nanoparticles impregnated into collagen-alginate scaffolds for diabetic wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules* **93**, 1519–1529 (2016).
211. Rozman, N. A. S., Tong, W. Y., Leong, C. R., Anuar, M. R., Karim, S., Ong, S. K., Yusof, F. A. M., Tan, W.-N., Sulaiman, B., Ooi, M. L. & Lee, K. C. Homalomena pineodora essential oil nanoparticle inhibits diabetic wound pathogens. *Scientific Reports* **10**, 3307 (2020).
212. Ma, S., Moser, D., Han, F., Leonhard, M., Schneider-Stickler, B. & Tan, Y. Preparation and antibiofilm studies of curcumin loaded chitosan nanoparticles against polymicrobial biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *Carbohydrate Polymers* **241**, 116254 (2020).
213. Gopalakrishnan, L., Ramana, L. N., Sethuraman, S. & Krishnan, U. M. Ellagic acid encapsulated chitosan nanoparticles as anti-hemorrhagic agent. *Carbohydrate Polymers* **111**, 215–221 (2014).
214. Malagurski, I. S. Doktorska disertacija: Dobijanje i karakterizacija nemineralizovanih i mineralizovanih biomaterijala na bazi polisaharida morskih algi i esencijalnog metala cinka. (Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2017).
215. Cohen, S. M. New approaches for medicinal applications of bioinorganic chemistry. *Current Opinion in Chemical Biology* **11**, 115–120 (2007).
216. Hoppe, A., Güldal, N. S. & Boccaccini, A. R. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* **32**, 2757–2774 (2011).
217. Dalisson, B. & Barralet, J. Bioinorganics and wound healing. *Advanced Healthcare Materials* **8**,

1900764 (2019).

218. Sekhon, B. S. Inorganics/bioinorganics: Biological, medicinal and pharmaceutical uses. *Journal of Pharmaceutical Education and Research* **2**, 1–20 (2011).
219. Lin, P.-H., Sermersheim, M., Li, H., Lee, H. U. P., Steinberg, M. S. & Ma, J. Zinc in wound healing modulation. *Nutrients* **1:10**, (2017).
220. Vallee, B. L. & Falchuk, K. H. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Reviews* **73**, 79–118 (1993).
221. Kurmis, R., Greenwood, J. & Aromataris, E. Trace element supplementation following severe burn injury: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Burn Care & Research* **37**, 143–159 (2016).
222. Adjepong, M., Agbenorku, P., Brown, P. & Oduro, I. The role of antioxidant micronutrients in the rate of recovery of burn patients: a systematic review. *Burns & Trauma* **4**, 18 (2016).
223. Mirastschijski, U., Martin, A., Jorgensen, L. N., Sampson, B. & Ågren, M. S. Zinc, copper, and selenium tissue levels and their relation to subcutaneous abscess, minor surgery, and wound healing in humans. *Biological Trace Element Research* **153**, 76–83 (2013).
224. Posthauer, M. E. Nutrition: Fuel for pressure ulcer prevention and healing. *Nursing2020* **44**, 67–69 (2014).
225. Sernekos, L. A. Nutritional treatment of pressure ulcers: What is the evidence? *Journal of the American Association of Nurse Practitioners* **25**, 281–288 (2013).
226. Sen, C. K. The general case for redox control of wound repair. *Wound Repair and Regeneration* **11**, 431–438 (2003).
227. Formigari, A., Irato, P. & Santon, A. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **146**, 443–459 (2007).
228. Simões, D., Miguel, S. P., Ribeiro, M. P., Coutinho, P., Mendonça, A. G. & Correia, I.J. Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **127**, 130–141 (2018).
229. Lemire, J. A., Harrison, J. J. & Turner, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology* **11**, 371–384 (2013).
230. Rostan, E. F., DeBuys, H. V, Madey, D. L. & Pinnell, S. R. Evidence supporting zinc as an important antioxidant for skin. *International Journal of Dermatology* **41**, 606–611 (2002).
231. Agren, M. S. Zinc oxide increases degradation of collagen in necrotic wound tissue. *British Journal of Dermatology* **129**, 221–222 (1993).
232. Aksoy, B., Atakan, N., Aksoy, H. M., Tezel, G. G., Renda, N., Özkara, H. A. & Önder, Evren. Effectiveness of topical zinc oxide application on hypertrophic scar development in rabbits. *Burns* **36**, 1027–1035 (2010).
233. Emri, E., Miko, E., Bai, P., Boros, G., Nagy, G., Rózsa, D., Juhász, T., Hegedűs, C., Horkay, I.,

- Remenyik, É. & Emri, G. Effects of non-toxic zinc exposure on human epidermal keratinocytes. *Metallomics* **7**, 499–507 (2015).
234. Attia, E. A. S., Belal, D. M. I., El Samahy, M. H. & El Hamamsy, M. H. A pilot trial using topical regular crystalline insulin vs. aqueous zinc solution for uncomplicated cutaneous wound healing: Impact on quality of life. *Wound Repair and Regeneration* **22**, 52–57 (2014).
235. Wang, X., Du, Y. & Liu, H. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan–Zn complex. *Carbohydrate Polymers* **56**, 21–26 (2004).
236. Oluwasina, O. O., Olagboye, A. S., Boboye, A. & Hassan, F. G. Carboxymethyl chitosan zinc supplement: Preparation, physicochemical, and preliminary antimicrobial analysis. *Cogent Chemistry* **3**, 1294470 (2017).
237. Zhai, X., Sun, C., Li, K., Guan, F., Liu, X., Duan, J. & Hou, B. Synthesis and characterization of chitosan–zinc composite electrodeposits with enhanced antibacterial properties. *RSC Advances* **6**, 46081–46088 (2016).
238. Patale, R. L. & Patravale, V. B. O,N-carboxymethyl chitosan–zinc complex: A novel chitosan complex with enhanced antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers* **85**, 105–110 (2011).
239. Negut, I. & Grumezescu, V. Grumezescu, A. M. Treatment strategies for infected wounds. *Molecules* **23**, 2392 (2018).
240. Giacometti, A., Cirioni, O., Schimizzi, A. M., Del Prete, M. S., Barchiesi, F., D'Errico, M. M., Petrelli, E. & Scalise, G. Epidemiology and microbiology of surgical wound infections. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 918–922 (2000).
241. Dimitrijević, M. Master rad: Učestalost i rezistencija bakterijskih izolata iz briseva rana. (Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, 2016).
242. Rezvani Ghomi, E., Khalili, S., Nouri Khorasani, S., Esmaeely Neisiany, R. & Ramakrishna, S. Wound dressings: Current advances and future directions. *Journal of Applied Polymer Science* **136**, 47738 (2019).
243. Rajalakshmi, A., Krithiga, N. & Jayachitra, A. Antioxidant activity of the chitosan extracted from shrimp exoskeleton. *Middle-East Journal of Scientific Research* **16**, 1446–1451 (2013).
244. Kozarski, M. S. Doktorka disertacija: Hemijska karakterizacija, antioksidativna i antimikrobna svojstva polisaharidnih ekstrakata odabranih vrsta gljiva. (Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2012).
245. Kaur, G. Polymers as Bioactive Materials-I: Natural and non-degradable polymers BT - bioactive glasses: Potential biomaterials for future therapy. in (ed. Kaur, G.) 21–51 (Springer International Publishing, 2017). doi:10.1007/978-3-319-45716-1_2.
246. Islam, S., Bhuiyan, M. A. R. & Islam, M. N. Chitin and chitosan: Structure, properties and applications in biomedical engineering. *Journal of Polymers and the Environment* **25**, 854–866 (2017).
247. Trivedi, P. & Fardim, P. Recent advances in cellulose chemistry and potential applications. In *Production of materials from sustainable biomass resources*. (eds. Fang, Z., Smith Richard L.,

- J. & Tian, X.-F.) 99–115 (Springer Singapore, 2019). doi:10.1007/978-981-13-3768-0_4.
248. Madihally, S. *Principles of biomedical engineering, second edition*. (Artech House, 2019).
249. Ullah, M. W., Fu, L., Lamboni, L., Shi, Z. & Yang, G. Chapter 3 - Current trends and biomedical applications of resorbable polymers. in *Materials for biomedical engineering* (eds. Grumezescu, V. & Grumezescu, A. M.) 41–86 (Elsevier, 2019). doi.org/10.1016/B978-0-12-818415-8.00003-6.
250. Xia, G., Zhai, D., Sun, Y., Hou, L., Guo, X., Wang, L., Li, Z. & Wang, F. Preparation of a novel asymmetric wettable chitosan-based sponge and its role in promoting chronic wound healing. *Carbohydrate Polymers* **227**, 115296 (2020).
251. Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N. E. & Eccleston, G. M. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **97**, 2892–2923 (2008).
252. Caló, E. & Khutoryanskiy, V. V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal* **65**, 252–267 (2015).
253. Brzoza-Malczewska, K., Kucharska, M., Wiśniewska-Wrona, M., Guzińska, K. & Ulacha-Bacciarelli, A. Modified cellulose products for application in hygiene and dressing materials (Part I). *Fibres & Textiles in Eastern Europe* **3**, 126–132 (2015).
254. Kim, Y. H., Choi, H.-M. & Yoon, J. H. Synthesis of a Quaternary Ammonium Derivative of Chitosan and Its Application to a Cotton Antimicrobial Finish. *Textile Research Journal* **68**, 428–434 (1998).
255. Chandrasekar, S., Vijayakumar, S. & Rajendran, R. Application of chitosan and herbal nanocomposites to develop antibacterial medical textile. *Biomedicine & Aging Pathology* **4**, 59–64 (2014).
256. Petkova, P., Francesko, A., Fernandes, M. M., Mendoza, E., Perelshtein, I., Gedanken, A. & Tzanov, T. Sonochemical coating of textiles with hybrid ZnO/chitosan antimicrobial nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces* **6**, 1164–1172 (2014).
257. Tseng, H.-J., Hsu, S., Wu, M.-W., Hsueh, T.-H. & Tu, P.-C. Nylon textiles grafted with chitosan by open air plasma and their antimicrobial effect. *Fibers and Polymers* **10**, 53–59 (2009).
258. Dhiman, G. & Chakraborty, J. N. Antimicrobial performance of cotton finished with triclosan, silver and chitosan. *Fashion and Textiles* **2**, 13 (2015).
259. Ferrero, F. & Periolatto, M. Antimicrobial finish of textiles by chitosan UV-curing. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **12**, 4803–4810 (2012).
260. Shin, Y., Yoo, D. Il & Min, K. Antimicrobial finishing of polypropylene nonwoven fabric by treatment with chitosan oligomer. *Journal of Applied Polymer Science* **74**, 2911–2916 (1999).
261. Xue, Z. Microwave-assisted antimicrobial finishing of wool fabric with chitosan derivative. *Indian Journal of Fibre & Textile Research* **40**, 51–56 (2015).
262. Li, Z., Zhuang, X. P., Liu, X. F., Guan, Y. L. & Yao, K. De. Study on antibacterial O-

- carboxymethylated chitosan/cellulose blend film from LiCl/N, N-dimethylacetamide solution. *Polymer* **43**, 1541–1547 (2002).
263. Ristić, T., Hribernik, S. & Fras-Zemljič, L. Electrokinetic properties of fibres functionalised by chitosan and chitosan nanoparticles. *Cellulose* **22**, 3811–3823 (2015).
 264. Tavaría, F. K., Soares, J. C., Reis, I. L., Paulo, M. H., Malcata, F. X. & Pintado, M. E. Chitosan: antimicrobial action upon staphylococci after impregnation onto cotton fabric. *Journal of Applied Microbiology* **112**, 1034–1041 (2012).
 265. Rahman Bhuiyan, M. A., Hossain, M. A., Zakaria, M., Islam, M. N. & Zulhash Uddin, M. Chitosan coated cotton fiber: Physical and antimicrobial properties for apparel use. *Journal of Polymers and the Environment* **25**, 334–342 (2017).
 266. Sadeghi-Kiakhani, M., Gharanjig, K. & Arami, M. Grafting of prepared chitosan–poly(propylene) imines dendrimer hybrid as a biopolymer onto cotton and its antimicrobial property. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **28**, 78–85 (2015).
 267. Lopes, C., Soares, J., Tavaría, F., Duarte, A., Correia, O., Sokhatska, O., Severo, M., Silva, D., Pintado, M., Delgado, L. & Moreira, A. Chitosan coated textiles may improve atopic dermatitis severity by modulating skin Staphylococcal profile: A randomized controlled trial. *PLoS ONE* **10**, e0142844 (2015).
 268. Fras Zemljič, L., Peršin, Z. & Stenius, P. Improvement of chitosan adsorption onto cellulosic fabrics by plasma treatment. *Biomacromolecules* **10**, 1181–1187 (2009).
 269. Ardila, N., Medina, N., Arkoun, M., Heuzey, M.-C., Ajjí, A. & Panchal, C. J. Chitosan–bacterial nanocellulose nanofibrous structures for potential wound dressing applications. *Cellulose* **23**, 3089–3104 (2016).
 270. Cao, Z., Luo, X., Zhang, H., Fu, Z., Shen, Z., Cai, N., Xue, Y. & Yu, F. A facile and green strategy for the preparation of porous chitosan-coated cellulose composite membranes for potential applications as wound dressing. *Cellulose* **23**, 1349–1361 (2016).
 271. Lin, W.-C., Lien, C.-C., Yeh, H.-J., Yu, C.-M. Hsu, S. Bacterial cellulose and bacterial cellulose–chitosan membranes for wound dressing applications. *Carbohydrate Polymers* **94**, 603–611 (2013).
 272. Wu, Y.-B., Yu, S.-H., Mi, F.-L., Wu, C.-W., Shyu, S.-S., Peng, C.-K. & Chao, A.-C. Preparation and characterization on mechanical and antibacterial properties of chitsoan/cellulose blends. *Carbohydrate Polymers* **57**, 435–440 (2004).
 273. Vikhoreva, G. A., Kil'deeva, N. R., Gorbacheva, I. N., Shablykova, E. A., Rogovina, S. Z. & Akopova, T. A. Study of cellulose-chitosan composites. Solid-phase modification, rheology, films. *Fibre Chemistry* **32**, 402–406 (2000).
 274. Savitskaya, I., Kistaubayeva, A., Digel, I. & Shokatayeva, D. Physicochemical and antibacterial properties of composite films based on bacterial cellulose and chitosan for wound dressing materials. *Eurasian Chemico-Technological Journal* **19**, (2017).
 275. Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C. & McCarron, P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids*

and Surfaces B: *Biointerfaces* **44**, 65–73 (2005).

276. Potthast, A., Rosenau, T. & Kosma, P. Analysis of Oxidized Functionalities in Cellulose In *Polysaccharides II*. (ed. Klemm, D.) 1–48 (Springer Berlin Heidelberg, 2006). doi:10.1007/12_099.
277. Kumar, V. & Yang, T. HNO₃/H₃PO₄–NaNO₂ mediated oxidation of cellulose — preparation and characterization of bioabsorbable oxidized celluloses in high yields and with different levels of oxidation. *Carbohydrate Polymers* **48**, 403–412 (2002).
278. Parks, E. J. & Hebert, R. L. Thermal analysis of ion-exchange reaction products of wood pulps with calcium and aluminum cations. *Tappi Journal* **55**, 1510–1514 (1972).
279. Luxbacher, T. *The Zeta potential for solid surface analysis*. (Anton Paar GmbH, 2014).
280. Sauerbrey, G. Verwendung von schwingquarzen zur wägung dünner schichten und zur mikrowägung. *Zeitschrift für Physik* **155**, 206–222 (1959).
281. Kittle, J. D., Du, X., Jiang, F., Qian, C., Heinze, T., Roman, M. & Esker, A. R. Equilibrium water contents of cellulose films determined via solvent exchange and quartz crystal microbalance with dissipation monitoring. *Biomacromolecules* **12**, 2881–2887 (2011).
282. Rojas, O. J. *Cellulose chemistry and properties: Fibers, nanocelluloses and advanced materials*. (Springer International Publishing, 2016).
283. Kanazawa, K. K. & Gordon, J. G. Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid. *Analytical Chemistry* **57**, 1770–1771 (1985).
284. Craig, V. S. J. & Plunkett, M. Determination of coupled solvent mass in quartz crystal microbalance measurements using deuterated solvents. *Journal of Colloid and Interface Science* **262**, 126–129 (2003).
285. Mohan, T., Spirk, S., Kargl, R., Doliška, A., Vesel, A., Salzmann, I., Resel, R., Ribitsch, V. & Stana-Kleinschek, K. Exploring the rearrangement of amorphous cellulose model thin films upon heat treatment. *Soft Matter* **8**, 9807–9815 (2012).
286. Peršin, Z., Zaplotnik, R. & Stana Kleinschek, K. Ammonia plasma treatment as a method promoting simultaneous hydrophilicity and antimicrobial activity of viscose wound dressings. *Textile Research Journal* **84**, 140–156 (2013).
287. Washburn, E. W. The dynamics of capillary flow. *Physical Review* **17**, 273–283 (1921).
288. Ristić, T., Mohan, T., Kargl, R., Hribernik, S., Doliška, A., Stana-Kleinschek, K. & Fras, L. A study on the interaction of cationized chitosan with cellulose surfaces. *Cellulose* **21**, 2315–2325 (2014).
289. Stana-Kleinschek, K., Ehmann, H. M. A., Spirk, S., Doliška, A., Fasl, H., Fras-Zemljič, L., Kargl, R., Mohan, T., Breitwieser, D. & Ribitsch, V. Cellulose and other polysaccharides surface properties and their characterisation. In *The european polysaccharide network of excellence (EPNOE): Research initiatives and results*. (ed. Navard, P.) 215–251 (Springer Vienna, 2012). doi:10.1007/978-3-7091-0421-7_8.

290. Orelma, H., Filpponen, I., Johansson, L.-S., Laine, J. & Rojas, O. J. Modification of cellulose films by adsorption of CMC and chitosan for controlled attachment of biomolecules. *Biomacromolecules* **12**, 4311–4318 (2011).
291. Roemhild, K., Niemz, F., Mohan, T., Hribernik, S., Kurecic, M., Ganser, C., Teichert, C. & Spirk, S. The cellulose source matters—hollow semi spheres or fibers by needleless electrospinning. *Macromolecular Materials and Engineering* **301**, 42–47 (2016).
292. Stefanovic, B., Rosenau, T. & Potthast, A. Effect of sonochemical treatments on the integrity and oxidation state of cellulose. *Carbohydrate Polymers* **92**, 921–927 (2013).
293. Korica, M., Fras Zemljič, L., Bračić, M., Kargl, R., Spirk, S., Reishofer, D., Mihajlovski, K. & Kostić, M. Novel protein-repellent and antimicrobial polysaccharide multilayer thin films. *Holzforschung* **73**, 93–103 (2019).
294. Cotton fiber chemistry and technology. in *Handbook of fiber chemistry* (ed. Lewin, M.) (Taylor & Francis, 2007).
295. Hussain, Z., Khalaf, M., Adil, H., Zageer, D., Hassan, F., Mohammed, S. & Yousif, E. Metal complexes of Schiff's bases containing sulfonamides nucleus: a review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* **7**, 1008–1025 (2016).
296. Myllytie, P., Salmi, J. & Laine, J. The influence of pH on the adsorption and interaction of chitosan with cellulose. *BioResources* **4**, 1647–1662 (2009).
297. Mishima, T., Hisamatsu, M., York, W. S., Teranishi, K. & Yamada, T. Adhesion of β -d-glucans to cellulose. *Carbohydrate Research* **308**, 389–395 (1998).
298. Zhou, Q., Rutland, M. W., Teeri, T. T. & Brumer, H. Xyloglucan in cellulose modification. *Cellulose* **14**, 625–641 (2007).
299. Hosokawa, J., Nishiyama, M., Yoshihara, K., Kubo, T. & Terabe, A. Reaction between chitosan and cellulose on biodegradable composite film formation. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **30**, 788–792 (1991).
300. Genco, T., Zemljič, L. F., Bračić, M., Stana-Kleinschek, K. & Heinze, T. Characterization of viscose fibers modified with 6-deoxy-6-amino cellulose sulfate. *Cellulose* **19**, 2057–2067 (2012).
301. Horbett, T. A. & Brash, J. L. *Proteins at interfaces II: Fundamentals and applications*. ACS Symposium Series 602 (American Chemical Society, Washington DC, 1995).
302. Kalasin, S. & Santore, M. M. Non-specific adhesion on biomaterial surfaces driven by small amounts of protein adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **73**, 229–236 (2009).
303. Dimilla, P. A., Albelda, S. M. & Quinn, J. A. Adsorption and elution of extracellular matrix proteins on non-tissue culture polystyrene petri dishes. *Journal of Colloid and Interface Science* **153**, 212–225 (1992).
304. Vallée, A., Humblot, V., Housseiny, R. Al, Boujday, S. & Pradier, C.-M. BSA adsorption on aliphatic and aromatic acid SAMs: Investigating the effect of residual surface charge and sublayer nature. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **109**, 136–142 (2013).

305. Rabe, M., Verdes, D. & Seeger, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* **162**, 87–106 (2011).
306. Teramoto, A., Takagi, Y., Hachimori, A. & Abe, K. Interaction of albumin with polysaccharides containing ionic groups. *Polymers for Advanced Technologies* **10**, 681–686 (1999).
307. Elschner, T., Bračić, M., Mohan, T., Kargl, R. & Stana Kleinschek, K. Modification of cellulose thin films with lysine moieties: a promising approach to achieve antifouling performance. *Cellulose* **25**, 537–547 (2018).
308. Kingkaew, J., Kirdponpattara, S., Sanchavanakit, N., Pavasant, P. & Phisalaphong, M. Effect of molecular weight of chitosan on antimicrobial properties and tissue compatibility of chitosan-impregnated bacterial cellulose films. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **19**, 534–544 (2014).
309. Široký, J., Blackburn, R. S., Bechtold, T., Taylor, J. & White, P. Attenuated total reflectance Fourier-transform Infrared spectroscopy analysis of crystallinity changes in lyocell following continuous treatment with sodium hydroxide. *Cellulose* **17**, 103–115 (2010).
310. Schwanninger, M., Rodrigues, J. C., Pereira, H. & Hinterstoisser, B. Effects of short-time vibratory ball milling on the shape of FT-IR spectra of wood and cellulose. *Vibrational Spectroscopy* **36**, 23–40 (2004).
311. Ifuku, S., Tsuji, M., Morimoto, M., Saimoto, H. & Yano, H. Synthesis of silver nanoparticles templated by TEMPO-mediated oxidized bacterial cellulose nanofibers. *Biomacromolecules* **10**, 2714–2717 (2009).
312. Coseri, S., Biliuta, G., Fras Zemljič, L., Stevanic Srndovic, J., Larsson, P. T., Strnad, S. Kreže, T., Naderi, A. & Lindström, T. One-shot carboxylation of microcrystalline cellulose in the presence of nitroxyl radicals and sodium periodate. *RSC Advances* **5**, 85889–85897 (2015).
313. Köstler, S., Ribitsch, V., Stana-Kleinschek, K., Jakopic, G. & Strnad, S. Electrokinetic investigation of polyelectrolyte adsorption and multilayer formation on a polymer surface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **270–271**, 107–114 (2005).
314. Peršin, Z., Devetak, M., Drevenšek-Olenik, I., Vesel, A., Mozetič, M. & Stana-Kleinschek, K. The study of plasma's modification effects in viscose used as an absorbent for wound-relevant fluids. *Carbohydrate Polymers* **97**, 143–151 (2013).
315. Karim, Z., Hakalahti, M., Tammelin, T. & Mathew, A. P. In situ TEMPO surface functionalization of nanocellulose membranes for enhanced adsorption of metal ions from aqueous medium. *RSC Advances* **7**, 5232–5241 (2017).
316. Bezerra, D. S. R. Teixeira, P. R. S., Teixeira, A. S. N. M., Eiras, C., Osajima, J. A. & Filho, E. C. S. Chemical functionalization of cellulosic materials — main reactions and applications in the contaminants removal of aqueous medium. in *Cellulose: Fundamental Aspects and Current Trends* (eds. Poletto, M. & Ornaghi, H.) 93–114 (IntechOpen, 2015). doi:10.5772/61431.
317. Bethke, K., Palantöken, S., Andrei, V., Roß, M., Raghuwanshi, V. S., Kettemann, F., Greis, K., Ingber, T. T. K., Stückrath, J. B., Valiyaveetil, S. & Rademann, K. Functionalized cellulose for water purification, antimicrobial applications, and sensors. *Advanced Functional Materials* **28**, 1800409 (2018).

318. Heinze, T. & Liebert, T. Unconventional methods in cellulose functionalization. *Progress in Polymer Science* **26**, 1689–1762 (2001).
319. Pejić, B. M. Doktorska disertacija: Uticaj različitih faktora fizičko-hemijskog modifikovanja na strukturu i svojstva vlakana konoplje. (Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2009).
320. Emam, H. E. Antimicrobial cellulosic textiles based on organic compounds. *3 Biotech* **9**, 29 (2019).
321. Fras, L., Ristić, T. & Tkavc, T. Adsorption and antibacterial activity of soluble and precipitated chitosan on cellulose viscose fibers. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics* **7**, 155892501200700100 (2012).
322. Khan, A., Othman, M. B. H., Razak, K. A. & Akil, H. M. Synthesis and physicochemical investigation of chitosan-PMAA-based dual-responsive hydrogels. *Journal of Polymer Research* **20**, 273 (2013).
323. Trivedi, P., Saloranta-Simell, T., Maver, U., Gradišnik, L., Prabhakar, N., Smått, J.-H., Mohan, T., Gericke, M., Heinze, T. & Fardim, P. Chitosan–cellulose multifunctional hydrogel beads: Design, characterization and evaluation of cytocompatibility with breast adenocarcinoma and osteoblast cells. *Bioengineering* **5**, 3 (2018).
324. Yang, J., Kwon, G.-J., Hwang, K. & Kim, D.-Y. Cellulose–chitosan antibacterial composite films prepared from LiBr solution. *Polymers* **10**, 1058 (2018).
325. Grande, R., Trovatti, E., Carvalho, A. J. F. & Gandini, A. Continuous microfiber drawing by interfacial charge complexation between anionic cellulose nanofibers and cationic chitosan. *Journal of Materials Chemistry A* **5**, 13098–13103 (2017).
326. Gouda, M., Elayaan, U. & Youssef, M. M. Synthesis and biological activity of drug delivery system based on chitosan nanocapsules. *Advances in Nanoparticles* **3**, 148–158 (2014).
327. Reischl, M., Stana-Kleinschek, K. & Ribitsch, V. Electrokinetic investigations of oriented cellulose polymers. *Macromolecular Symposia* **244**, 31–47 (2006).
328. Kim, K. W. & Thomas, R. L. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. *Food Chemistry* **101**, 308–313 (2007).
329. Xie, W., Xu, P. & Liu, Q. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **11**, 1699–1701 (2001).

Biografija autora

Matea Korica, master inženjer tehnologije, rođena je 14.2.1988. u Osijeku. Osnovnu školu i srednju Zubotehničku školu završila je u Beogradu. Studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2007/2008 godine. Osnovne akademske studije završila je 2011. godine na studijskom programu Tekstilna tehnologija, studijsko područje tekstilni materijali specijalne namene. Iste godine na matičnom fakultetu upisuje master akademske studije, na studijskom programu Tekstilna tehnologija. Doktorske studije na Katedri za tekstilno inženjerstvo upisuje 2013. godine pod mentorstvom prof. dr Mirjane Kostić.

Od marta 2015. zaposlena je kao istraživač u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta na projektu Osnovnih istraživanja ON 172029 pod nazivom “Funkcionalizacija, karakterizacija i primena celuloze i derivata celuloze” koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Kao CEEPUS (Central European Exchange Programme for University Studies) stipendista boravila je, radi stručnog usavršavanja i istraživačkog rada, od aprila do jula 2016. i od septembra do oktobra 2019. na Institutu za inženjerstvo i dizajn materijala Mašinskog fakulteta Univerziteta u Mariboru.

U svom dosadašnjem radu Matea Korica je koautor 7 naučnih radova objavljenih u međunarodnim časopisima, pri čemu su 3 rada iz kategorije M21a, 1 rad iz kategorije M21, 2 rada iz kategorije M22 i 1 rad iz kategorije M24, a saopštila je i 4 rada na međunarodnim naučnim skupovima i 8 radova na naučnim skupovima nacionalnog značaja. Jedan je od pronalazača registrovanog patenta RS 57753 B1, pod nazivom *Biološki aktivna vlakna pamuka sa imobilisanim tripsinom*.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Матеа Корица

Број индекса 4006/2013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Добијање биоактивних наноструктурних материјала на бази целулозе и хитозана“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 15.10.2020.

Матеа Корица

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Матеа Корица

Број индекса 4006/2013

Студијски програм Текстилно инжењерство

Наслов рада „Добијање биоактивних наноструктурних материјала на бази
целулозе и хитозана“

Ментор др Мирјана Костић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској
верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму**
Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског
назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум
одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне
библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 15.10.2020.

Матеа Корица

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Добијање биоактивних наноструктурних материјала на бази целулозе и хитозана“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 15.10.2020.

Матвеј Жорича

ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ
ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације **“Добијање биоактивних наноструктурних материјала на бази целулозе и хитозана”**, аутора **Матее Корице**, мастер инжењера технологије, констатујем да утврђено подударање текста износи 10%. Овај степен подударности последица је цитата, општих места и података, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника. На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

У Београду, 31.08.2020. године

Ментор



Проф. др Мирјана Костић

