

POLITECHNIKA ŚLĄSKA
WYDZIAŁ CHEMICZNY
KATEDRA CHEMII ORGANICZNEJ, BIOORGANICZNEJ
I BIOTECHNOLOGII

mgr Regina Michalik

ROZPRAWA DOKTORSKA

Synteza, charakterystyka i wykorzystanie
pochodnych chitozanu do otoczkowania
nawozów na bazie azotanu(V) amonu

Promotor: dr hab. inż. Ilona Wandzik, prof. Politechniki Śląskiej

Opiekun przemysłowy: inż. Krzysztof Koziół

Gliwice, 2023 r.

Praca wykonana w ramach III Edycji programu „Doktorat wdrożeniowy”

Ministerstwa Edukacji i Nauki

Podziękowania

*Pani dr hab. inż. Ilonie Wandzik, prof. Politechniki Śląskiej
za poświęcony czas, cenne rady i sugestie dotyczące pracy doktorskiej, wszelką
pomoc, cierpliwość i wsparcie.*

*Pracownikom Departamentu Rozwoju
Grupy Azoty Zakłady Azotowe Kędzierzyn S.A.
za pomoc i wsparcie w realizacji niniejszej pracy.*

Spis treści

Wykaz skrótów, akronimów i symboli.....	3
CEL I ZAKRES PRACY	4
PRZEGLĄD LITERATURY	6
1. Nawozy o kontrolowanym i spowolnionym uwalnianiu	6
2. Polimery biodegradowalne do otoczkowania nawozów	7
3. Techniki powlekania nawozów	8
4. Badanie szybkości wymywania składników odżywczych z otoczkowanych nawozów	11
5. Chitozan – budowa, otrzymywanie, właściwości i zastosowanie w rolnictwie	12
6. Zastosowanie hydrożeli chitozanowych w rolnictwie.....	15
7. Mieszanki głęboko eutektyczne, klasyfikacja, metody przygotowywania.....	20
7.1. Mieszanki głęboko eutektyczne jako plastyfikatory folii chitozanowych.....	23
OMÓWIENIE WYNIKÓW	26
1. Wprowadzenie.....	26
2. Ocena właściwości fizykochemicznych chitozanu.....	26
2.1 Oznaczanie stopnia deacetylacji chitozanu	26
2.2 Oznaczenie masy molowej chitozanu.....	34
2.3 Badania rozpuszczalności chitozanu, określenie lepkości przygotowanych roztworów ...	36
3. Modyfikacja chitozanu - reakcje czwartorzędowania	37
4. Modyfikacja chitozanu - reakcje karboksymetylowania	44
5. Otrzymywanie koacerwatów	48
6. Zastosowanie mieszanin głęboko eutektycznych jako plastyfikatorów do folii chitozanowych ..	54
PODSUMOWANIE I WNIOSKI	60
CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	63
1. Aparatura oraz odczynniki	63
1.1. Aparatura pomiarowa i sprzęt pomocniczy	63
1.2. Odczynniki	63
2. Opis stosowanych procedur badawczych.....	64
2.1. Oznaczanie stopnia deacetylacji chitozanu	64
2.2. Oznaczenie masy molowej chitozanu.....	68
2.3. Badania rozpuszczalności chitozanu, określenie lepkości przygotowanych roztworów ...	68
2.4. Otrzymywanie pochodnych chitozanu	68
2.5. Otrzymywanie koacerwatów	72
2.6. Otrzymywanie mieszanin głęboko eutektycznych, modyfikacja roztworów chitozanowych za pomocą mieszanin głęboko eutektycznych.....	73
SPIS RYSUNKÓW ORAZ TABEL	75

LITERATURA	78
STRESZCZENIE	92
SUMMARY	93
DOROBEK NAUKOWY.....	94

Wykaz skrótów, akronimów i symboli

Skrót/akronim/symbol	Termin w języku polskim	Termin w języku angielskim
AA	Kwas akrylowy	Acrylic acid
AM	Akrylamid	Acrylamide
CC	Chlorek choliny	Choline chloride
CMC	Karboksymetylochitozan	Carboxymethyl chitosan
CRF	Nawozy o kontrolowanym uwalnianiu	Controlled Release Fertilizers
CS	Chitozan	Chitosan
DA	Stopień acetylacji	Degree of acetylation
DD	Stopień deacetylacji	Degree of deacetylation
DES	Rozpuszczalniki głęboko eutektyczne	Deep eutectic solvents
DS	Stopień podstawienia	Degree of substitution
DQ	Stopień czwartorzędowania	Degree of quaternization
GA	Aldehyd glutarowy	Glutaraldehyde
GE	Glikol etylenowy	Ethylene glycol
GlcN	D-glukozamina	D-glucosamine
GlcNAc	N-acetylo-D-glukozamina	N-acetyl-D-glucosamine
GPC/SEC	Chromatografia żelowa/Chromatografia wykluczania	Gel Permeation Chromatography/Size Exclusion Chromatography
GTMAC	Chlorek glicydylotrimetyloamoniowy (Chlorek 2,3-epoksypropylo-trimetyloamoniowy)	Glycidyltrimethylammonium chloride ((2,3-epoxypropyl)trimethylammonium chloride)
HACC	2-hydroksypropylo-3-trimetyloamoniowy chlorek chitozanu	2-hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan
HBA	Akceptor wiązań wodorowych	Hydrogen bond acceptor
HBD	Donor wiązań wodorowych	Hydrogen bond donor
MBA	<i>N,N'</i> -metylenobisakrylamid	<i>N,N'</i> -methelenebisacrylamide
M _w	Masa molowa	Molecular weight
PVA	Alkohol poliwinylowy	Polyvinyl alcohol
RSD	Względne odchylenie standardowe	Relative standard deviation
SD	Odchylenie standardowe	Standard deviation
SRF	Nawozy o powolnym uwalnianiu	Slow release fertilizers
TPP	Tripolifosforan sodu	Sodium tripolyphosphate
U	Mocznik	Urea

CEL I ZAKRES PRACY

Grupa Azoty Zakłady Azotowe Kędzierzyn S.A. jest znaczącym producentem granulowanych nawozów saletranych. Nawozy wytwarzane w Grupie Azoty Zakłady Azotowe Kędzierzyn S.A. charakteryzują się bardzo wysoką jakością i cieszą się dużym uznaniem na rynku krajowym, a także na rynkach zagranicznych. Mimo jednoznacznie pozytywnej oceny obecnego stanu technologii wytwarzania granulowanych nawozów saletranych w Grupie Azoty Zakłady Azotowe Kędzierzyn S.A. konieczne są dalsze działania zmierzające do usprawnienia procesów produkcyjnych oraz poprawy jakości produktów.

Zwiększone zapotrzebowanie na żywność związane z rosnącym globalnym zaludnieniem wymaga intensyfikacji pól rolnych. Zastosowanie dużych ilości nawozów sztucznych zawierających składniki odżywcze i pestycydów oraz systemów nawadniania zaowocowało znacznym wzrostem produkcji zbóż na świecie, jednak nadmierna chemizacja w rolnictwie przyczynia się także do negatywnych zjawisk takich jak eutrofizacja, efekt cieplarniany czy wysalanie gleb. Przenawożenie gleb przyczynia się do przedostawania składników pokarmowych do wód gruntowych rzek i zbiorników wodnych. W celu złagodzenia tych problemów, we współczesnym rolnictwie wprowadza się nawozy o kontrolowanym i spowolnionym uwalnianiu – CRF i SRF (*ang. Controlled Release Fertilizers i Slow Release Fertilizers*). Nawozy te produkowane są w celu zwiększenia efektywności wykorzystania składników odżywczych, pozwalają ograniczyć dawkowanie, nazywane są również „przyjaznym dla środowiska nawozem” ze względu na to, że w znacznym stopniu przyczyniają się do ograniczenia potencjalnych zanieczyszczeń.

Jednym ze sposobów wytwarzania CRF jest otoczkowanie nawozów. Polega to głównie na natryskiwaniu warstwy lub kilku warstw materiału otoczkującego na powierzchnię granuli nawozu, w celu utworzenia otoczki o niskiej przepuszczalności. Komercyjne CRF z powłokami polimerowymi wykorzystujące materiały syntetyczne mogą być trudne do degradacji, co przyczynia się do ich gromadzenia w glebie. Poza tym większość polimerów wymaga rozpuszczalnika organicznego takiego jak dichlorometan, *N,N*-dimetyloformamid czy chloroform, które są szkodliwe dla środowiska. Ponadto w Unii Europejskiej, w celu rozwiązania problemów nawozów i zrównoważonego nawożenia, opracowano Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2019/1009 z dn. 5.06.2019 r. Rozporządzenie to ustanawia przepisy dotyczące udostępniania na rynku produktów nawozowych w Unii Europejskiej, które obowiązują od 16.07.2022 r. Wprowadzają one zasady, że wszystkie nawozy i komponenty nawozowe muszą spełniać odpowiednie wymagania jakościowe, a co najważniejsze, od 07.2026 r. materiały składowe jakimi są powłoki organiczne powinny wykazywać się wysoką biodegradowalnością. W celu stworzenia optymalnych i nowoczesnych nawozów, niezbędne jest opracowanie biodegradowalnej otoczki, z materiałów przyjaznych dla środowiska i bezpieczniejszych, które mogą zapewnić lepszą wydajność w kontrolowaniu szybkości uwalniania. W takich

zastosowaniach zainteresowanie wzbudził chitozan i jego pochodne, które wykazują dobrą biodegradację. Ponadto chitozan ma właściwości przeciwdrobnoustrojowe i może być komercyjnie produkowany z naturalnie regenerujących się zasobów, takich jak odpady muszli z owoców morza. Celem zrównoważonego rolnictwa jest zwiększenie produktywności, przy jednoczesnym jak najmniejszym niszczeniu środowiska. Obecnie rosnące zainteresowanie ochroną środowiska spowodowało wzrost zainteresowania polimerami pochodzenia naturalnego, a przynajmniej wzbogacaniem materiałów syntetycznych w naturalne, biodegradowalne składniki.

W związku z tym badania prowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej koncentrowały się wobec biopolimeru – chitozanu i obejmowały realizację następujących etapów:

- 1) Ocena surowca – określenie właściwości chitozanu: stopnia deacetylacji, masy molowej oraz lepkości.
- 2) Synteza pochodnych chitozanu i wykorzystanie ich w przygotowaniu koacerwatów.
- 3) Opracowanie metod otrzymywania folii chitozanowych z dodatkiem mieszanin głęboko eutektycznych, badania rozpuszczalności folii.
- 4) Opracowanie metody otoczkowania nawozu na bazie azotanu(V) amonu dostępnego w Grupie Azoty Zakłady Azotowe Kędzierzyn S.A. – Salmagu za pomocą zsyntezowanych pochodnych chitozanu oraz roztworów chitozanu z dodatkiem mieszanin głęboko eutektycznych.
- 5) Charakterystyka otoczkowanych nawozów na bazie azotanu(V) amonu.
- 6) Badanie szybkości wymywania składników odżywczych z otoczkowanych nawozów na bazie azotanu(V) amonu.

Praca doktorska została podzielona na dwie części: część jawną oraz część tajną. Część jawna pracy doktorskiej obejmuje opis realizacji etapów 1-3, natomiast część tajna pracy doktorskiej obejmuje opis realizacji etapów 4-6 oraz analizę rynkową otoczkowanych nawozów mineralnych o kontrolowanym i spowolnionym działaniu.

Ponadto temat pracy doktorskiej jest również przewidziany w Planie Prac Badawczych i Rozwojowych Grupy Azoty Zakłady Azotowe Kędzierzyn S.A.

PRZEGLĄD LITERATURY

1. Nawozy o kontrolowanym i spowolnionym uwalnianiu

Przewiduje się, że do 2050 roku światowa populacja wzrośnie o ponad jedną trzecią, czyli o 2,3 miliarda (High Level Expert Forum (HLEF), raport „Global agriculture towards 2050”). W miarę wzrostu populacji oczekuje się również wzrostu popytu na żywność. Jednym z głównych wyzwań obecnego rolnictwa jest poszukiwanie nowych metod zwiększania plonów i jakości upraw przez zrównoważone rolnictwo. Stosowanie nawozów rolniczych jest jedną z metod, która pomoże w zaspokojeniu tego zapotrzebowania. Nawozy dostarczają roślinom składników odżywczych, poprawiają plony, co skutkuje wykładniczym wzrostem zużycia nawozów na całym świecie. Azot (N) jest najistotniejszy dla wzrostu roślin – to podstawowy składnik odżywczy, który decyduje o wzroście roślin i plonów większości upraw. Większość azotu jest jednak tracona do środowiska w wyniku denitryfikacji, immobilizacji, wymywania i ulatniania się [1]. Straty te powodują zanieczyszczenie środowiska, a także niekorzystne konsekwencje gospodarcze. Złożoność przemian azotu w glebie prowadzi ostatecznie do produkcji azotanów(V), które jeśli nie zostaną wchłonięte przez rośliny, są łatwo wypłukiwane przez glebę i zanieczyszczają podziemne warstwy wodonośne [2], [3].

Terminy CRF i SRF są używane do opisu nawozów nowej generacji. Oba dostarczają składników odżywczych przez pewien czas, ale są zupełnie innymi produktami. SRF, w przeciwieństwie do CRF, nie są otoczkowane. Obejmują one nawozy roślinne, nawozy zwierzęce i kompost, które muszą zostać rozłożone przez aktywność drobnoustrojów, zanim zostaną uwolnione składniki odżywcze. Do SRF zalicza się również nawozy niepowlekanie na bazie azotu – produkty kondensacji mocznika z aldehydami. Największe praktyczne znaczenie mają nawóz mocznikowo-formaldehdowy, izobutylidenodimocznik i krotolidenodimocznik. W przypadku SRF uwalnianie azotu zachodzi głównie przy udziale mikroorganizmów glebowych, dlatego jest silnie uzależnione od aktywności mikrobiologicznej gleby i w związku z tym czas uwalniania nie może być kontrolowany. Skuteczność mikroorganizmów zależy od innych czynników, takich jak rodzaj gleby, poziom jej wilgotności czy też temperatury [4], [5], [6]. Z kolei CRF różnią się zasadniczo od SRF zarówno pod względem technologii, jak i sposobu uwalniania składników odżywczych. CRF są nawozami otoczkowanymi, gdzie uwalnianie substancji odżywczych kontrolowane jest przez barierę fizyczną. Ze względu na materiały użyte do wytworzenia otoczki nawozy te dzieli się na otoczkowane a) siarką, b) siarką i polimerami organicznymi, tj. poliolefinami (polietylen i polipropylen) lub żywicami (alkidowe i poliuretanowe), c) polimerami organicznymi. Składniki odżywcze są uwalniane z CRF w przewidywalnym i trwałym tempie. Otoczka na nawozach działa jak selektywnie przepuszczalna lub półprzepuszczalna membrana. Po umieszczeniu CRF na odpowiednio wilgotnym podłożu uprawowym następuje jednokierunkowe przejście wody przez powłokę do wnętrza granuli. Zjawisko to nazywa się osmozą. Wchłonięta woda częściowo rozpuszcza mineralne składniki odżywcze wewnątrz granuli, tworząc wysoko stężony

roztwór. Zwiększa to ciśnienie hydrostatyczne w otoczkowanym nawozie. Nawóz dostaje się do podłoża uprawowego dzięki dyfuzji (ruch cząsteczek z cieczy o wyższym stężeniu do cieczy o niższym stężeniu). Kiedy rośliny są podlewane, ciśnienia hydrostatyczne stają się nierówne wewnątrz i na zewnątrz granulki, a niewielka ilość rozpuszczonego składnika odżywczego przemieszcza się, poprzez dyfuzję, przez mikropory w strukturze otoczki, do podłoża uprawowego. Szybkość uwalniania składników odżywczych z CRF jest w większości przypadków związana z temperaturą. Jej wzrost powoduje, że mikropory rozszerzają się, umożliwiając dyfuzję większej ilości składników odżywczych. Składniki odżywcze są następnie rozpraszane w podłożu uprawowym. Czas uwalniania składników odżywczych zależy również od grubości otoczki [7], [8], [9].

Nawozy azotowe o zwiększonej wydajności, takie jak nawozy SRF lub CRF, są alternatywą dla osiągnięcia wyższej wydajności agronomicznej niż nawozy tradycyjne. Zapewniają bezpieczniejszy, bardziej ekonomiczny i wydajny sposób podawania składników odżywczych, ponieważ są one udostępniane w pożądanym tempie lub stężeniu, dzięki czemu dłużej utrzymują składniki odżywcze w glebie. Pomaga to poprawić efektywność wykorzystania składników odżywczych przez rzadsze dozowanie. Chociaż wymagana szybkość uwalniania składników odżywczych z systemów CRF/SRF różni się dla każdej rośliny w zależności od wymagań metabolicznych uprawy, Europejski Komitet Normalizacyjny przedstawił zalecenia dotyczące kryteriów CRF/SRF: nie więcej niż 15% składników odżywczych uwalnianych w ciągu 24 godzin, nie więcej niż 75% składników odżywczych uwalnianych w ciągu 28 dni i co najmniej 75% składników odżywczych uwalnianych w podanym czasie uwalniania [10].

Mimo zalet nawozów CRF i SRF należy pamiętać o problemach z ich stosowaniem. Pierwszym czynnikiem ograniczającym użycie tego typu nawozów jest ich cena – znacznie wyższa od tradycyjnych nawozów. Drugim czynnikiem ograniczającym jest problem gromadzenia się w glebie substancji, z których wykonane zostały otoczki polimerowe. Powlekanie polimerem nawozy wykorzystujące materiały syntetyczne mogą być trudne do degradacji, co przyczynia się do zanieczyszczenia gleb. Chociaż syntetyczne polimery można dostosować i modyfikować w celu uzyskania pożądaných właściwości CRF, polimery nieulegające biodegradacji mają negatywny wpływ na środowisko.

2. Polimery biodegradowalne do otoczkowania nawozów

Biodegradowalne polimery są ekologicznymi produktami uzyskiwanymi z zasobów odnawialnych. Ich zastosowanie jako powłoki ma wiele zalet w stosunku do syntetycznych polimerów ze względu na ich tani, łatwy dostęp oraz biodegradowalność. W związku z tym preparaty na bazie biopolimerów znajdują się w czołówce badań nad SRF/CRF [1], [11], [12]. Tabela 1 przedstawia zalety i wady naturalnych biopolimerów, które są najczęściej stosowane do otoczkowania nawozów.

Tabela 1. Zalety i wady polimerów biodegradowalnych stosowanych do otoczkowania nawozów.

Material stosowany do otoczkowania	Zalety	Wady	Lit.
Chitozan	- otrzymywany z chityny (drugiego najbardziej rozpowszechnionego polisacharydu na Ziemi) - nietoksyczny - degradowalny - zdolny do tworzenia filmów	- rozpuszczalny tylko w rozcieńczonych kwasach	[13], [14], [15], [16]
Skrobia	- tania - nietoksyczna - degradowalna	- ma słabą zdolność błonotwórczą i wodoodporność - łatwo ulega degradacji w glebie	[13], [17]
Celuloza	- najbardziej rozpowszechniony polisacharyd na Ziemi - nietoksyczna - degradowalna - zdolna to tworzenia filmów	- ograniczona rozpuszczalność - konieczna jest jej modyfikacja do odpowiednich pochodnych, takich jak etery celulozy i estry celulozy	[18], [19], [20], [21]
Lignina	- tania - łatwo dostępna - może tworzyć kompleksy	- jest nierozpuszczalna w wodzie, często rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych, takich jak dioksan, dimetyloulfotlenek (DSMO), tetrahydrofuran (THF), co powoduje niekorzystne skutki dla środowiska	[20], [21], [22], [23]
Alginian sodu	- łagodnie żeluje z dodatkiem Ca^{2+} w roztworze wodnym - nietoksyczny - degradowalny	- wrażliwy na pH - ma słabą wytrzymałość mechaniczną/ jest nietrwały	[24], [25]

Polimery naturalne są powszechnie stosowane z innymi materiałami do tworzenia kompozytów, ponieważ same polimery naturalne nie mają odpowiedniej wytrzymałości mechanicznej i innych właściwości idealnych dla CRF. W związku z tym najczęściej przygotowano typ nawozu, który posiada strukturę trójwarstwową, gdzie rdzeniem jest nawóz, powłoką wewnętrzną biopolimer, a powłoką zewnętrzną polimer syntetyczny. Oprócz powolnego uwalniania azotu nawozy te miały też zdolność zatrzymywania wody, co poprawia efektywność wykorzystania nawozów i zasobów wodnych w tym samym czasie. Jako polimery syntetyczne najczęściej wykorzystuje się do tych celów: kopolimery kwas akrylowy (AA) – akrylamid (AM) [26], [27], [28], PAA [29], [30], [31], [32], alkohol poliwinylowy (PVA) [33] czy PAA i PVA [34].

3. Techniki powlekania nawozów

Metody powlekania nawozów o kontrolowanym uwalnianiu można podzielić na metody fizyczne (powlekanie natryskowe przy użyciu bębna obrotowego, granulatora talerzowego, technologii

złoża fluidalnego, topnienia i wytłaczania) lub metody chemiczne (polimeryzacja w roztworze, odwrócona polimeryzacja suspensyjna i promieniowanie mikrofalowe) [7], [35], [36], co przedstawia Tabela 2.

Techniki powlekania natryskowego są dobrze znane, rozwinięte i wdrażane komercyjnie. Są to procesy ciągłe o niskich kosztach operacyjnych, łatwo skalowalne, co czyni je atrakcyjnymi dla procesów na skalę przemysłową [37], [38]. Z drugiej strony techniki te mają również wady. Powłoki natryskiwane tworzą bardziej porowate membrany, co może sprawić, że ich struktura jest trudna do przewidzenia. Powlekanie w bębnie obrotowym jest jedną z najpowszechniejszych technik stosowanych do komercyjnego wytwarzania CRF ze względu na swoją prostotę. Technika ta wykorzystuje obracający się bęben, który zawiera granulki nawozu i jest spryskiwany roztworem polimeru za pomocą dysz. Zastosowanie ciepłego powietrza (przedmuchiwanie mokrej powłoki) pozwala na skrócenie czasu schnięcia. Powlekanie w bębnie obrotowym wymaga dużej ilości surowców, aby uzyskać jednorodną powłokę – proces ten ma niską skuteczność powlekania, w wyniku czego marnuje się dużo materiału powlekającego, aby uzyskać dobrą powłokę na powierzchni granulek. Co za tym idzie – zwiększa się koszt surowców. Z drugiej strony, w przypadku powlekania w granulatorze talerzowym, roztwór powlekający jest natryskiwany na granule nawozowe w wysokiej temperaturze powietrza w celu wysuszenia, a co za tym idzie, skutkuje to często słabą jakością powłoki z powodu złego utrzymania wilgotności podczas produkcji. Technologia natryskiwania w złożu fluidalnym zapewnia bardziej jednorodne powłoki dzięki zastosowaniu stopionych lub ciekłych materiałów powłokowych. Pozwala również na szerszy wybór materiałów powłokowych, zarówno bezrozpuszczalnikowych, rozpuszczalnikowych, hydrofilowych jak i hydrofobowych [39], [40], [41]. Proces jest kontrolowany poprzez regulację wielu zmiennych, takich jak szybkość natryskiwania, cykl powlekania i temperatura [42]. Wadami technologii natryskiwania w złożu fluidalnym są drogi sprzęt, długi czas powlekania, podatność na blokowanie filtra, większe ryzyko eksplozji rozpuszczalnika i słaba wydajność dla granulek o większym rozmiarze. Problematiczne może być też używanie rozpuszczalników organicznych w celu rozpuszczenia polimerów i kontrolowania szybkości parowania i lepkości powłoki, co wpływa na przyczepność i trwałość powłoki. Również parowanie rozpuszczalnika organicznego stanowi zagrożenie dla zdrowia człowieka i środowiska. Jednakże powlekanie w złożu fluidalnym może pomóc zminimalizować straty roztworu i sprawić, że metoda powlekania fizycznego będzie bardziej przystępna cenowo. Takie podejście wiąże się z wysokimi kosztami inwestycyjnymi, ale nie jest idealne w przypadku granulek o coraz większych rozmiarach.

Do przygotowania nawozów CRF wykorzystano również przyjazne dla środowiska techniki, takie jak topnienie i wytłaczanie przy użyciu wytłaczarek jedno- lub dwuślimakowych – metoda ta jest łatwa, tania i nie wymaga wysokich ciśnień [21], [43], [44]. Do wad tego rozwiązania możemy natomiast zaliczyć cenę sprzętu (drogi) oraz używanie topliwych klejów.

Procesy chemiczne z kolei obejmują polimeryzację w roztworze, odwróconą polimeryzację suspensyjną oraz promieniowanie mikrofalowe [7], [35]. Polimeryzację w roztworze przeprowadza się przez zmieszanie monomeru i inicjatora, które muszą być rozpuszczalne w wybranym rozpuszczalniku. Zastosowany rozpuszczalnik zmniejsza lepkość mieszaniny reakcyjnej, jednak trudno jest go odzyskać. Możliwość ponownego użycia rozpuszczalnika to ważny aspekt kosztów syntezy. Odwrócona polimeryzacja suspensyjna wykorzystuje hydrofilowe monomery i inicjatory zdyspergowane jednorodnie w fazie węglowodorowej (woda w oleju) i wymaga ciągłego mieszania, ponieważ jest niestabilna termodynamicznie [45]. W tej metodzie rozpuszczalnik można odzyskać, co pozwala na obniżenie kosztów. Z drugiej strony może wystąpić zanieczyszczenie, co wymaga dalszych procesów jego oczyszczenia przed jego ponownym użyciem. W wyniku promieniowania mikrofalowego powstają makrorodniki. Rekombinacja powstałych makrorodników na różnych łańcuchach prowadzi do powstania wiązań kowalencyjnych i struktur usieciowanych [46], [47]. Zaletą tej metody jest to, że nie wymaga użycia rozpuszczalników organicznych.

Tabela 2. Podsumowanie technik powlekania nawozów.

	Technika powlekania nawozów	Zalety	Wady
Metody fizyczne	Bęben obrotowy	- proces ciągły - niskie koszty operacyjne - możliwość skalowania	- wymaga dużej ilości materiałów powlekających w celu uzyskania jednolitej powłoki
	Granulator talerzowy	- proces ciągły - niskie koszty operacyjne - możliwość skalowania	- wysoka temperatura powietrza do suszenia - złe utrzymanie poziomu wilgotności
	Złoże fluidalne	- proces ciągły - niskie koszty operacyjne - bardziej jednolita powłoka - szerszy wybór materiałów do natrysku	- drogi sprzęt - długi czas otoczkowania - podatny na blokowanie filtra - większa szansa wybuchu (zależne od rozpuszczalnika) - niższa wydajność przy większym rozmiarze granulek
	Topnienie i wytłaczanie	- brak konieczności użycia rozpuszczalników	- konieczność użycia topliwych klejów - drogi sprzęt
Metody chemiczne	Polimeryzacja w roztworze/sieciowanie	- rozpuszczalnik zmniejsza lepkość (łatwiejszy w obróbce) - łatwa modyfikacja materiału	- umiarkowana szybkość reakcji i wydajność - utrudniony odzysk rozpuszczalnika
	Odwrócona polimeryzacja suspensyjna	- łatwa modyfikacja materiału - wysoka wydajność, dzięki dużej szybkości reakcji - można odzyskać rozpuszczalnik, co zmniejsza koszty	- należy oczyścić rozpuszczalnik przed ponownym użyciem - należy przeprowadzić separację w celu oczyszczenia polimeru
	Promieniowanie mikrofalowe	- nie wymaga użycia rozpuszczalników organicznych	- nie jest szeroko stosowane w przygotowywaniu CRF

4. Badanie szybkości wymywania składników odżywczych z otoczkowanych nawozów

W celu zbadania szybkości uwalniania składników odżywczych z otoczkowanych nawozów wykorzystuje się wodę, glebę lub oba systemy (Tabela 3).

Tabela 3. Badanie szybkości uwalniania składników odżywczych z otoczkowanych nawozów.

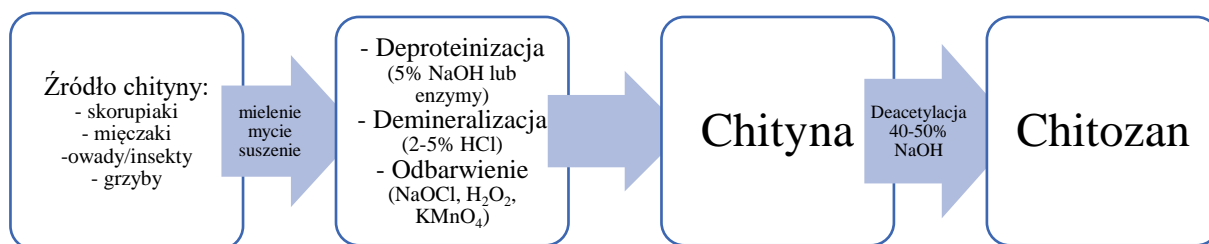
Rodzaj otoczkowanego nawozu	Rodzaj otoczki	Warunki uwalniania	Metoda oznaczenia	Rezultat (% uwolnienia)	Lit.
NPK	Chitozan (przyklejony do granulek za pomocą żywicy epoksydowej rozpuszczonej w acetonie)	Gleba	Oznaczenie N, P i K	<15%/3 dni, <75%/30 dni	[26]
KNO ₃	Hydrożel PVA, PVA/chitozanowy i chitozanowy	H ₂ O _{dest}	Oznaczenie K	53-80%/6 dni	[33]
		Gleba	Oznaczenie K	9-24%/8 dni	
KNO ₃	Hydrożel chitozanowo-skrobiowy	H ₂ O _{dest}	Pomiar przewodności	80-95%/14 dni	[13]
KH ₂ PO ₄	Guma gellan/chitozan	H ₂ O _{dest}	Pomiar przewodności	100%/8 h	[14]
Mocznik	Hydrożel fibroina/żelatyna/chitozan	H ₂ O _{dest}	Oznaczenie mocznika	58-92%/30 dni	[16]
NPK (KH ₂ PO ₄ i NH ₄ NO ₃)	Superchłonny polimer (polimeryzacja AA i chitozanu)	H ₂ O _{dest}	Pomiar przewodności	250uS/4,5 h	[31]
		Gleba	Oznaczenie N, P i K	<15%/3 dni <75%/30 dni	
KNO ₃	Gлина montmorylonitowa/chitozan	H ₂ O _{dest}	Oznaczenie K	100%/2 h	[48]
KNO ₃	Hydrożel chitozanowo-skrobiowy	H ₂ O _{dest}	Pomiar przewodności	25-35%/5 h	[49]
Mocznik	Chitozan sieciowany genipiną	H ₂ O _{dest}	Pomiar współczynnika załamania światła	80-95%/7 dni	[50]
Mocznik	Chitozan sieciowany aldehydem salicylowym	H ₂ O _{dest}	Oznaczenie mocznika	75%/11 dni, 100%/34 dni	[51]
NPK	PVA, chitozan (warstwa wewnętrzna), AA i AM (warstwa zewnętrzna)	H ₂ O _{dest}	Oznaczenie N, P i K	84%, 62%, 36% (odpowiednio dla N, P, K)/30 dni	[52]
(NH ₄) ₃ PO ₄	Kompozyty chitozanowo-gliniaste (powłoka wewnętrzna), воск parafinowy (powłoka zewnętrzna)	H ₂ O _{dest}	Oznaczenie P	100%/16 h	[53]
		Gleba	Oznaczenie P	<40%/30 dni	

Większość badaczy wybiera wodę destylowaną jako środowisko do testów uwalniania. Należy pamiętać o tym, że przebieg uwalniania w wodzie może znacząco różnić się od tego w glebie. Wiąże się to z dużymi różnicami występującymi pod względem właściwości gleby i warunków klimatycznych. Dlatego woda destylowana, która jest łatwo dostępnym środowiskiem uwalniania, może służyć do wstępnego porównania wyników. Konwencjonalną metodą oznaczania wymywania substancji odżywczych z otoczkowanych nawozów jest próba statyczna (bez mieszania), w której pewną ilość nawozu umieszcza się w odpowiedniej ilości wody destylowanej. Badania uwalniania prowadzi się też w warunkach dynamicznych (intensywne mieszanie na mieszadle magnetycznym) – PN-EN-13266 „Nawozy wolnodziałające. Oznaczanie uwalniania składników odżywczych. Metoda dla nawozów otoczkowanych”. Według wymienionej normy pomiary polegają na umieszczeniu otoczkowanego nawozu (10 g) w określonej ilości wody destylowanej (500 ml), mieszaniu za pomocą mieszadła magnetycznego (300 rpm/min), zdekantowaniu roztworu po określonym czasie i jego analizie chemicznej.

Metody określania szybkości uwalniania składników odżywczych przez nawozy otoczkowane zwykle opierają się na analizach chemicznych, które często są czasochłonne i/lub drogie. Opublikowane artykuły na ten temat różnią się znacznie pod względem stosowanych metod i aparatury. Pomiar składników odżywczych jest nadal najwyższym kosztem w ocenie szybkości uwalniania, pomimo różnych dostępnych opcji analitycznych. Obecnie dostępne opcje dla azotu (N) to metoda Kjeldahla, metoda Dumasa, kolorymetryczne oznaczanie NH_4^+ lub NO_3^- , ubytek masy granul. Analiza charakterystyki uwalniania CRF wymaga pomiarów w różnym czasie i generuje dużą liczbę próbek.

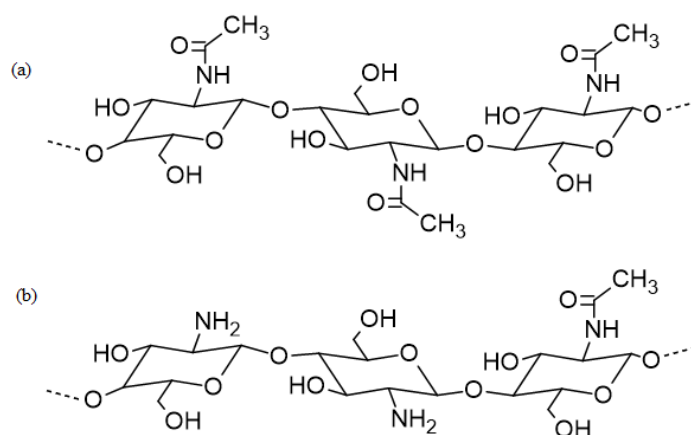
5. Chitozan – budowa, otrzymywanie, właściwości i zastosowanie w rolnictwie

Chitozan to biopolimer wytwarzany z chityny, drugiego najbardziej rozpowszechnionego polisacharydu na Ziemi [54]. Chityna jest obecna w egzoszkieletach skorupiaków i mięczaków morskich, takich jak kraby, krewetki, homary oraz egzoszkieletach owadów, a także w ścianach komórkowych niektórych grzybów. Proces produkcji chityny z muszli krewetek i krabów obejmuje trzy główne etapy: demineralizację, deproteinizację i dekoloryzację (Rysunek 1). Białka usuwa się ze zmielonych skorup, traktując je wodorotlenkiem sodu lub trawiąc enzymami proteolitycznymi (papaina, pepsyna czy tripsyna). Minerale, takie jak węglan wapnia i fosforan wapnia, ekstrahuje się kwasem solnym. Pigmenty, takie jak melanina i karotenoidy są eliminowane za pomocą rozcieńzonego roztworu nadmanganianu potasu, podchlorynu sodu lub nadtlenu wodoru [55], [56], [57], [58].



Rysunek 1. Schemat ideowy otrzymywania chityny i chitozanu.

W wyniku chemicznej lub enzymatycznej deacetylacji chityny otrzymuje się chitozan, który składa się z dwóch rodzajów podjednostek: D-glukozaminy i N-acetylo-D-glukozaminy połączonych ze sobą wiązaniami β -1,4-glikozydowymi (Rysunek 2). Określenie „chitozan” nie jest jednoznacznie związane z określonym związkiem, ale z grupą dostępnych komercyjnie biopolimerów, które różnią się pod względem stopnia deacetylacji, masy cząsteczkowej, stopnia polimeryzacji czy lepkości [58], [59].



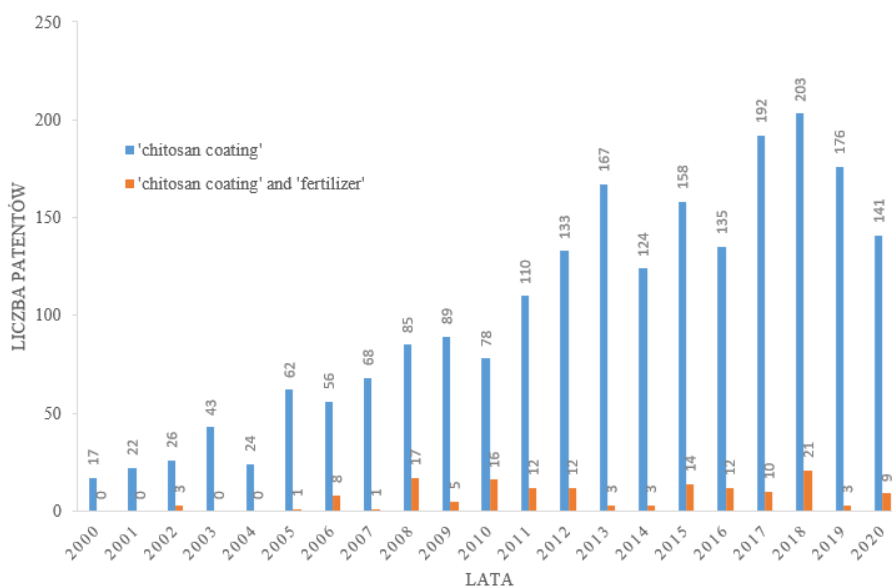
Rysunek 2. Struktura (a) chityny i (b) chitozanu.

Pozyskiwanie chityny i chitozanu jest ekonomicznie opłacalne, ponieważ w przemyśle spożywczym muszle skorupiaków traktuje się w zasadzie jako odpad. Oprócz taniego wytwarzania chitozan posiada również inne właściwości, takie jak nietoksyczność, biokompatybilność i biodegradowalność, które sprawiają, że chitozan jest przyjazny dla środowiska.

Chitozan jest szeroko stosowany w rolnictwie ze względu na swoją aktywność biologiczną. Wykazuje on właściwości przeciwwirusowe, przeciwrzybicze i przeciwbakteryjne. Ponadto wywołuje u roślin liczne reakcje obronne związane ze stresem abiotycznym i biotycznym [60], [61]. Działanie przeciwdrobnoustrojowe chitozanu różni się w zależności od stopnia deacetylacji, masy molowej, stężenia, pH roztworu, lepkości i docelowego mikroorganizmu [62], [63]. Oprócz wykorzystania działania przeciwdrobnoustrojowego chitozanu zastosowano go w glebie jako składnik odżywczy roślin – wykazał wysoką skuteczność w połączeniu z innymi nawozami, bez wpływu na mikroorganizmy gleby [61].

Rolnicze zastosowanie chitozanu może być zróżnicowane, począwszy od ochrony roślin przed różnymi mikroorganizmami, stymulowania wzrostu roślin, do zwalczania szkodników i zastosowań pozbiorniczych. Produkty chitozanowe można stosować na różne sposoby, m. in. jako środki do zaprawiania nasion, użyźniania gleby i oprysku dolistnego [61], [62], [64], [65]. Ze względu na wielofunkcyjną rolę chitozanu coraz częściej uważany jest za pożądany składnik matryc polimerowych do zastosowań w zrównoważonym rolnictwie. Chitozan i jego pochodne są zdolne do tworzenia filmów, hydrożeli, włókien oraz nanocząstek [62], [66], [67]. Wiele uwagi poświęca się nanoformulacjom na bazie chitozanu, które stanowią alternatywę dla konwencjonalnych środków agrochemicznych [68], [69], [70], [71].

Od kilkunastu lat badana jest możliwość zastosowania chitozanu do otoczkowania. Na podstawie danych z bazy patentów Espacenet w latach 2000-2020 uzyskano 2109 patentów na wytwarzanie otoczek chitozanowych (chitosan coating), głównie w Chinach (990 patentów), Stanach Zjednoczonych (359 patentów) i Korei (199 patentów). Zainteresowanie zastosowaniem chitozanu, który odpowiadałby za kontrolowane uwalnianie składników odżywczych nawozów jest stosunkowo niewielkie, ale wzrasta. W bazie patentów Espacenet znaleziono 150 wyników (lata 2000-2020) pod hasłem otoczki chitozanowe i nawozy (chitosan coating and fertilizer). Większość tych patentów pochodzi z krajów azjatyckich. Rysunek 3 przedstawia liczbę patentów przypadających na poszczególne lata. Główny obszar badań koncentruje się na zastosowaniu chitozanu jako otoczki do nawozów oraz dodatku chitozanu do granuli nawozu jako składnika odżywczego, które mogą poprawić żyzność gleby oraz wzrost roślin [72].



Rysunek 3. Podział patentów na lata, na podstawie bazy patentów Espacenet pod hasłem 'otoczki chitozanowe' oraz 'otoczki chitozanowe i nawozy' [72].

Pomimo zalet chitozanu, słaba rozpuszczalność w wodzie w środowisku obojętnym zawęża zakres jego aplikacji. Od wielu lat szeroko prowadzone badania skupiają się na modyfikacji chemicznej chitozanu. Rozpuszczalność chitozanu jest ograniczona przy $\text{pH} > 6,5$ gdzie zaczyna on tracić swój kationowy charakter. Problem ten jest prawdopodobnie głównym czynnikiem ograniczającym wykorzystanie chitozanu. Chitozan ma trzy rodzaje reaktywnych grup funkcyjnych: dwie grupy hydroksylowe na C-3 i C-6 w każdej powtarzającej się jednostce i jedną grupę aminową na C-2 w każdej jednostce deacetylowanej. Grupy te pozwalają na sprzężanie wielu podstawników, w wyniku czego powstają nowe, zmodyfikowane pochodne (Tabela 4). Metody modyfikacji chitozanu obejmują trzy grupy metod: metody polegające na wprowadzeniu grup bocznych do łańcucha chitozanu w wyniku reakcji podstawienia, metody prowadzące do wydłużenia łańcucha i/lub wzrostu średniej masy cząsteczkowej oraz metody depolimeryzacji. Metody prowadzące do sieciowania chitozanu omówiono szczegółowo w rozdziale 6.

Tabela 4. Sposoby modyfikacji chitozanu.

Modyfikacje chitozanu		
Podstawienie	Tworzenie sieci – wydłużanie łańcucha, wzrost masy cząsteczkowej	Depolimeryzacja
<ul style="list-style-type: none"> - <i>O</i>-, <i>N</i>-karboksyalokilowanie - acylowanie - sulfonowanie - fosforylacja 	<ul style="list-style-type: none"> - sieciowanie - kopolimeryzacja szczepiona 	<ul style="list-style-type: none"> - fizyczna (promieniowanie UV, promieniowanie γ, ultradźwięki, mikrofalę) - chemiczna (kwasy, wolne rodniki) - enzymatyczna (chitynaza, lipaza, proteaza)

6. Zastosowanie hydrożeli chitozanowych w rolnictwie

Hydrożele to usieciowane związki wielkocząsteczkowe z grupami hydrofilowymi, które są zdolne wchłonąć dużą ilość wody bez rozpuszczania się w niej [45], [73], [74]. Hydrofilowe grupy funkcyjne przyłączone do szkieletu polimeru umożliwiają absorpcję wody, a usieciowania między łańcuchami wywołują odporność na rozpuszczanie. Niektóre hydrożele mogą wchłaniać nawet 1000 razy więcej wody w stosunku do ich suchej masy, dlatego nazywane są superabsorbentami [75], [76]. Idealny hydrożel do stosowania w przemyśle rolniczym musi spełniać szereg wymagań, co przedstawia Rysunek 4. Hydrożele są uważane za polepszacze gleby i wzmacniacze plonów, ponieważ są w stanie zatrzymać zarówno wodę, jak i składniki odżywcze, a następnie uwalniać je przez dłuższy czas. Są one stosowane jako powłoki do nawozów przyjaznych dla środowiska, a takie powlekanie nawozów mogą poprawić zdolność gleby do zatrzymywania wody [1]. Hydrożele nawozowe o powolnym uwalnianiu to rodzaj materiału rolniczego, który łączy w sobie zdolności hydrożelu i nawozu. Poprawiają one jakość gleby i zwiększają efektywność nawozów. Połączenie superchłonnych hydrożeli i nawozów to rosnący trend regulacji wody i składników odżywczych w jednym układzie [77].



Rysunek 4. Wymagania dla idealnego hydrożelu do stosowania w przemyśle rolniczym.

Większość superabsorbentów składa się z polimerów syntetycznych (zazwyczaj poliakrylowych) ze względu na ich doskonały stosunek ceny do wydajności. Rozważa się jednak częściowe lub całkowite zastąpienie materiałów syntetycznych „bardziej ekologicznymi” alternatywami. Biopolimery, takie jak polisacharydy, są przyjazną dla środowiska alternatywą dla polimerów syntetycznych, ponieważ są tanimi, łatwo dostępnymi i odnawialnymi materiałami [78], [79]. Ponadto ich naturalne pochodzenie sprawia, że są one z natury biokompatybilne, biodegradowalne i nietoksyczne, dlatego coraz częściej stosuje się je w syntezie materiałów hydrożelowych o potencjalnych zastosowaniach w rolnictwie i ogrodnictwie [12], [80]. Polisacharydy są szeroko stosowane w syntezie hydrożeli ze względu na obecność hydrofilowych grup funkcyjnych, które mogą wchłaniać wodę i które można łatwo modyfikować [12], [76], [78]. Do najważniejszych polisacharydów stosowanych do produkcji hydrożeli o potencjalnym zastosowaniu w rolnictwie na dużą skalę należą: chitozan [66], [81], [82], celuloza [18], [83], skrobia [84], [85] oraz alginiany [86].

Chociaż opracowano metody syntezy hydrożeli na bazie chitozanu do różnych zastosowań biomedycznych [87], [88], istnieje niewiele hydrożeli, które spełniają wymagania rolnicze [89] (Tabele 5-7). Istnieją doniesienia na temat hydrożeli na bazie chitozanu, w których sieciowanie może być chemiczne (kowalencyjne) lub fizyczne. Stosunkowo łatwiej jest kontrolować właściwości hydrożeli chitozanowych wytwarzanych przez kowalencyjne sieciowanie, ponieważ ich tworzenie oraz stosowanie nie jest ograniczone przez pH. Z drugiej strony ich wytwarzanie jest pracochłonne, a zanieczyszczenie toksycznymi odczynnikami jest problematyczne. Odczynniki stosowane w metodzie chemicznego sieciowania są często toksyczne, dlatego wszelkie pozostałości środka sieciującego muszą zostać usunięte, zanim materiał zostanie wykorzystany do zastosowań rolniczych. Hydrozele na bazie chitozanu mogą być przygotowywane przez fizyczne sieciowanie bez użycia toksycznych odczynników chemicznych – chitozan reaguje z ujemnie naładowanymi polimerami lub anionowymi środkami sieciującymi (żelowanie jonotropowe i kompleksowanie polielektrolitów).

Tabela 5. Hydrożele na bazie chitozanu do zastosowań rolniczych (lata 2010-2020) – Superchłonne polimery na bazie kwasu akrylowego/akrylamidu zawierające chitozan [89].

Właściwości zastosowanego chitozanu		Matryce oparte na chitozanie	Metoda sieciowania	Charakterystyka hydrożelu		Uwalnianie składników aktywnych		Lit.
Mw [g/mol]	DD [%]			Zdolność pułapkowania wody [g H ₂ O/g matrycy]	Retencja wody [%]	Składnik nawozu (sposób pułapkowania)*	Stopień uwolnienia/ Uwagi	
6·10 ⁵	90	Trójwarstwowy hydrożel chitozan/P(AA-co-AM)	Sieciowanie (MBA)	70 (H ₂ O)	25% po 10 dniach, 16% po 20 dniach, 8% po 30 dniach	Nawóz NPK	Składniki odżywcze uwolnione w glebie nie przekroczyły 75% w 30 dniu	[26]
b.d.	>85	Hydrożel (chitozan/celuloza)/PAA	Sieciowanie (żywica tiomocznikowo-formaldehydowa, MBA)	390 (H ₂ O) 39,5 (0,9% NaCl)	Odparowanie wody w glebie 42% i 76% odpowiednio w 12 i 24 dniu	Nawóz NPK	Uwolnienie 75% N, 73% P i 73% K w 30 dniu. Uwalnianie po 3 dniach było poniżej 15% i nie przekraczało 75% po 30 dniach.	[31]
1-2·10 ⁵	95	Trójwarstwowy hydrożel PVA/chitozan/P(AA-co-AM)	Sieciowanie (GA, MBA)	233 (H ₂ O)	b.d.	Nawóz NPK (podczas sieciowania)	Uwalnianie 84% N, 63% P i 36% K do wody po 30 dniach	[52]
średnia	75-85	Hydrożel chitozan/P(AA-co-AM) z dodatkiem zmielonej skały bazaltowej jako środka ulepszającego glebę	Sieciowanie (MBA)	75 (pH=2) 650 (pH=3) 525 (pH=6) 575 (pH=8) 200 (pH=10)	Do 2 tygodni po nawadnianiu	b.d.	Zwiększenie plonu bakłażana (<i>Solanum melongena</i>)	[90]
wysoka	85	Hydrożel PAM/chitozan Hydrożel PAM/alginian/chitozan	Sieciowanie wywołane promieniowaniem	380 (H ₂ O) 150 (1 mM NaCl) 50 (1M NaCl)	Ponad 35% po 4 dniach	b.d.	Istotny wpływ na jakość i liczebność roślin kukurydzy ze względu na stymulujący wzrost działania alginianu i chitozanu	[91]

b.d. – brak danych, *jeśli nie zaznaczono inaczej, pułapkowanie przeprowadzono po syntezie hydrożelu

Tabela 6. Hydrożele na bazie chitozanu do zastosowań rolniczych (lata 2010-2020) – Hydrożele na bazie chitozanu wytwarzane przez sieciowanie chemiczne [89].

Właściwości zastosowanego chitozanu		Matryce oparte na chitozanie	Metoda sieciowania	Charakterystyka hydrożelu		Uwalnianie składników aktywnych		Lit.
M _w [g/mol]	DD [%]			Zdolność pułapkowania wody [g H ₂ O/g matrycy]	Retencja wody [%]	Składnik nawozu (sposób pułapkowania)*	Stopień uwolnienia/Uwagi	
wysoka	b.d.	Hydrożel chitozanowy	Sieciowanie (GA)	0,7 (H ₂ O)	4% po 30 dniach	KNO ₃ (podczas sieciowania)	Uwalnianie K w glebie: 35% po 2,5 dniach; 63% po 30 dniach	[33]
wysoka	b.d.	Hydrożel PVA/chitozan	Sieciowanie (GA)	2,25 (H ₂ O)	10% po 30 dniach	KNO ₃ (podczas sieciowania)	Uwalnianie K w glebie: 22% po 2,5 dniach; 46% po 30 dniach	[33]
średnia	b.d.	Mikrosfery chitozanowe	Sieciowanie emulsji (genipina)	1,64 (H ₂ O)	b.d.	Mocznik (podczas sieciowania)	Uwalnianie mocznika w wodzie: ok. 90% po 7 dniach	[50]
3,14·10 ⁵	87	Hydrożel chitozanowy	Sieciowanie (aldehyd salicylowy)	68 (H ₂ O)	Do 154%	Mocznik (podczas sieciowania)	Uwalnianie 45% w ciągu pierwszych 5 h, 75% po 11 dniach	[51]
b.d.	b.d.	Hydrożel PVA/chitozan	Sieciowanie (GA)	0,58 (PBS)	48% po 15 dniach	Nawóz NPK (podczas sieciowania)	Wpływ na kiełkowanie nasion okry (lepsze kiełkowanie i wzrost młodych roślin)	[92]
2·10 ⁵	b.d.	Hydrożel chitozanowy z nanocząstkami Cu	Sieciowanie (GA)	3 (H ₂ O)	b.d.	Nanocząstki Cu	Pozytywny wpływ na wzrost, plon pomidora	[93]
2·10 ⁵	b.d.	Hydrożel PVA/chitozan z nanocząstkami Cu	Sieciowanie (GA)	b.d.	b.d.	Nanocząstki Cu	Wpływ na arbuza (długość łodygi, korzenia)	[94]
b.d.	b.d.	Hydrożel chitozanowy	Sieciowanie (glioksal)	b.d.	b.d.	Inhibitor nityfikacji (DCD) (podczas żelowania chitozanu)	Uwolnienie DCD do gleby: 33% po 7 dniach	[95]
1,4·10 ⁵	75	Hydrożel chitozanowy szczepiony kwasem itakonowym	Kopolimeryzacja	23 (H ₂ O) 10 (0,9% NaCl) <2,5 (pH=4) 3,5 (pH=2)	b.d.	Mocznik	Uwalnianie mocznika do wody: 73% po 50 h	[96]

b.d. – brak danych, *jeśli nie zaznaczono inaczej, pułapkowanie przeprowadzono po syntezie hydrożelu

Tabela 7. Hydrożele na bazie chitozanu do zastosowań rolniczych (lata 2010-2020) – Hydrożele na bazie chitozanu wytwarzane przez sieciowanie fizyczne [89].

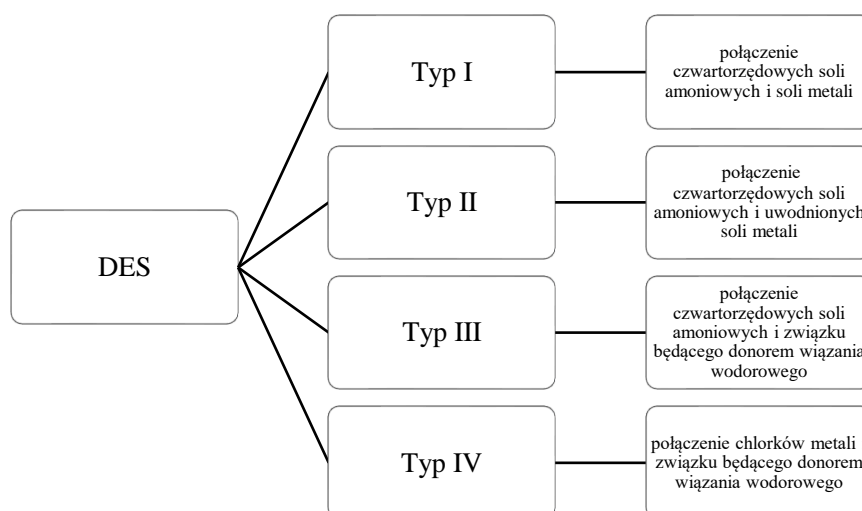
Właściwości zastosowanego chitozanu		Matryce oparte na chitozanie	Metoda sieciowania	Charakterystyka hydrożelu		Uwalnianie składników aktywnych		Lit.
Mw [g/mol]	DD [%]			Zdolność pułapkowania wody [g H ₂ O/g matrycy]	Retencja wody [%]	Składnik nawozu (sposób pułapkowania)*	Stopień uwolnienia/ Uwagi	
średnia	81	Makrosfery hydrożelowe chitozanowe i chitozanowo/skrobiowe	Żelowanie jonotropowe (TPP)	1,21-1,63 (H ₂ O)	b.d.	KNO ₃	Uwolnienie KNO ₃ do wody: 73% po 14 dniach	[13]
4,8·10 ⁵	85	Hydrożel chitozan/guma gellan	Kompleksowanie polielektrolitowe	71-219 (H ₂ O)	Czas całkowitej utraty wody w żelach - 9 h	Nawóz MPK	Całkowite uwolnienie MKP do wody po 8 h	[14]
b.d.	b.d.	Hydrożel fibroina jedwabiu/żelatyna/chitozan	Metoda odlewania solwentowego	3,0-4,2 (H ₂ O)	b.d.	Mocznik	Uwalnianie mocznika w wodzie: 80% po 13 dniach	[16]
1,8·10 ⁵	85	Mikrokapsułki hydrożelowe chitozanowo/montmorylonitowe	Żelowanie jonotropowe (TPP)	1,2 (H ₂ O)	b.d.	KNO ₃	Całkowite uwolnienie KNO ₃ do wody po 2 dniach	[48]
1,9-3,1·10 ⁵	81	Makrosfery hydrożelowe chitozanowe i chitozanowo/skrobiowe	Żelowanie jonotropowe (TPP)	1,21-1,63 (H ₂ O)	b.d.	KNO ₃	Uwolnienie KNO ₃ do wody: 72-95% po 16 dniach	[49]
średnia	81	Makrosfery hydrożelowe chitozanowo/skrobiowe	Żelowanie jonotropowe (TPP)	2,35 (H ₂ O _{dest}) 1,43 (H ₂ O)	b.d.	Bakterie stymulujące wzrost roślin załadowane do makrosfer	Uwalnianie bakterii w glebie: stężenie bakterii stopniowo wzrastało w ciągu pierwszych 20 dni, a następnie zaczęło spadać po 24 dniach	[97]
b.d.	76-80	Hydrożel chitozanowy	Żelowanie jonotropowe (EDTA-addukt mocznikowy)	570 (H ₂ O) 100 (0,1% NaCl) 40 (1% NaCl)	b.d.	Mocznik jako addukt z EDTA	b.d.	[98]
4,87·10 ⁴	80	Hydrożel chitozanowy	Żelowanie jonotropowe (addukt kwas cytrynowy-mocznik)	1250 (H ₂ O) 210 (0,1% NaCl)	25% po 1h (temp. 35°C)	Mocznik jako addukt z kwasem cytrynowym	b.d.	[99]
b.d.	b.d.	Hydrożel chitozanowy z dodatkiem drożdży	Żelowanie alkaliczne	26-32 (H ₂ O)	b.d.	Kwas humusowy	Uwalnianie kwasu humusowego: 82,6% przy pH=7 po 5 h	[100]
niska	92	Hydrożel żelatyna/chitozan/PVA	Żelowanie alkaliczne	11 (H ₂ O)	70% po 1 dniu	Inulina	Oporność na <i>Phytophthora capsica</i> w roślinach chili	[101]
b.d.	74	Hydrożele chitozan/humus	Żelowanie jonotropowe (TPP)	b.d.	b.d.	Mocznik	Uwalnianie mocznika do gleby: 70% po 7 dniach	[102]

b.d. – brak danych, *jeśli nie zaznaczono inaczej, pułapkowanie przeprowadzono po syntezie hydrożelu

7. Mieszaniny głęboko eutektyczne, klasyfikacja, metody przygotowywania

Mieszaniny głęboko eutektyczne lub inaczej rozpuszczalniki głęboko eutektyczne (DES, ang. *deep eutectic solvents*) to jednorodne mieszaniny dwóch lub więcej składników, które są zdolne do łączenia się ze sobą poprzez oddziaływanie akceptora wiązań wodorowych (HBA) z donorem wiązań wodorowych (HBD). Delokalizacja ładunku zachodząca w wyniku tworzenia wiązań wodorowych między tymi składnikami jest odpowiedzialna za obniżenie temperatury topnienia mieszaniny w porównaniu z temperaturami topnienia jej pojedynczych składników [103]. Tworzenie DES odbywa w wyniku prostego mieszania dwóch lub więcej składników w odpowiednim stosunku molowym pod wpływem ciepła, a co więcej proces ten nie wymaga dodatkowego etapu oczyszczania.

DES to jedno z najbardziej obiecujących odkryć w świecie „zielonej chemii”. Są one postrzegane jako alternatywy dla konwencjonalnych rozpuszczalników organicznych i mają wiele zalet, takie jak: odnawialność, możliwość ponownego użycia, biodegradowalność, nietoksyczność, dostępność na dużą skalę, bardzo niska prężność par, niska palność oraz łatwość przygotowania. Poza tym składniki, z których otrzymuje się DES są tanie i bezpieczne. Chemikalia i substancje niebezpieczne stosowane w procesach przemysłowych mają negatywny wpływ na środowisko. Obecnie tzw. „zielone technologie” są jednymi z kluczowych zagadnień w chemii i dziedzinach pokrewnych, mają one na celu ochronę środowiska i ograniczenie negatywnego wpływu działalności człowieka. Zielona chemia projektuje procesy, które eliminują lub zmniejszają wprowadzanie substancji niebezpiecznych w procesach przemysłowych. W tym celu jednym z najważniejszych zagadnień skupionych wokół zielonej chemii jest odkrycie nowej generacji rozpuszczalników/plastyfikatorów, które mogłyby zastąpić tradycyjne chemikalia stosowane w procesach przemysłowych.



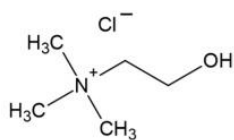
Rysunek 5. Klasyfikacja mieszanin głęboko eutektycznych.

W celu rozróżnienia między możliwymi eutektykami, DES podzielono na cztery typy [104], co przedstawia Rysunek 5. Przykłady eutektyków typu I obejmują stopione sole

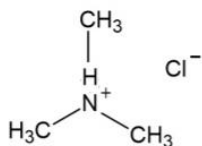
chloroglinianiu/imidazoliowe i ciecze jonowe utworzone z soli imidazoliowych i różnych halogenków metali, w tym FeCl_2 , AgCl , CuCl , LiCl , CdCl_2 , CuCl_2 , SnCl_2 , ZnCl_2 , LaCl_3 , YCl_3 i SnCl_4 . Dostępność nieuwodnionych halogenków metali, które mają odpowiednio niską temperaturę topnienia, aby utworzyć DES typu I jest ograniczony. Przykłady eutektyków typu II obejmują uwodnione halogenki metali. Stosunkowo niski koszt wielu uwodnionych soli metali w połączeniu z ich naturalną niewrażliwością na wilgoć sprawia, że ich zastosowanie w procesach przemysłowych na dużą skalę jest opłacalne. Najczęściej badane w literaturze eutektyki typu III są oparte na HBA (najczęściej na chlorku choliny – czwartorzędowym kationie amoniowym) i HBD. Szeroka gama dostępnych HBA (Rysunek 6) oraz HBD (Rysunek 7) oznacza, że ta klasa DES jest szczególnie elastyczna. Fizyczne właściwości cieczy zależą od donora wiązań wodorowych i można je łatwo dostosować do konkretnych zastosowań. DES typu IV dotyczy soli metali przejściowych, głównie ZnCl_2 lub AlCl_3 , które tworzą eutektyki z HBD [104], [105].

Typ III jest najczęściej stosowanym DES ze względu na silne oddziaływanie wiązań wodorowych między HBA i HBD. Mechanizm wiązania wodorowego DES wpływa bezpośrednio na jego właściwości – im większa interakcja sieci wiązań wodorowych, tym większe obniżenie temperatury topnienia i bardziej lepka mieszanina [103].

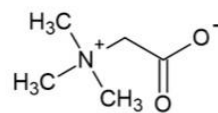
Wiele związków zostało z powodzeniem wykorzystanych do tworzenia DES [106]. HBA to głównie czwartorzędowe sole amoniowe lub fosfoniowe, natomiast HBD to najczęściej amidy, alkohole i kwasy karboksylowe. Rysunek 6 przedstawia struktury niektórych HBA stosowanych do wytwarzania DES, natomiast Rysunek 7 przedstawia struktury niektórych HBD stosowanych do wytwarzania DES. Z kolei Tabela 8 przedstawia najpopularniejsze układy stosowane do wytwarzania DES. O zastosowaniach DES decydują ich właściwości fizyczne, m.in. gęstość oraz lepkość – w przemyśle preferowane są DES o niższych gęstościach oraz lepkościach. Właściwości fizykochemiczne DES zależą od charakteru HBA i HBD, które tworzą mieszaniny eutektyczne, dlatego można je dostosować zmieniając stosunek molowy HBA:HBD. Ponadto obecność wody w DES, nawet w niewielkich ilościach, wpływa na właściwości fizyczne DES. Zwiększenie zawartości wody w mieszaninach DES obniża ich gęstość i lepkość poprzez rozerwanie wiązań wodorowych między składnikami DES [107].



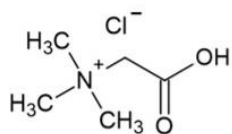
chlerek choliny



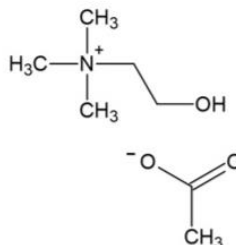
chlerek trimetyloamoniowy



betaina

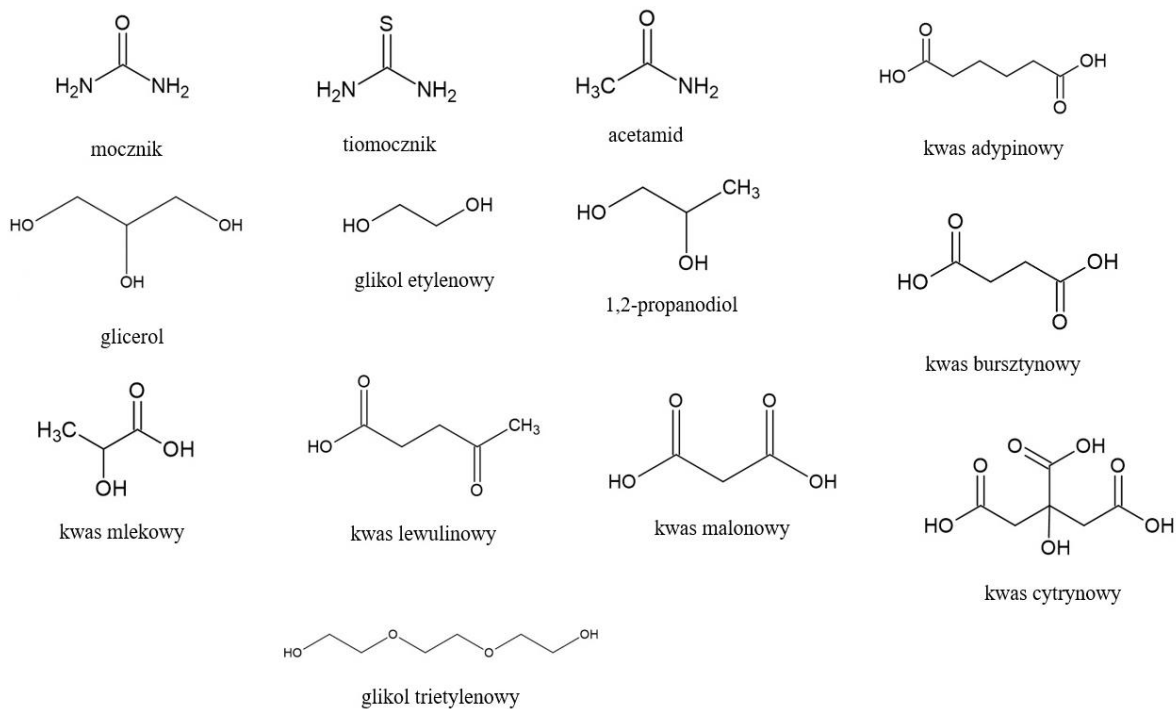


chlorowodorek betainy



octan choliny

Rysunek 6. Związki zawierające akceptory wiązań wodorowych (HBA) - przykłady.



Rysunek 7. Związki zawierające donory wiązań wodorowych (HBD) - przykłady.

Tabela 8. Najpopularniejsze układy HBA-HBD stosowane do wytwarzania DES.

Rodzaj DES (HBA-HBD)	Stosunek molowy HBA:HBD
Chlorek choliny-tiomocznik	1:1, 1:2
Chlorek choliny-mocznik	1:2
Chlorek choliny-glicerol	1:2, 1:3, 1:4
Chlorek choliny-kwas malonowy	1:1, 1:2
Chlorek choliny-kwas mlekowy	1:1, 1:2
Chlorek choliny-kwas lewulinowy	1:2
Chlorek choliny-glikol etylenowy	1:2
Chlorek choliny-kwas cytrynowy	1:1, 1:2, 2:1
Chlorek choliny-kwas bursztynowy	1:1
Betaina-mocznik	1:2
ZnCl ₂ -glikol etylenowy	1:4

Przygotowanie DES jest łatwe, nie wymaga obecności rozpuszczalnika ani oczyszczania produktu końcowego, ponieważ nie powstają produkty uboczne. Istnieją różne metody przygotowania DES, takie jak metoda podgrzewania, metoda mielenia [108], metoda liofilizacji [109]. Metoda podgrzewania polega na mieszaniu i ogrzewaniu związków, przy ciągłym mieszaniu, aż do powstania jednorodnej cieczy. Temperatura ogrzewania zwykle mieści się w zakresie od 50 do 100°C. Drugą popularną metodą jest mielenie, które polega na ucieraniu związków w moździerzu za pomocą tłuczka, w temperaturze pokojowej, aż do uzyskania klarownej cieczy. Do tworzenia DES wykorzystuje się też metodę odparowania wody [110], która polega na rozpuszczeniu składników DES w wodzie, a następnie odparowaniu w temperaturze 50°C oraz umieszczeniu otrzymanej cieczy w eksykatorze w obecności żelu krzemionkowego.

7.1. Mieszaniny głęboko eutektyczne jako plastyfikatory folii chitozanowych

Plastyfikatory są niezbędne do zmniejszenia kruchości folii poprzez zmniejszenie sił międzycząsteczkowych między łańcuchami polimeru, zwiększenie ich ruchliwości, a tym samym poprawę właściwości mechanicznych. W związku z tym zastosowano dużą liczbę plastyfikatorów w celu poprawy właściwości mechanicznych i powierzchniowych folii chitozanowych. Do najczęściej stosowanych plastyfikatorów dla filmów chitozanowych zalicza się glicerynę, glikol etylenowy, glikol polietylenowy i glikol propylenowy [111], [112]. Stwierdzono, że glicerol i glikol polietylenowy są bardziej odpowiednie jako plastyfikatory chitozanu niż glikol etylenowy i glikol propylenowy ze względu na ich wydajność plastyfikacji i stabilność przechowywania. Stężenie plastyfikatora w ilości 20% (dla glicerolu i glikolu polietylenowego) jest wystarczające do uzyskania elastycznej folii chitozanowej o dobrej stabilności przez 5 miesięcy przechowywania [111].

Obecnie obserwuje się coraz większe zainteresowanie stosowaniem plastyfikatorów pochodzenia naturalnego i w związku z tym w ostatnich latach z powodzeniem przetestowano nową klasę plastyfikatorów, tzw. DES jako plastyfikatorów folii na bazie chitozanu przygotowanych różnymi metodami [103].

W zespole Galvis-Sánchez badano zastosowanie czterech DES opartych na chlorku choliny, przygotowanych z kwasem jabłkowym, kwasem mlekowym, kwasem cytrynowym i glicerolem jako plastyfikatorów dla folii chitozanowych, gdzie folie te zostały wytworzone przez formowanie termokompresyjne [113]. Badania przeprowadzono dla dwóch chitozanów o różnych stopniach deacetylacji (DD = 76 i 81%). Chitozan uprzednio wysuszono w piecu w 60°C/24h, a następnie mieszaniny chitozanu z DES przygotowano poprzez ucieranie związków w młynku za pomocą tłuczka przez 15 minut (stosunek chitozan/DES – 70/30 wag.). Następnie uzyskane mieszaniny umieszczono w piecu 80°C/30 minut, po czym po wyjęciu dodano 3% kwas octowy i mieszano przez 15 minut. Otrzymane materiały prasowano na gorąco w prasie hydraulicznej (110°C). Folia chitozanowa (DD = 76%) z dodatkiem DES na bazie chlorku choliny i kwasu jabłkowego (stosunek masy 1:1) wykazywała najwyższą elastyczność, podczas gdy folia chitozanowa (DD = 76%) z dodatkiem DES na bazie chlorku choliny i kwasu cytrynowego (stosunek masy 1:1) wykazywała wyższe wartości wytrzymałości na rozciąganie.

W innym badaniu przygotowano folie chitozanowe formowane termokompresyjnie z dodatkiem DES na bazie chlorku choliny i kwasu cytrynowego (stosunek masy 1:1) [114]. Co ciekawe, chlorek choliny i kwas cytrynowy dodawano do chitozanu oddzielnie (nie w postaci płynnej mieszaniny), następnie mieszaninę ogrzewano w 70°C/30 minut, po czym dodano 3% kwas octowy. Uformowaną pastę prasowano na gorąco w 120°C. Otrzymane folie chitozanowe z dodatkiem DES wykazywały wyższą zdolność sorpcji wody. Ponadto zaobserwowano nieznaczny wzrost wydłużenia przy zerwaniu (wyższą elastyczność) oraz niższą wytrzymałość na rozciąganie

W kolejnej pracy badano folie chitozanowe z dodatkiem DES (30-80% wag.) na bazie chlorku choliny i kwasu mlekowego [115]. Folie te przygotowano poprzez rozpuszczenie określonej ilości chitozanu w 2% kwasie octowym, a następnie dodanie znanej ilości DES i mieszanie w temperaturze pokojowej przez 5 godzin. W pełni zhomogenizowane roztwory wylewano na szalki Petriego i suszono w 25°C/7 dni. Wyniki potwierdziły dobre właściwości plastyfikujące DES, a dodatek DES do folii chitozanowej poprawił jej właściwości fizykochemiczne i mechaniczne – przygotowane folie mają potencjał do wykorzystania jako materiał opakowaniowy. Dodatek DES znacząco poprawił elastyczność filmów chitozanowych (wydłużenie przy zerwaniu wzrosło o ok. 160% po wprowadzeniu 80% wag. DES), nieznacznie obniżył wytrzymałość na rozciąganie, a także poprawił właściwości antyoksydacyjne przy jednoczesnym zwiększeniu przepuszczalności pary wodnej.

W innej pracy otrzymano folie chitozanowe zawierające DES na bazie chlorku choliny i kwasu malonowego (stosunek molowy 1:1), które z powodzeniem przygotowano metodą odlewania roztworu przy użyciu zawartości DES 0-82% wag. [116]. Chitozan, chlorek choliny i kwas malonowy odważono i umieszczono w naczyniu, po czym dodano odpowiednią ilość wody i prowadzono proces rozpuszczania z mieszaniem w temperaturze pokojowej przez 48 godzin. Na tym etapie kwas malonowy zapewnił kwasowe środowisko, które jest niezbędne do rozpuszczenia chitozanu. Otrzymane roztwory przesączono w celu usunięcia nierozpuszczonej pozostałości i odgazowano pod próżnią. Folie otrzymano przez wylewanie roztworów na szalki Petriego a następnie suszenie w 25°C/6 dni. Wydłużenie folii przy zerwaniu wzrosło z 3 do 62% przy wzroście zawartości DES z 0 do 67% wag., natomiast dalszy wzrost zawartości DES prowadził do zmniejszenia maksymalnego wydłużenia.

Przygotowano również folie chitozanowe plastyfikowane różnymi formułacjami DES na bazie chlorku choliny i kwasów organicznych (kwas acetylosalicylowy, malonowy, mlekowy) metodą odlewania. Uzyskane folie chitozanowe z dodatkiem DES wykazały doskonałe właściwości antibakteryjne przeciwko *Echerichia coli* i *Stabhylococcus aureus* – przygotowane folie chitozanowe z DES na bazie choliny, szczególnie dla chlorku choliny i kwasu acetylosalicylowego, wykazały ogromny potencjał w zakresie pakowania żywności [117].

OMÓWIENIE WYNIKÓW

1. Wprowadzenie

Badania prowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej koncentrowały się wobec biopolimeru – chitozanu, który można otrzymać w wyniku deacetytacji chityny. Zarówno chitozan jak i chityna mogą być zamawiane przez odpowiedni departament zajmujący się zakupami surowców w Grupie Azoty Zakłady Azotowe Kędzierzyn S.A. W związku z tym, że zakupiony chitozan czy też chitozan zsyntezowany na miejscu w zakładzie poprzez deacetytację chityny, może się różnić właściwościami, potrzebne są metody oznaczania jego właściwości: stopnia deacetytacji, masy molowej czy lepkości roztworu. Konieczne było zatem opracowanie takich metod, czego podjęto się na początku pracy doktorskiej. W pracy podjęto następnie temat zastosowania koacerwatów jako dodatków do nawozów (otoczki/wsadu do granul), więc zsyntezowano najpierw odpowiednie pochodne chitozanu (po dokonaniu przeglądu literaturowego metod ich syntezy), a następnie je scharakteryzowano. Celem pracy było również opracowanie metod otrzymywania folii chitozanowych z dodatkiem mieszanin głęboko eutektycznych (otoczki do nawozów), w związku z czym wybrano odpowiednie mieszaniny głęboko eutektyczne i podjęto się m.in. badań rozpuszczalności folii chitozanowych z ich dodatkiem.

2. Ocena właściwości fizykochemicznych chitozanu

2.1 Oznaczanie stopnia deacetytacji chitozanu

Stopień deacetytacji (DD, ang. *degree of deacetylation*), jest jednym z głównych parametrów, który charakteryzuje chitozan:

$$DD = \frac{n_{GlcN}}{n_{GlcN} + n_{GlcNAc}} \cdot 100\%$$

gdzie:

n_{GlcN} – średnia liczba jednostek D-glukozaminy (GlcN)

n_{GlcNAc} – średnia liczba jednostek N-acetylo-D-glukozaminy (GlcNAc)

W niektórych przypadkach stosuje się stopień acetytacji chitozanu (DA, ang. *degree of acetylation*), który można zdefiniować jako:

$$DA = 100 - DD$$

DD określa ilość jednostek D-glukozaminy utworzonych z częściowego rozerwania wiązań N-acetylowych, wskazując procent deacetylowanych monomerów obecnych w ich łańcuchach. Determinuje on reaktywność i rozpuszczalność polimeru, a jego określenie jest jedną z rutynowych analiz przeprowadzanych w celu kontroli jakości chitozanów produkowanych przemysłowo. DD chitozanu jest najważniejszym parametrem wpływającym na jego właściwości biologiczne,

fizykochemiczne i mechaniczne. Rozpuszczalność chitozanu wzrasta wraz ze wzrostem wolnej grupy aminowej czyli wzrostem DD [118].

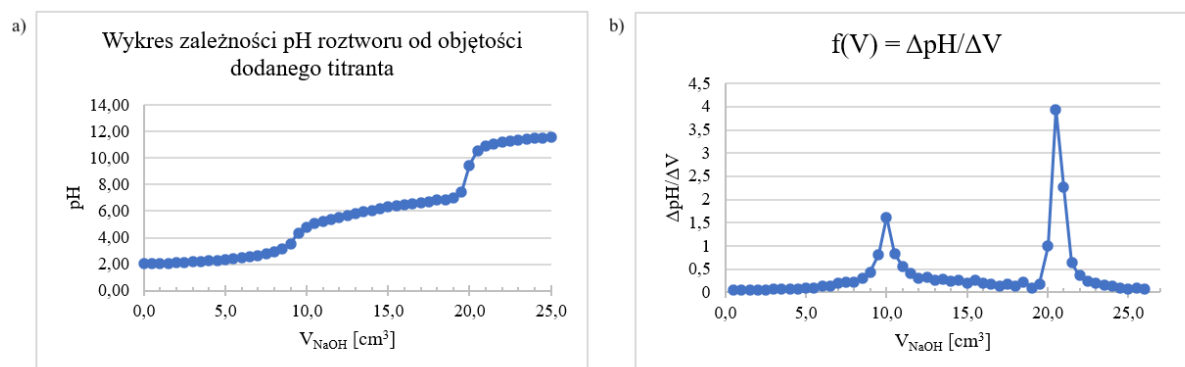
Do określenia DD opracowano wiele metod, takich jak: miareczkowanie potencjometryczne [119], [120], [121], [122], [123], spektroskopia UV-VIS [124], [125], [126], [127], [128], spektroskopia w podczerwieni [129], [130], [131], [132], spektroskopia Ramana [133], analiza elementarna [123], [126], [134], [135], dyfrakcja rentgenowska [136], spektroskopia ^1H NMR i ^{13}C NMR [137], [138], [139], [140] czy skaningowa kalorymetria różnicowa [141]. W ramach tej samej metody zazwyczaj istnieje kilka procedur analitycznych do wykonywania pomiarów i obliczeń oraz wiele sposobów interpretacji wyników [118], [142]. Wybór techniki zależy od kilku czynników, takich jak rozpuszczalność próbki czy dostępność sprzętu. Poszukiwane są szybkie, przyjazne dla użytkownika, tanie i dokładne metody określania DD. Najlepszymi metodami dla Grupy Azoty ZAK S.A. będą metody/techniki analityczne, które są aktualnie dostępne w zakładzie – nie ma konieczności zakupu nowych sprzętów pomiarowych/aparatury. W związku z tym do określenia DD chitozanu można zastosować następujące metody, dostępne w zakładzie, takie jak miareczkowanie potencjometryczne, spektroskopia UV-VIS czy analiza elementarna. Badania mogą być wykonywane w Departamencie Rozwoju. Departament Rozwoju w ramach swojej działalności zajmuje się prowadzeniem projektów badawczych i rozwojowych wpisujących się w strategię rozwoju i innowacji Grupy Azoty ZAK S.A. Obecnie w Departamencie funkcjonuje siedem laboratoriów, a w ich ramach trzynaście pojedynczych Laboratoriów – Zespołów. Szerokie zaplecze analityczne, jak również wysoko wykwalifikowana kadra pozwala na realizację niestandardowych zleceń i zgłoszeń.

Wyznaczenie DD chitozanu jest pozornie prostym problemem analitycznym, ale w rzeczywistości jest to dość skomplikowane zagadnienie. W ciągu ostatnich kilkunastu lat zaproponowano i dopracowano dużą liczbę metod, ale wszystkie mają nieodłączne wady i ograniczenia. Do oznaczania DD chitozanu potrzebne są tanie, proste, ale też solidne oraz niezawodne metody i procedury. W tym celu przetestowano i porównano – na tych samych zestawach próbek chitozanu – techniki analityczne dostępne w Grupie Azoty ZAK S.A. Testy przeprowadzono na trzech chitozaniech o nominalnym DD w zakresie 83-96%. Oznaczono je jako: chitozan nr 1 – chitozan firmy Acros Organics (M_w : 100 000 – 300 000), chitozan nr 2 – chitozan firmy Acros Organics (M_w : 600 000 – 800 000) oraz chitozan nr 3 – chitozan firmy Sigma Aldrich (M_w : 50 000 – 190 000). Zastosowano w tym celu miareczkowanie potencjometryczne i trzy różne metody obliczeniowe, dwie metody spektroskopii UV-VIS oraz analizę elementarną i dwie metody obliczeniowe.

2.1.1 Miareczkowanie potencjometryczne

W wyniku miareczkowania potencjometrycznego otrzymano wykresy wartości pH w funkcji objętości dodawanego titranta (0,1 M NaOH) z dwoma punktami przegięcia V_1 oraz V_2 (Rysunek 8a).

Określenie pierwszej pochodnej znacznie ułatwia dokładny odczyt V_1 oraz V_2 (Rysunek 8b). Pierwszy punkt przegięcia (oznaczony jako V_1) jest punktem równoważnikowym miareczkowania nadmiaru HCl, który został użyty do rozpuszczenia próbki chitozanu (chitozan rozpuszczony w wodnym roztworze HCl staje się polielektrolitem, dzięki protonowaniu grup aminowych). Drugi punkt przegięcia (oznaczony jako V_2) jest punktem równoważnikowym miareczkowania protonowanego chitozanu.



Rysunek 8. a) Przykładowa krzywa miareczkowania dla próbki chitozanu nr 1; b) Wyznaczenie punktów V_1 oraz V_2 metodą pierwszej pochodnej dla próbki chitozanu nr 1.

DD chitozanu obliczono korzystając z trzech wzorów (wzory 1-3) opisanych w części eksperymentalnej, w rozdziale 2.1.1. Uzyskane wyniki przedstawia Tabela 9.

Do określenia DD chitozanu za pomocą miareczkowania wybrano metodę, dzięki której uzyskuje się krzywą z dwoma punktami przegięcia. Różnica objętości pomiędzy V_1 i V_2 odpowiada kwasowi zużywanemu przez grupy aminowe i pozwala obliczyć DD – korzystano do obliczeń ze wzorów 1 oraz 2. Określenie pierwszej pochodnej pomaga w dokładnym odczycie punktów V_1 i V_2 . Wykonano również obliczenia na podstawie położenia pierwszego punktu na krzywej miareczkowania V_1 , a nie na podstawie różnicy – korzystano w tym przypadku do obliczeń ze wzoru nr 3.

Metody określania stopnia deacetylacji za pomocą miareczkowania są tanie i oparte na łatwo dostępnych odczynnikach oraz aparaturze. Wadą tej metody jest jednak stosunkowo długi czas przygotowywania próbki oraz samego miareczkowania. Miareczkowanie potencjometryczne wydaje się najprostszą i najsolidniejszą metodą oznaczania stopnia deacetylacji chitozanu.

Tabela 9. DD chitozanu uzyskane za pomocą miareczkowania potencjometrycznego.

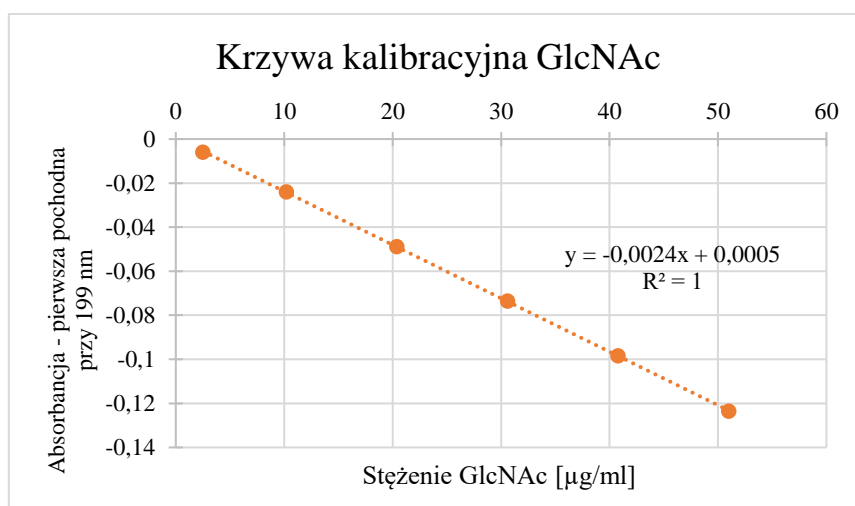
	Nr próbki	Naważka [g]	V ₁ [ml]	V ₂ [ml]	Obliczony wg wzoru nr 1	DD [%]					Deklaracja producenta
						Średnia (SD) [%]	Obliczony wg wzoru nr 2	Średnia (SD) [%]	Obliczony wg wzoru nr 3	Średnia (SD) [%]	
Chitozan nr 1	1	0,1898	10	20,5	91,14	90,58 (0,95)	89,06	88,39 (1,18)	84,82	85,15 (2,67)	90,00
	2	0,2004	9,5	20,5	90,55		88,35		84,33		
	3	0,2046	9,5	20,5	89,04		86,54		82,61		
	4	0,2005	9,5	20,5	90,51		88,31		84,30		
	5	0,2064	8,5	20	91,66		89,69		89,69		
Chitozan nr 2	1	0,208	7,5	20	97,41	97,21 (0,73)	96,73	96,49 (0,91)	96,73	96,49 (0,91)	95,60
	2	0,1831	9	20	97,38		96,7		96,70		
	3	0,1921	8,5	20	97,11		96,37		96,37		
	4	0,1947	8,5	20	96,07		95,07		95,07		
	5	0,2062	7,5	20	98,09		97,58		97,58		
Chitozan nr 3	1	0,1907	10,5	19,5	79,96	79,20 (0,95)	75,97	75,11 (1,07)	80,19	72,64 (4,74)	83,00
	2	0,1912	12	21	79,77		75,75		67,34		
	3	0,1926	11,5	20,5	79,29		75,21		71,03		
	4	0,203	11	20,5	79,39		75,33		71,36		
	5	0,2087	10,5	20	77,57		73,27		73,27		

Chitozan nr 1 – Acros Organics (Mw: 100 000 – 300 000), chitozan nr 2 – Acros Organics (Mw: 600 000 – 800 000), chitozan nr 3 – Sigma Aldrich (Mw: 50 000 – 190 000)

2.1.2 Metody spektroskopii UV-VIS

a) Metoda I

Oznaczanie DD przy użyciu spektroskopii UV-VIS opiera się na pomiarze intensywności absorpcji odpowiadającej grupie acetylowej w chitozanie. Wykreślając wartość pierwszej pochodnej UV przy różnych długościach fali w funkcji stężeń GlcNAc w celu przeprowadzenia analizy regresji liniowej, najlepszą regresję liniową uzyskano przy 199 nm – wartość pierwszej pochodnej przy 199 nm została wybrana do pomiarów stopnia deacetylacji w tym badaniu (Rysunek 9).



Rysunek 9. Wykres zależności pierwszej pochodnej przy 199 nm wobec stężenia GlcNAc.

Przy użyciu krzywej kalibracyjnej dla GlcNAc obliczono DD dla próbek chitozanu. Korzystano ze wzoru nr 4, który został opisany w części eksperymentalnej, w rozdziale 2.1.2. Uzyskane wyniki przedstawia Tabela 10.

Tabela 10. Wyznaczenie DD chitozanu za pomocą spektroskopii UV-VIS – metoda I.

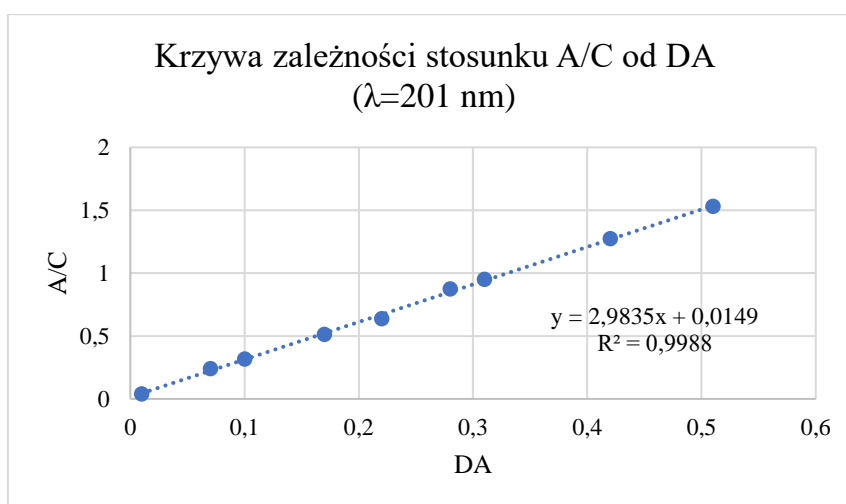
	Nr próbki	Zawartość GlcNAc wyznaczona z krzywej [µg/ml]	DD [%]	Średnia (SD) [%]	Deklaracja producenta
Chitozan nr 1	1	7,2289	88,78	88,65 (0,12)	90,00
	2	7,3469	88,60		
	3	7,3649	88,56		
Chitozan nr 2	1	2,6703	95,80	95,45 (0,31)	95,60
	2	3,0452	95,21		
	3	2,9701	95,34		
Chitozan nr 3	1	16,2441	74,79	74,98 (0,31)	83,00
	2	16,0070	75,15		
	3	16,0853	74,99		

Chitozan nr 1 – Acros Organics (Mw: 100 000 – 300 000), chitozan nr 2 – Acros Organics (Mw: 600 000 – 800 000), chitozan nr 3 – Sigma Aldrich (Mw: 50 000 – 190 000)

Metoda ta została zasugerowana jako standardowa metoda rutynowego oznaczania DD chitozanu [125]. Pomiar jest prosty i dokładny, nie wymaga drogiego sprzętu, można go wykonać w stosunkowo krótkim czasie.

b) Metoda II

Metoda II wymaga przygotowania krzywych kalibracyjnych przy użyciu GlcN oraz GlcNAc przy różnych stosunkach molowych. GlcNAc oraz chlorowodorek GlcN we wspólnym roztworze mają maksimum przy 201 nm w 0,1M roztworze HCl. Rysunek 10 przedstawia liniową zależność stosunku absorbancji do całkowitego stężenia molowego powtarzających się jednostek (A/C) od stopnia acetylacji (DA) przy 201 nm. Relacja pomiędzy A/C i DA jest liniowa. Tabela 11 przedstawia zestawienie DD określone metodą II dla próbek chitozanu. Korzystano ze wzoru nr 5, który został opisany w części eksperymentalnej, w rozdziale 2.1.2.



Rysunek 10. Krzywa zależności stosunku A/C od DA (201 nm).

Tabela 11. Wyznaczenie DD chitozanu za pomocą spektroskopii UV-VIS – metoda II.

	Nr próbki	Absorbancja	DD [%]	Średnia (SD) [%]	Deklaracja producenta
Chitozan nr 1	1	0,5463	77,54	77,67 (0,15)	90,00
	2	0,5435	77,66		
	3	0,5398	77,83		
Chitozan nr 2	1	0,3708	84,47	84,63 (0,18)	95,60
	2	0,3682	84,59		
	3	0,3630	84,82		
Chitozan nr 3	1	0,7498	70,64	70,68 (0,08)	83,00
	2	0,7469	70,77		
	3	0,7503	70,62		

Chitozan nr 1 – Acros Organics (Mw: 100 000 – 300 000), chitozan nr 2 – Acros Organics (Mw: 600 000 – 800 000), chitozan nr 3 – Sigma Aldrich (Mw:50 000 – 190 000)

Metoda II, która jest nieco łatwiejsza do wykonania niż metoda I (nie ma potrzeby przeliczania widm na pierwsze pochodne), dała wyniki znacznie zaniżone w porównaniu do deklaracji producenta.

2.1.3 Analiza elementarna

Metoda ta opiera się na oznaczeniu zawartości węgla (C) oraz azotu (N) w próbkach chitozanu. DD obliczono ze stosunku C/N. Stosunek C/N zmienia się od 5,145 dla całkowicie N-deacetylowanego chitozanu (GlcN, C₆H₁₁O₄N jako jednostka powtarzalna) do 6,816 dla całkowicie N-acetylowanego polimeru (GlcNAc, C₈H₁₃O₅N jako jednostka powtarzalna) [134]. DD chitozanu obliczono korzystając z dwóch wzorów (wzór nr 6 i wzór nr 7) opisanych w części eksperymentalnej, w rozdziale 2.1.3. Tabela 12 przedstawia wyniki zawartości węgla i azotu w badanych próbkach wraz z obliczonymi DD.

Tabela 12. Zawartość badanych pierwiastków w próbkach oraz obliczony DD chitozanu.

	Nr próbki	C [%]	N [%]	DD [%]				Deklaracja producenta
				Obliczony wg wzoru nr 6	Średnia (SD) [%]	Obliczony wg wzoru nr 7	Średnia (SD) [%]	
Chitozan nr 1	1	41,325	7,814	91,50	92,03 (0,75)	91,41	91,95 (0,77)	90,00
	2	41,362	7,848	92,56		92,50		
Chitozan nr 2	1	40,518	7,835	98,33	99,18 (1,19)	98,42	99,28 (1,22)	95,60
	2	40,631	7,901	100,02		100,15		
Chitozan nr 3	1	41,496	7,671	84,45	82,39 (2,90)	84,17	82,07 (2,98)	83,00
	2	41,521	7,577	80,34		79,96		

Chitozan nr 1 – Acros Organics (M_w: 100 000 – 300 000), chitozan nr 2 – Acros Organics (M_w: 600 000 – 800 000), chitozan nr 3 – Sigma Aldrich (M_w: 50 000 – 190 000)

2.1.4 Porównanie zastosowanych metod oznaczania stopnia deacetylacji chitozanu

Uzyskane wyniki podsumowano i porównano ze DD zadeklarowanym przez producenta – Tabela 13. Do obliczeń korzystano ze wzorów (wzór 1-7), które zostały opisane w części eksperymentalnej, w rozdziale 2.1.

Tabela 13. Porównanie DD chitozanu oznaczonego różnymi metodami.

	DD chitozanu [%] (SD [%])							Deklaracja producenta*
	Miareczkowanie potencjometryczne			UV-VIS		Analiza elementarna		
	Wzór nr 1	Wzór nr 2	Wzór nr 3	Wzór nr 4	Wzór nr 5	Wzór nr 6	Wzór nr 7	
Chitozan nr 1	90,58 (0,95)	88,39 (1,18)	85,15 (2,67)	88,65 (0,12)	77,67 (0,15)	92,03 (0,75)	91,95 (0,77)	90,00
Chitozan nr 2	97,21 (0,73)	96,49 (0,91)	96,49 (0,91)	95,45 (0,31)	84,63 (0,18)	99,18 (1,19)	99,28 (1,22)	95,60
Chitozan nr 3	79,20 (0,95)	75,11 (1,07)	72,64 (4,74)	74,98 (0,31)	70,68 (0,08)	82,41 (2,90)	82,08 (2,98)	83,00

Chitozan nr 1 – Acros Organics (M_w:100 000 – 300 000), chitozan nr 2 – Acros Organics (M_w:600 000 – 800 000), chitozan nr 3 – Sigma Aldrich (M_w:50 000 – 190 000)

* producent nie podaje jaką metodą wykonano oznaczenie

Mimo iż literatura podaje, że technika ¹H NMR powinna być metodą referencyjną dla oznaczania DD chitozanu [118], [142], to w tej technice niezbędny jest drogi aparat. Grupa Azoty Zakłady Azotowe Kędzierzyn S.A. nie posiada spektrometru NMR. Poza tym metoda ta nie jest odpowiednia do rutynowych pomiarów DD ze względu na wysokie koszty (deuterowane rozpuszczalniki, amortyzacja sprzętu, specjalistyczne kursy dla personelu) i czasochłonną procedurę przygotowania próbki. Koszty i skomplikowane względy techniczne utrudniają zastosowanie spektroskopii NMR jako rutynowej techniki na skalę przemysłową oraz w niewyspecjalizowanych laboratoriach. W związku z tym nie zostały przeprowadzone pomiary ¹H NMR do oznaczenia DD chitozianów – laboratoria muszą pracować z wykorzystaniem prostszych, tańszych i mniej zaawansowanych technik. Wybrana technika musi być precyzyjna, dokładna, powtarzalna i niedroga.

DD za pomocą ¹H NMR został wyznaczony tylko dla chitozanu firmy Sigma (M_w:50 000 – 190 000). Chitozan ten poddano modyfikacji – reakcji czwartorzędowania, co opisano w rozdziale 3. Wykonane widm ¹H NMR chitozanu, który poddano reakcji czwartorzędowania i otrzymanej pochodnej potwierdziły uzyskanie odpowiedniego produktu (czwartorzędowanego chitozanu) oraz pozwoliły na określenie stopnia czwartorzędowania. Korzystając z tego, że zostało wykonane widmo ¹H NMR, oznaczono za pomocą tej techniki DD chitozanu, który wynosił 83,63% (wynik pokrywa się z deklaracją producenta 83,00%). Do obliczeń korzystano ze wzoru nr 8, który zamieszczono i opisano w części eksperymentalnej, w rozdziale 2.4.1.

W celu określenia DD metodą miareczkowania wybrano jednakową procedurę przygotowania próbek oraz trzy, najczęściej używane w literaturze wzory do obliczeń. Metoda określania stopnia deacetylacji przez miareczkowanie jest tania, oparta na łatwo dostępnych odczynnikach i aparaturze.

Wadą może być stosunkowo długi czas przygotowania próbki, jak i samego miareczkowania. Dobra zgodność uzyskanych wyników za pomocą miareczkowania potencjometrycznego z deklaracją producenta sugeruje, że metoda ta może zostać wykorzystywana jako prosta i dokładna metoda w zastosowaniach przemysłowych. Również w pracy [142] wskazano, że miareczkowanie potencjometryczne, oparte na wybranych procedurach i standardowych roztworach analitycznych o dobrze znanych stężeniach, jest najbardziej niezawodną metodą nie-NMR.

W porównaniu z ^1H NMR oznaczenia spektrofotometryczne UV-VIS mają mniejsze wymagania sprzętowe. Zaletami oznaczeń UV-VIS są ogólnie dostępny sprzęt (spektrofotometr UV-VIS) oraz łatwe pomiary. Do wad możemy zaliczyć natomiast pracochłonną i czasochłonną procedurę (krzywa kalibracji, przygotowywanie próbek). Problematyczna może być też obecność zanieczyszczeń (pochłaniających poniżej 210 nm), która może wpływać na widma, a tym samym na końcowe wyniki [142].

Analiza elementarna posłużyła do określenia składu pierwiastkowego chitozanu, a DD obliczono na podstawie stosunku C/N. Obecność zanieczyszczeń w próbce: materiałów organicznych lub polisacharydów w próbce innych niż chityna i chitozan może znacząco zmieniać stosunek C/N [163]. Konieczna jest zatem eliminacja pozostałości białkowych obecnych w próbkach chitozanu, które mogą zwiększać zawartość azotu, a tym samym zawyżać stopień deacetylacji.

2.2 Oznaczenie masy molowej chitozanu

Zastosowania chitozanu są nie tylko uzależnione od DD, ale także od masy molowej polisacharydu (M_w). DD i M_w chitozanu są najważniejszymi parametrami wpływającymi na jego właściwości biologiczne, fizykochemiczne, mechaniczne, a co za tym idzie na jego zastosowanie. Chitozan jest naturalnym kationowym polisacharydem o dużym rozrzucie M_w . Badania nad chitozaniem wskazują, że chitozan o niskiej M_w ma znacznie zwiększoną aktywność biologiczną w porównaniu z chitozaniem o wysokiej M_w . Chitozan o niskiej M_w wykazuje silniejsze działania przeciwdrobnoustrojowe i przeciwgrzybicze [63], [143]. M_w decyduje również o podstawowych właściwościach chitozanu, m.in. o jego rozpuszczalności czy lepkości [57], [144], [145]. Bardzo wysoka M_w chitozanu, a co za tym idzie – wysoka lepkość chitozanu może wykluczać jego zastosowanie. Wysoka M_w może też skutkować niską rozpuszczalnością. Chitozan o wyższej M_w pozwala na uzyskiwanie folii, które wykazują zwiększoną odporność na wodę i właściwości mechaniczne [146], ponadto lepkość roztworów błonotwórczych wzrasta znacząco wraz ze wzrostem M_w chitozanu.

M_w chitozanu może być określana za pomocą metod takich jak: chromatografia żelowa (GPC/SEC), wiskozymetria czy też spektroskopia rozpraszania światła [56]. W związku z tym, że Grupa Azoty Zakłady Azotowe Kędzierzyn S.A. posiada chromatograf żelowy, do oznaczeń M_w

chitozanu wybrano chromatografię żelową. Wysoka M_w chitozanu sprawia, że chromatografia GPC/SEC jest najczęściej stosowaną techniką chromatograficzną do analizy tych związków. W technice tej podstawą rozdzielania chromatograficznego składników mieszaniny jest oddziaływanie cząsteczek, różniących się wielkością, z porowatą strukturą fazy stacjonarnej. Masy chitozanów wyznacza się przy użyciu wzorców o znanych M_w , dla których określa się zależność objętości retencji (V_R) od masy (M) $V_R = f(\lg M)$.

GPC/SEC można stosować jako narzędzie do kontroli jakości chitozanu, do oznaczania średniej wagowej masy molowej (M_w), średniej liczbowej masy molowej (M_n) i polidispersji (M_w/M_n). Przeanalizowano 3 próbki chitozanu: chitozan firmy Acros Organics (deklaracja producenta $M_w = 100\ 000 - 300\ 000$), chitozan firmy Acros Organics (deklaracja producenta $M_w = 600\ 000 - 800\ 000$) oraz chitozan firmy Sigma (deklaracja producenta $M_w = 50\ 000 - 190\ 000$). Tabela 14 przedstawia wyniki badań.

Tabela 14. Wyniki GPC dla próbek chitozanu.

	Deklaracja producenta M_w [g/mol]	Wyniki oznaczeń					
		M_w [g/mol]	RSD [%]	M_n [g/mol]	RSD [%]	M_w/M_n	RSD [%]
Chitozan nr 1	100 000 – 300 000	32 813	3,1	15 333	3,6	2,14	0,9
Chitozan nr 2	600 000 – 800 000	90 293	1,2	41 617	2,2	2,17	1,2
Chitozan nr 3	50 000 – 190 000	128 187	1,2	47 577	3,5	2,70	2,7

Chitozan nr 1 – Acros Organics (M_w : 100 000 – 300 000), chitozan nr 2 – Acros Organics (M_w : 600 000 – 800 000), chitozan nr 3 – Sigma Aldrich (M_w : 50 000 – 190 000)

Jak widać w powyższej tabeli, dwa spośród trzech badanych chitozanów nie spełniają deklarowanych przez producentów parametrów. W przypadku chitozanu nr 1 – firma Acros Organics deklarowała M_w w przedziale 100 000 – 300 000, gdzie wynik oznaczenia $M_w \approx 33\ 000$. Dla chitozanu nr 2 – firma Acros Organics deklarowała M_w w przedziale 600 000 – 800 000, gdzie wynik oznaczenia $M_w \approx 90\ 000$. Jedynie chitozan nr 3 – firmy Sigma Aldrich mieści się w deklarowanym przedziale mas 50 000 – 190 000 i wynosi $M_w \approx 128\ 000$. Ma to również odzwierciedlenie w lepkościach roztworów chitozanowych, ponieważ zgodnie z doniesieniami literaturowymi, im większa M_w chitozanu, tym większa lepkość jego roztworu. Badania lepkości opisane w kolejnym rozdziale (Rozdział 2.3) potwierdzają taką prawidłowość. Jak widać konieczna jest ocena właściwości fizykochemicznych, w tym określenie M_w , przed przystąpieniem do dalszej pracy z chitozanem.

2.3 Badania rozpuszczalności chitozanu, określenie lepkości przygotowanych roztworów

Przetestowano i porównano, na tym samym zestawie próbek chitozanu, ich rozpuszczalność w trzech najczęściej używanych rozpuszczalnikach: kwasie octowym (rozpuszczalnik A), kwasie mrówkowym (rozpuszczalnik B) oraz kwasie mlekowym (rozpuszczalnik C) - Tabela 15. Stężenie wodnych roztworów kwasów stosowanych w badaniach rozpuszczalności wynosiło w każdym przypadku 1%. Dla przygotowanych roztworów, w których chitozan całkowicie się rozpuścił (dobra rozpuszczalność próbek) zmierzono lepkość dynamiczną [mPa·s] w 25°C.

Tabela 15. Sprawdzenie rozpuszczalności chitozanu w wytypowanych rozpuszczalnikach, określenie lepkości przygotowanych roztworów.

Lepkość dynamiczna chitozanu [mPa·s] w 25°C									
Stężenie r-ru chitozanu [g/ml]	Chitozan nr 1			Chitozan nr 2			Chitozan nr 3		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0,010	7,2	7,9	7,7	25,6	22,9	22,3	34,0	33,9	35,0
0,015	8,5	10,0	9,3	57,1	44,9	44,0	89,7	86,1	93,6
0,020	11,4	14,0	12,4	113,9	84,5	85,0	356,2	346,5	372,1
0,025	12,4	20,3	13,9	251,0	181,0	177,0	1008,9	996,9	1004,8
0,030	-	26,7	-	436,2	248,7	-	-	2161,5	-
0,035	-	36,1	-	-	488,7	-	-	-	-
0,040	-	37,9	-	-	748,6	-	-	-	-

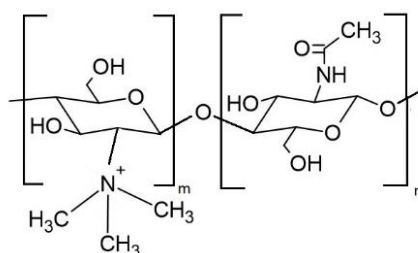
Chitozan nr 1 – Acros Organics (M_w : 100 000 – 300 000 wg deklaracji producenta, M_w oznaczona w GA ZAK: 32 813), chitozan nr 2 – Acros Organics (M_w : 600 000 – 800 000 wg deklaracji producenta, M_w oznaczona w GA ZAK: 90 293), chitozan nr 3 – Sigma Aldrich (M_w : 50 000 – 190 000 wg deklaracji producenta, M_w oznaczona w GA ZAK: 128 187)

A – 1% kwas octowy, B – 1% kwas mrówkowy, C – 1% kwas mlekowy
znak „-” w tabeli oznacza, że nie uzyskano roztworu o danym stężeniu (brak całkowitego rozpuszczenia chitozanu)

Tabela 15 przedstawia wyniki, które są zgodne z doniesieniami literaturowymi – im większa M_w chitozanu, tym większa lepkość jego roztworu. Chitozan nr 1, dla którego zbadana M_w była najmniejsza ($M_w \approx 33\ 000$) ma najmniejszą lepkość dynamiczną spośród wszystkich trzech badanych próbek chitozanu, po rozpuszczeniu w trzech różnych rozpuszczalnikach. Z kolei chitozan nr 3 dla którego zbadana M_w była największa ($M_w \approx 128\ 000$) ma największą lepkość dynamiczną spośród wszystkich trzech badanych próbek chitozanu, po rozpuszczeniu w trzech różnych rozpuszczalnikach.

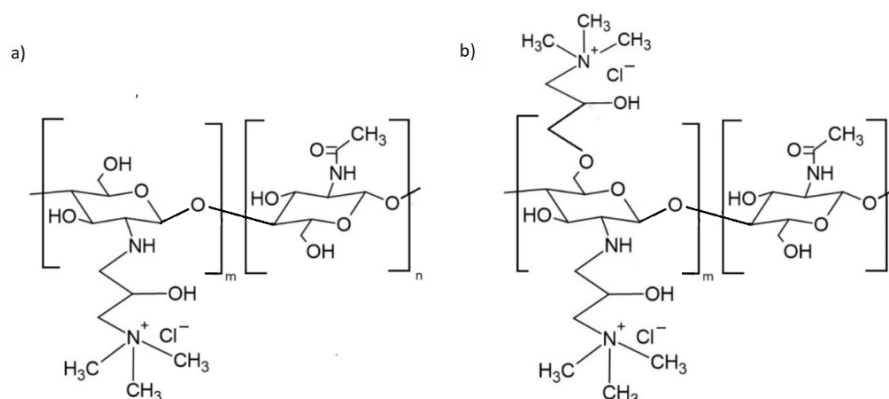
3. Modyfikacja chitozanu - reakcje czwartorzędowania

Czwartorzędowe sole amoniowe chitozanu mają dobrą rozpuszczalność w wodzie oraz wysoką zdolność zatrzymywania wilgoci, ponadto poprawiają działanie przeciwdrobnoustrojowe [147], [148], [149]. Wprowadzenie czwartorzędowych soli amoniowych do szkieletu chitozanu jest jedną z najlepszych metod zwiększenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej, a także rozpuszczalności w wodzie w całym zakresie pH. Jeden ze sposobów przeprowadzenia czwartorzędowania chitozanu polega na alkirowaniu grupy aminowej. Najprostszą pochodną tego typu, *N,N,N*-trimetylochitozan (Rysunek 11) można otrzymać poprzez traktowanie chitozanu jodkiem metylu w środowisku alkalicznym [147].



Rysunek 11. *N,N,N*-trimetylochitozan.

Inny sposób czwartorzędowania chitozanu polega na alkirowaniu grupy aminowej z jednoczesnym wprowadzeniem czwartorzędowej reszty amoniowej. W tym przypadku czwartorzędową amoniową pochodną chitozanu uzyskać można poprzez reakcję z chlorkiem glicydylotrimetyloamoniowym (GTMAC). Stopień czwartorzędowania chitozanu (DQ, ang. *degree of quaternization*), zależy od warunków reakcji, takich jak zastosowany rozpuszczalnik, czas reakcji, temperatura reakcji czy stosunek molowy GTMAC:chitozan (Tabela 16). W zależności od środowiska reakcji można zsyntezować *N*-podstawione czwartorzędowe pochodne chitozanu lub *N,O*-podstawione czwartorzędowe pochodne chitozanu, co przedstawia Rysunek 12.



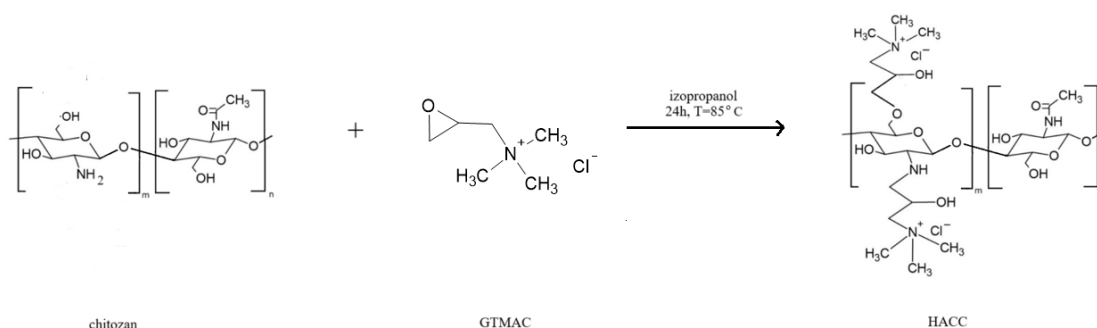
Rysunek 12. Czwartorzędowe pochodne chitozanu a) *N*-podstawiona i b) *N,O*-podstawiona.

Tabela 16. Metody otrzymywania czwartorzędowych pochodnych chitozanu w wyniku reakcji z GTMAC.

Właściwości chitozanu		Stosunek molowy GTMAC:CS	Środowisko reakcji	Czas reakcji [h]	Temperatura [°C]	Rodzaj podstawienia	DQ [%]	Lit.
Mw [g/mol]	DD [%]							
$7,8 \cdot 10^5$	89	4:1 – 6:1	woda	2-6	70-90	N-	46-66	[150]
$4,5 \cdot 10^5$	92	6:1	izopropanol	6	80	N-	96	[151]
$4,5 \cdot 10^5$	92	6:1	promieniowanie mikrofalowe	0,8	b.d.	N-	89	
$5,0 \cdot 10^5$	90	8:1	kwasowe (kwas nadchlorowy)	8	80	N-	87	[152]
b.d.	91	5:1	izopropanol	24	85	N,O-	130	[153]
$1,3 \cdot 10^5$	85	b.d.	izopropanol i woda	8	85	N-	100-127	[154]
średnia	72	1:1 – 6:1	kwasowe(1% kwas octowy)	24	70	N-	30-68	[155]
średnia	72	1:1-6:1	woda	4	80	N-	30-68	
średnia	72	2:1-4:1	zasadowe(1% NaOH)	24	70	N,O-	95	
niska	72	3:1	kwasowe (kwas octowy)	18	55	N-	72	[156]
niska	97	3:1	woda	10	85	N-	100	[157]
$4 \cdot 10^5$	90	1:1-4:1	kwasowe (1% kwas octowy)	2-8	60-95	N-	32-92	[158]
$5,3 \cdot 10^4$	79	0,6:1-1,8:1	woda	6	85	N-	12,4-43,7	[159]
$2,2 \cdot 10^5$	92	3:1-6:1	kwasowe (kwas octowy)	18	50-60	N-	56-74	[160]
$5 \cdot 10^4$	90	7:1	kwasowe (kwas octowy)	18	50	N-	63	[161]
$2,7 \cdot 10^5$	87	2:1-8:1	woda	24	60-80	N-	min. 60	[162]
b.d.	85	1:1-6:1	woda	15	60	N-	38-95	[163]

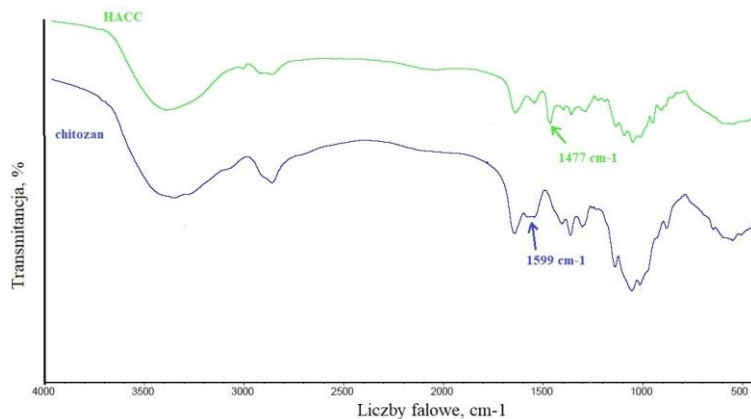
b.d. – brak danych

W niniejszej pracy doktorskiej skupiono się na syntezie pochodnej z użyciem GTMAC, ze względu na większą szansę na lepsze oddziaływanie z anionowym polimerem (oddalenie czwartorzędowej grupy amoniowej od szkieletu chitozanu). Czwartorzędową sól amoniową chitozanu przygotowano na podstawie przepisu He i współpr. [153] z niewielkimi modyfikacjami. Reakcji poddano chitozan firmy Sigma (M_w : 50 000 – 190 000, DD=83%). Stosunek molowy GTMAC do chitozanu wynosił 5:1. Jako środowisko reakcji zastosowano izopropanol. Reakcję prowadzono przez 24 godziny, w 85°C. Schemat reakcji przedstawia Rysunek 13. Zastosowano dwie metody oczyszczenia produktu. Pierwsza metoda polegała na dializie i liofilizacji. Druga metoda polegała na ekstrakcji Soxhleta. Otrzymano 2-hydroksypropylo-3-trimetyloamoniowy chlorek chitozanu (HACC) z wydajnością 73,8% po oczyszczeniu metodą pierwszą oraz z wydajnością 78,4% po oczyszczeniu metodą drugą.



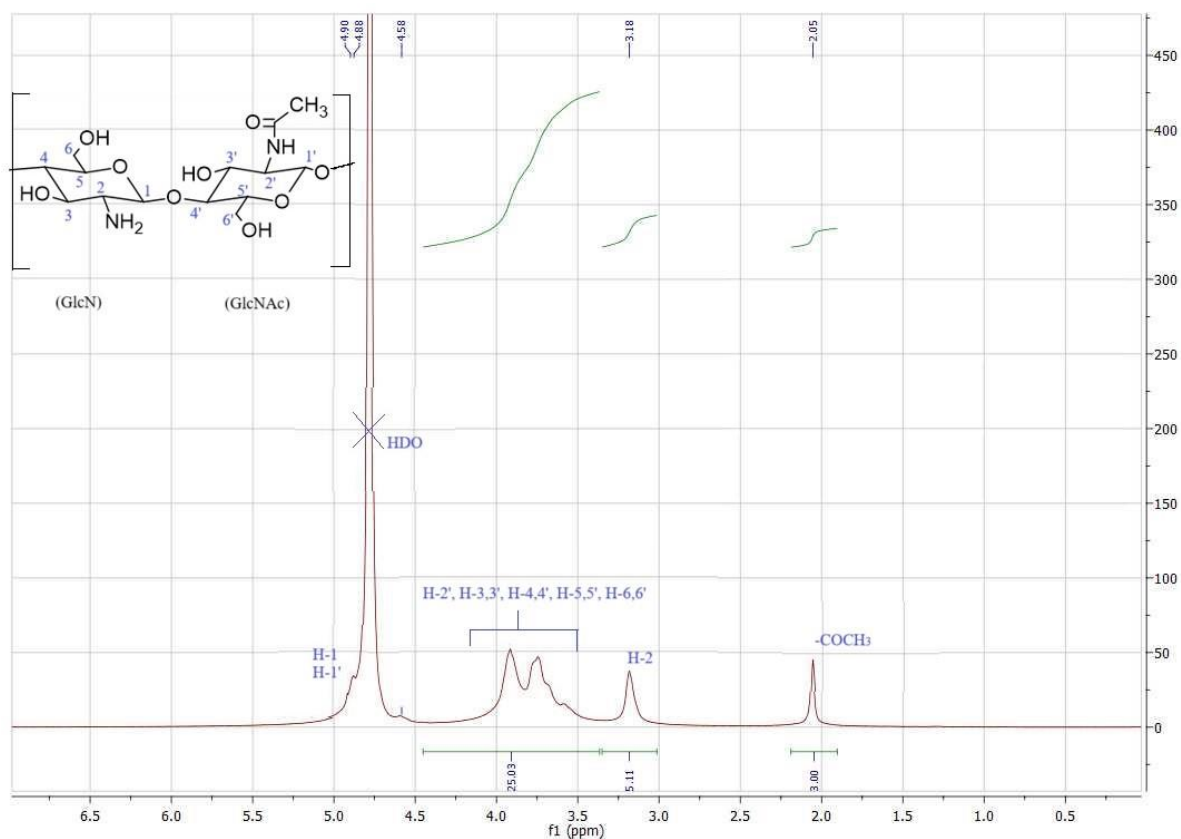
Rysunek 13. Schemat reakcji otrzymywania 2-hydroksypropylo-3-trimetyloamoniowego chlorku chitozanu (HACC).

Widma FTIR chitozanu i HACC (Rysunek 14) potwierdziły strukturę chitozanowej pochodnej. Czwartorzędowanie za pomocą GTMAC prowadziło do znaczącej zmiany w widmie FTIR. Charakterystyczne pasmo przy $\sim 1599\text{ cm}^{-1}$ odpowiadające drganiu deformacyjnemu NH_2 chitozanu uległo osłabieniu w widmie HACC. Pojawiło się nowe pasmo położone przy $\sim 1477\text{ cm}^{-1}$, co odpowiada asymetrycznemu rozciągającemu drganiu grup metylowych na czwartorzędowanym podstawniku amoniowym.



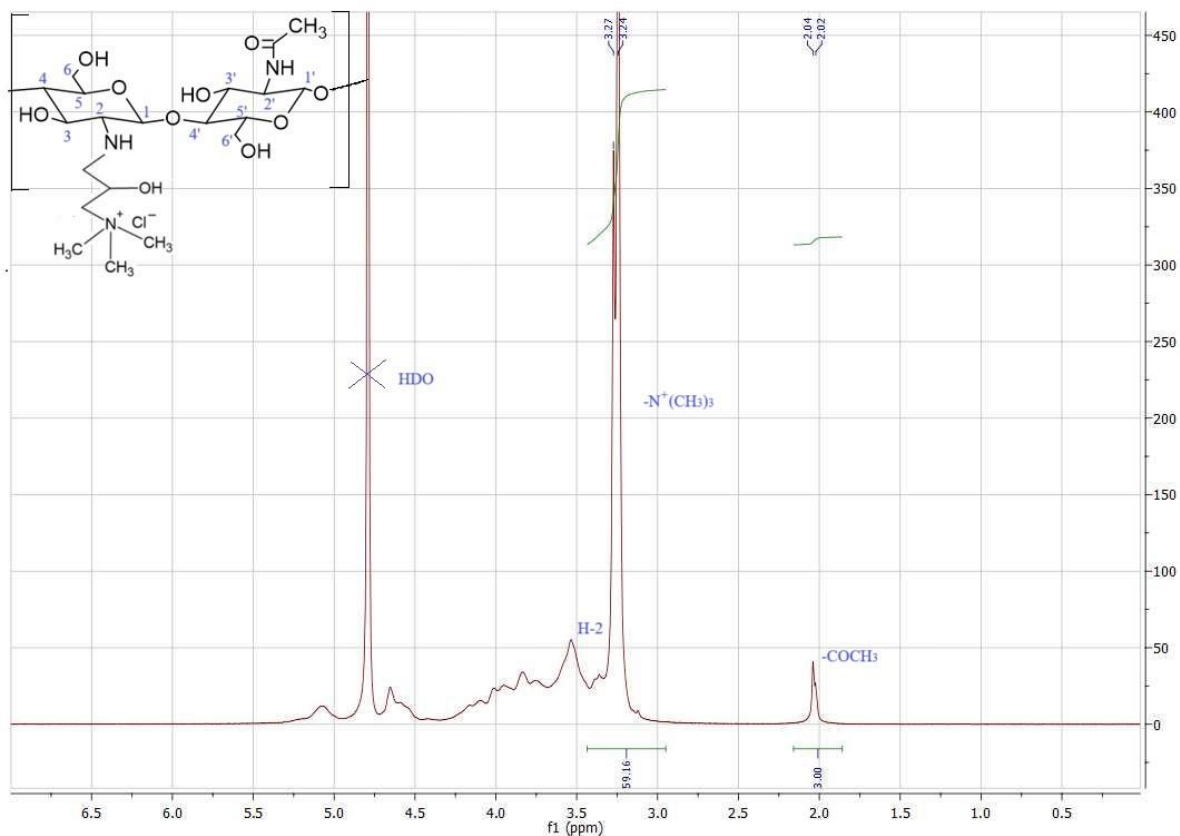
Rysunek 14. Widmo FTIR chitozanu (kolor niebieski) i 2-hydroksypropylo-3-trimetyloamoniowy chlorek chitozanu (HACC) (kolor zielony).

Innym sposobem na potwierdzenie struktury chitozanowej pochodnej była analiza ^1H NMR.



Rysunek 15. Fragment widma ^1H NMR w D_2O chitozanu (chitozan firmy Sigma, M_w : 50 000 – 190 000).

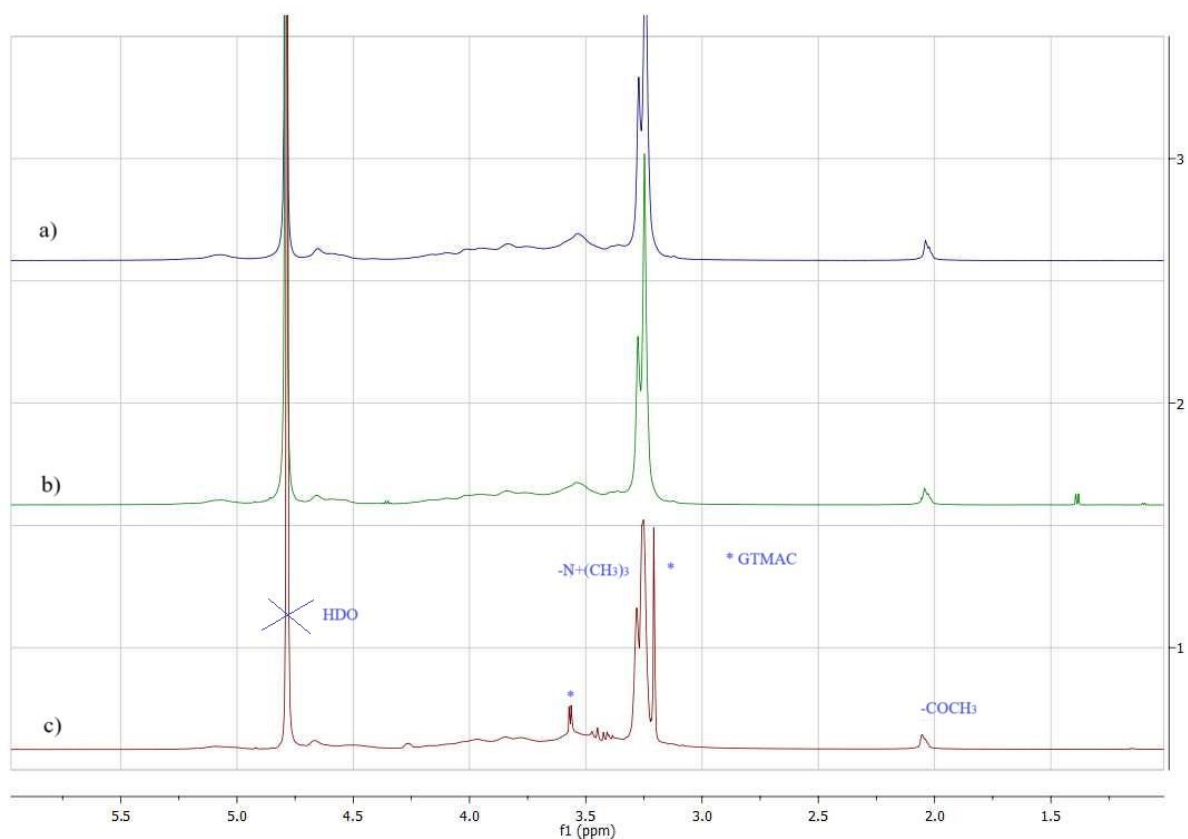
Rysunek 15 przedstawia widmo ^1H NMR handlowego chitozanu (Sigma, $M_w=50\,000 - 190\,000$), który poddano czwartorzędowaniu. Z otrzymanego widma ^1H NMR sygnały protonów przy 2,05 ppm (-COCH₃ z GlcNAc) oraz sygnał protonu przy 3,18 ppm (H-2 z GlcN) posłużyły do wyznaczenia DD. Oznaczony DD za pomocą ^1H NMR wynosi 83,63% – wynik ten pokrywa się z wartością deklarowaną przed producenta (DD=83,00%). Do obliczeń korzystano ze wzoru nr 8, który zamieszczono i opisano w części eksperymentalnej, w rozdziale 2.4.1.



Rysunek 16. Fragment widma ^1H NMR w D_2O dla 2-hydroksypropylo-3-trimetyloamoniowego chlorku chitozanu (HACC) po oczyszczeniu przez dializę.

Rysunek 16 przedstawia widmo ^1H NMR HACC – produktu po oczyszczeniu poprzez dializę. Obserwuje się dwa singlety przy 3,24 i 3,27 ppm, wskazujące na obecność trzech grup metylowych przy czwartorzędowym atomie azotu. Ponadto istniejące dwa singlety świadczą o podstawieniu nie tylko przy azocie grupy aminowej chitozanu, ale również przy tlenie grupy hydroksylowej. Zróznicowanie *O*- i *N*-podstawienia jest zauważalne również przy sygnałach protonów grup acetylowych, obserwuje się dwa singlety przy 2,02 i 2,04 ppm.

Za pomocą ^1H NMR oznaczono DQ otrzymanej pochodnej, który wynosił $\text{DQ} = 98,29\%$. Korzystano ze wzoru nr 9, który zamieszczono i opisano w części eksperymentalnej, w rozdziale 2.4.1.

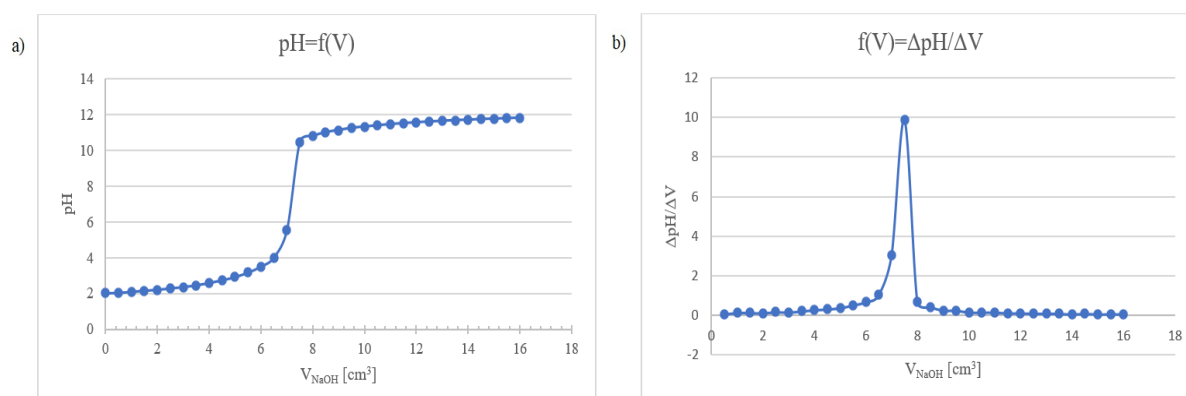


Rysunek 17. Fragmenty widm ^1H NMR w D_2O dla 2-hydroksypropylo-3-trimetyloamoniowego chlorku chitozanu (HACC): a) produkt oczyszczony przez dializę, b) produkt oczyszczony w aparacie Soxhletha, c) surowy produkt.

Z kolei Rysunek 17 przedstawia porównanie widm ^1H NMR: HACC otrzymanego bezpośrednio po syntezie, bez oczyszczenia (Rysunek 17c), oczyszczonego przez dializę (Rysunek 17a) oraz oczyszczonego w aparacie Soxhletha (Rysunek 17b). W widmie ^1H NMR HACC bezpośrednio po syntezie (Rysunek 17c) zaobserwowano sygnały pochodzące od GTMAC, który został użyty do modyfikacji chitozanu w nadmiarze. Konieczne jest zatem pozbycie się go poprzez oczyszczenie surowego produktu. Można tego dokonać na dwa sposoby. Pierwszym sposobem jest rozpuszczenie próbki w $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ i umieszczenie jej w worku dializacyjnym. Próbkę była dializowana po to, aby mieć pewność, że produkt nie zawiera niskocząsteczkowych zanieczyszczeń. Produkt następnie liofilizowano, aby zapewnić łagodne warunki suszenia. W widmie ^1H NMR HACC po dializie i liofilizacji (Rysunek 17a) nie obserwujemy sygnałów pochodzących od GTMAC – metoda oczyszczania produktu w ten sposób jest skuteczna. Metoda ta może być problematyczna na większą skalę – koszt zakupu worków do dializy, stosunkowo długi czas oczyszczania, niewielka ilość produktu, która może być poddana dializie, koszt zakupu liofilizatora. Drugim sposobem oczyszczenia próbki jest przeprowadzenie ekstrakcji w aparacie Soxhletha (większa wydajność przy niższym koszcie). W widmie ^1H NMR HACC po oczyszczeniu w aparacie Soxhletha (Rysunek 17b) nie obserwujemy sygnałów pochodzących od GTMAC – metoda oczyszczania produktu w ten sposób jest skuteczna i może być stosowana na większą skalę.

Na podstawie widm FTIR i ^1H NMR otrzymanej czwartorzędowej soli amoniowej chitozanu HACC można wnioskować, że czwartorzędowe grupy amoniowe zostały z powodzeniem wprowadzone do struktury polimeru.

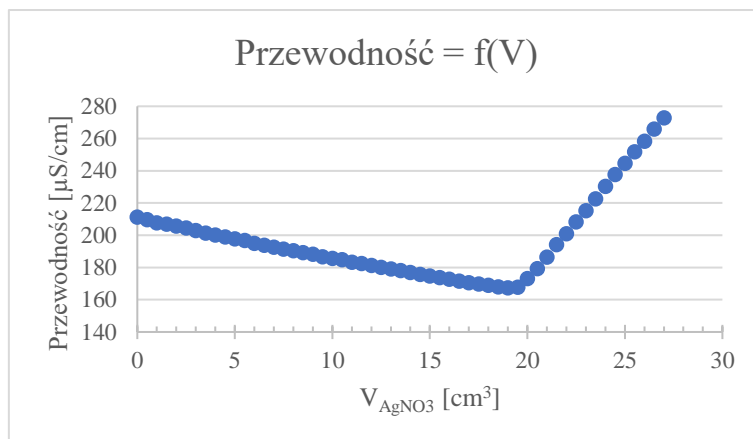
W celu oznaczenia stopnia podstawienia grup aminowych w chitozanie przeprowadzono również miareczkowanie za pomocą 0,1M NaOH. Otrzymano wykresy pH w funkcji objętości dodawanego titranta (Rysunek 18). Oznaczenie polegało na rozpuszczeniu otrzymanej pochodnej (HACC) w wodzie i doprowadzeniu jej pH do wartości 2, za pomocą 0,1M HCl. Roztwór następnie miareczkowano za pomocą titranta – 0,1M NaOH. Na wykresie jest widoczny jeden punkt przegięcia, który odpowiada odmiareczkowaniu dodanej ilości 0,1M HCl. Brak natomiast drugiego punktu przegięcia, który odpowiadałby wolnym grupom aminowym w cząsteczce – wnioskuje się zatem, że wszystkie grupy $-\text{NH}_2$ zostały podstawione przez GTMAC.



Rysunek 18. a) Krzywa miareczkowania dla próbki HACC, b) Wyznaczenie punktu przegięcia metodą pierwszej pochodnej.

Jako metodę alternatywną w stosunku do spektroskopii ^1H NMR, do wyznaczenia DQ wybrano miareczkowanie konduktometryczne otrzymanej pochodnej za pomocą roztworu AgNO_3 . Otrzymano wykres przewodności w funkcji objętości dodawanego titranta (Rysunek 19) – punkt, w którym po dodaniu kolejnej porcji AgNO_3 otrzymano najniższą wartość przewodności, świadczy o tym, że wszystkie chlorki z czwartorzędowej pochodnej zostały podstawione w roztworze przez jony srebra. DQ obliczono korzystając ze wzoru nr 10, opisanego w części eksperymentalnej, rozdział 2.4.1. DQ otrzymanej pochodnej wynosi 100% po oczyszczeniu produktu metodą pierwszą (dializa) i 105% po oczyszczeniu produktu metodą drugą (ekstrakcja Soxhleta).

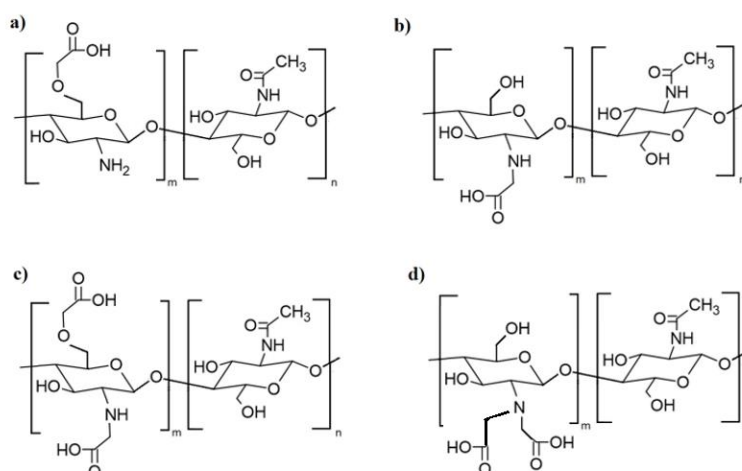
Po przeprowadzonych analizach stwierdza się, że *N*-postawienie wynosi 83% (brak drugiego punktu przegięcia w przeprowadzonym miareczkowaniu potencjometrycznym, który odpowiadałby wolnym grupom aminowym w cząsteczce – wszystkie grupy $-\text{NH}_2$ zostały podstawione), a zatem *O*-postawienie wynosi 17%. W pracy [153], na podstawie której przeprowadzono syntezę na potrzeby pracy doktorskiej DQ otrzymanej pochodnej wynosił 130%.



Rysunek 19. Krzywa miareczkowania konduktometrycznego dla otrzymanej pochodnej HACC w celu wyznaczenia jej DQ .

4. Modyfikacja chitozanu - reakcje karboksymetylowania

Karboksymetylochitozan (CMC) to polimer, który należy do grupy polielektrolitów amfoterycznych, ponieważ zawiera w łańcuchu dwa rodzaje grup funkcyjnych: zasadowe grupy aminowe i kwasowe grupy karboksylowe. CMC jest rozpuszczalny w szerokim zakresie pH, a jego zaletą jest aktywność przeciwdrobnoustrojowa, zdolność tworzenia filmu oraz niska toksyczność [164]. Miejscami reaktywnymi dla karboksymetylacji chitozanu są grupy aminowe i hydroksylowe obecne w jego łańcuchach. W zależności od warunków reakcji karboksymetylowania otrzymuje się *O*-, *N*-, *N,O*- lub *N,N*-podstawione pochodne (Rysunek 20), co przedstawia również Tabela 17. *O*-CMC otrzymuje się głównie wówczas, gdy reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej, w zawiesinie izopropanol/woda w obecności kwasu monochlorooctowego i wodorotlenku sodu. Gdy reakcja jest prowadzona w wyższych temperaturach to otrzymuje się *N*- i *N,O*-CMC. *N*-CMC można otrzymać również w reakcji chitozanu z kwasem gliksalowym, a następnie redukcję za pomocą cyjanowodoru sodu.



Rysunek 20. a) *O*-karboksymetylochitozan (*O*-CMC), b) *N*-karboksymetylochitozan (*N*-CMC), c) *N,O*-karboksymetylochitozan (*N,O*-CMC), d) *N,N*-karboksymetylochitozan (*N,N*-CMC).

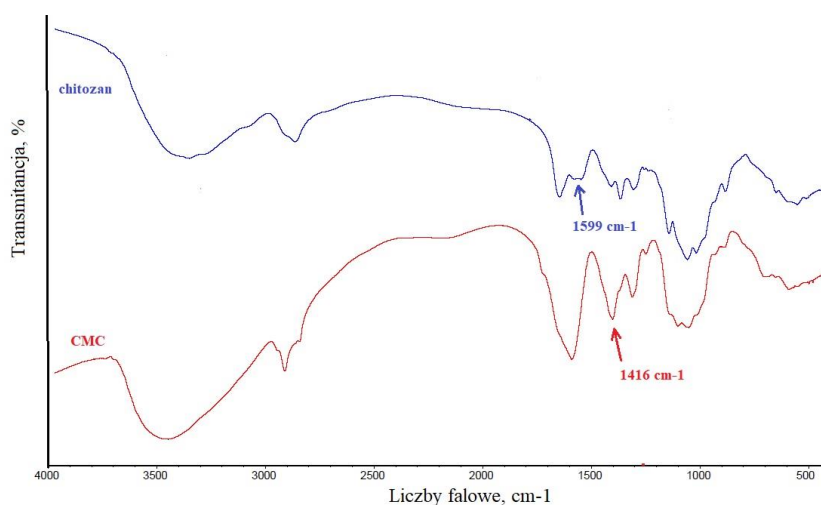
Tabela 17. Metody otrzymywania karboksymetylochitozanu za pomocą kwasu monochlorooctowego.

Właściwości chitozanu		Stosunek molowy CS:CH ₂ ClCOOH	Czas reakcji [h]	Temperatura [°C]	Rozpuszczalnik	DS (rodzaj podstawienia)	Lit.
M _w [g/mol]	DD [%]						
1,0-1,5·10 ⁶	85	1:6	3	50	izopropanol:woda (8:2, v/v)	2.1 (<i>N,O</i> -CMC) 0.6 (<i>N</i> -CMC)	
3,0-5,0·10 ⁴	85	1:3	3	50	izopropanol:woda (8:2, v/v)	2.2 (<i>N,O</i> -CMC) 0.7 (<i>N</i> -CMC)	
0,7-1,0·10 ⁶	85	1:6	3	50	izopropanol:woda (8:2, v/v)	1.1 (<i>N,O</i> -CMC) 0,4 (<i>N</i> -CMC)	[165]
2,5-4,0·10 ⁴	85	1:3	3	50	izopropanol:woda (8:2, v/v)	1.4 (<i>N,O</i> -CMC) 0.3 (<i>N</i> -CMC)	
1,2-1,7·10 ⁶	85	1:6	3	50	izopropanol:woda (8:2, v/v)	1.0 (<i>N,O</i> -CMC) 0.3 (<i>N</i> -CMC)	
b.d.	b.d.	1:4,3 – 1:8,6	3, 5, 7 lub 10	pokojowa	izopropanol	0,52-1,44 (<i>N,O</i> -CMC)	[166]
b.d.	90	1:8	0,15-0,3	60-100	brak (promieniowanie mikrofalowe)	0,07-0,89 (<i>N,O</i> -CMC)	[167]
1,9-3,1·10 ⁵	75-85	1:2	4	25	izopropanol:woda (8:2 v/v)	b.d.	[168]
4,0·10 ⁵	90	1:2,6	4	0-60	izopropanol:woda (1:10-0:10)	0,012-0,998 (<i>O</i> -CMC)	[169]
0,5-10,8·10 ⁵	74-90	1:2	3	60	izopropanol	0,48-0,98 (<i>N,O</i> -CMC)	
0,5-10,8·10 ⁵	74-90	1:2	5-24	0-30	woda	0,42-0,73 (<i>O</i> -CMC)	[170]
3,18·10 ⁵	73,6	1:100	4	65	izopropanol	0,48 (<i>O</i> -CMC)	[171]
8,8·10 ⁵	97	1:2	2	65	izopropanol	0,45 (b.d.)	[172]
b.d.	85	1:1-4	0,6-6	pokojowa	izopropanol:woda (8:2,v/v)	0,24-0,96 (b.d.)	[173]
6,7·10 ⁴	76	1:3	4	65	izopropanol	0,81 (<i>N,O</i> -CMC)	[174]
b.d.	76	1:3	4	65	izopropanol	0,64 (b.d.)	[175]
b.d.	>90	1:2,6	4	60	izopropanol:woda (8:2, v/v)	0,99 (<i>N,O</i> -CMC)	[176]
średnia	77	1:2	4	50	izopropanol:woda (8:2, v/v)	0,67 (<i>O</i> -CMC)	[177]
średnia	75-85	1:2,6	4-5	50-60	izopropanol:woda (8:2, v/v)	3,74-5,07 (<i>N,O</i> -CMC)	[178]

b.d. – brak danych

N,O-CMC przygotowano zgodnie z pracą [176] z niewielkimi modyfikacjami. Reakcji poddano chitozan firmy Sigma (M_w : 50 000 – 190 000, DD=83%). Stosunek molowy chitozanu do kwasu monochlorooctowego wynosił 1:2,6. Jako środowisko reakcji zastosowano mieszaninę izopropanol:woda (8:2, v/v) oraz NaOH w celu spęcznienia i alkalizacji. Reakcję prowadzono przez 4 godziny, w 60°C. Otrzymano sól sodową CMC. Wydajność reakcji wynosiła 73,3%.

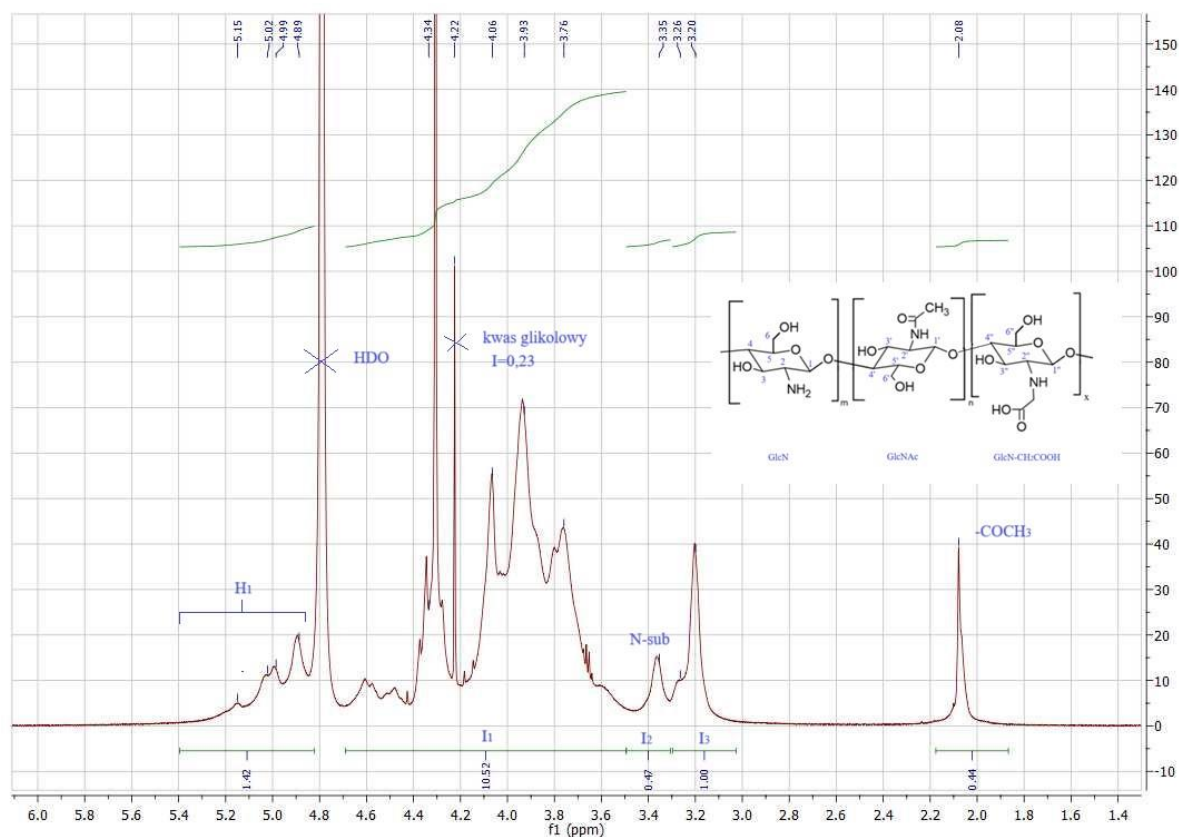
Widma FTIR chitozanu i CMC potwierdziły strukturę chitozanowej pochodnej (Rysunek 21). Charakterystyczne pasmo przy $\sim 1599\text{ cm}^{-1}$ odpowiadające drganiu deformacyjnemu NH_2 chitozanu uległo osłabieniu w widmie CMC. Widmo CMC ma charakterystyczne pasmo przy 1416 cm^{-1} , które powstało z asymetrycznych drgań rozciągających grupy COO^- . Obecność tego pasma wskazuje na pomyślną substytucję grup karboksymetylowych w łańcuchu chitozanu.



Rysunek 21. Widmo FTIR chitozanu (kolor niebieski) i karboksymetylochitozanu (CMC) (kolor czerwony).

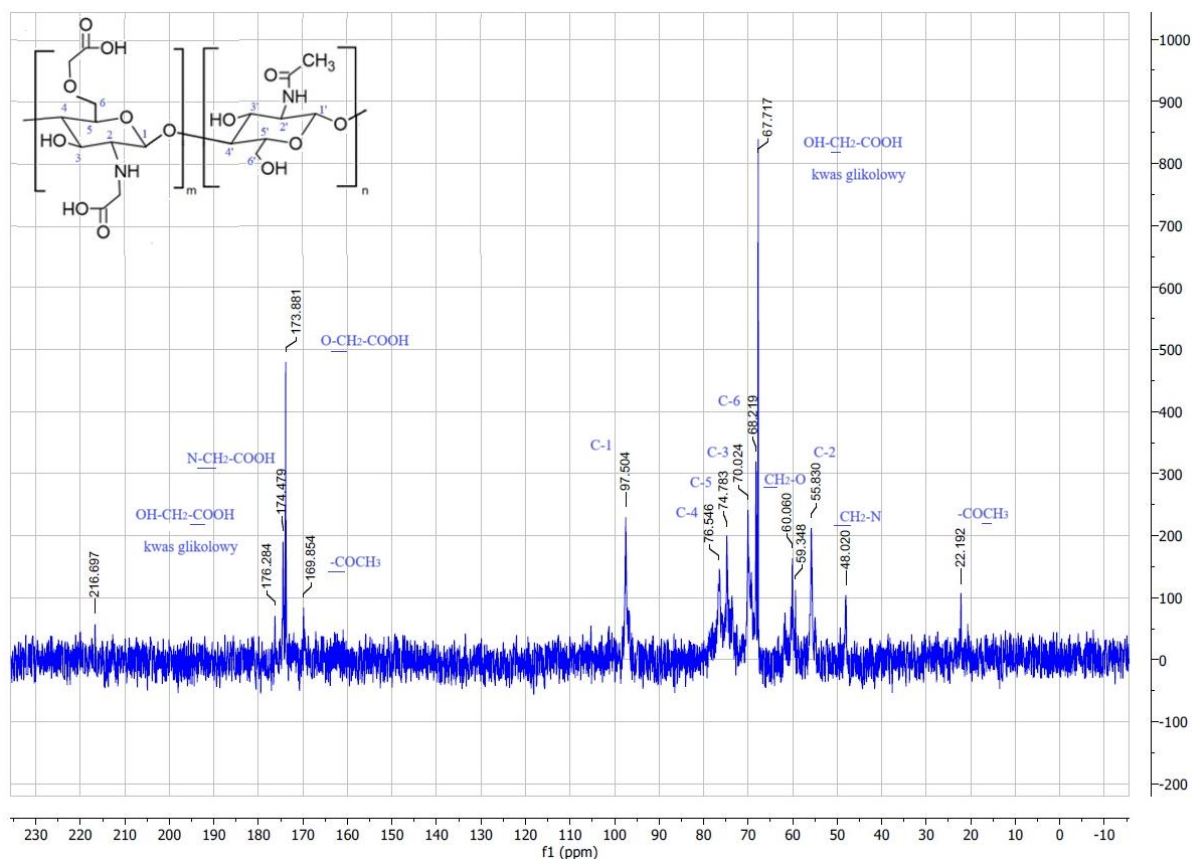
Rysunek 22 przedstawia widmo ^1H NMR otrzymanego CMC. Modyfikacje strukturalne wprowadzone przez karboksymetylowanie obserwowano porównując widma ^1H NMR chitozanu (Rysunek 15) i otrzymanego CMC (Rysunek 22). Dla CMC podobnie jak dla chitozanu grupę sygnałów przy 2,08 ppm przypisuje się protonom ugrupowań metylowych należących do grup acetamidowych (GlcNAc). Dla CMC sygnały obserwowane w zakresie 3,0-3,3 ppm (oznaczenie I_3 na rysunku) odpowiadają protonom przy węglu C-2 w pierścieniach GlcN (H-2) oraz GlcNAc (H-2'), podczas gdy sygnał przy 3,35 ppm (I_2 na rysunku) odpowiada protonowi przy węglu C-2 w pierścieniu z N-podstawieniem, GlcN- CH_2COOH (H-2''). Sygnały między 3,5 a 4,2 ppm (I_1 na rysunku) odpowiadają protonom związanym z atomami węgla C-3, C-4, C-5 i C-6 piranoz oraz protonom z grupy metylenowej reszty karboksymetylowej. Proton związany z węglem C-1 daje sygnał w zakresie 4,8-5,4 ppm. O występowaniu *N*-karboksymetylacji świadczą sygnały w zakresie 3,3-3,5 ppm w widmie CMC. ^1H NMR zastosowano do określenia stopnia podstawienia (DS, ang. *degree of substitution*)

w miejscach hydroksylowych i aminowych chitozanu. Obliczenia wykonano za pomocą wzorów nr 11-12, które opisano w części eksperymentalnej, rozdział 2.4.2. DS CMC oznaczony za pomocą ^1H NMR wynosi 108%, przy czym udział pochodnych mono-*O* do mono-*N* wynosi odpowiednio: 0,76:0,32. W pracy [176], na postawie której przeprowadzono syntezę CMC również otrzymano *N,O*-CMC, a DS otrzymanej pochodnej wynosił 99%.



Rysunek 22. Fragment widma ^1H NMR w D_2O dla otrzymanej karboksymetylochitozanu (CMC).

Z kolei Rysunek 23 przedstawia widmo ^{13}C NMR otrzymanego CMC wraz z opisanymi sygnałami. Sygnał przy 67,7 ppm przypisuje się węglowi $-\text{CH}_2-$ kwasu glikolowego, który w tej syntezie powstał jako produkt uboczny.

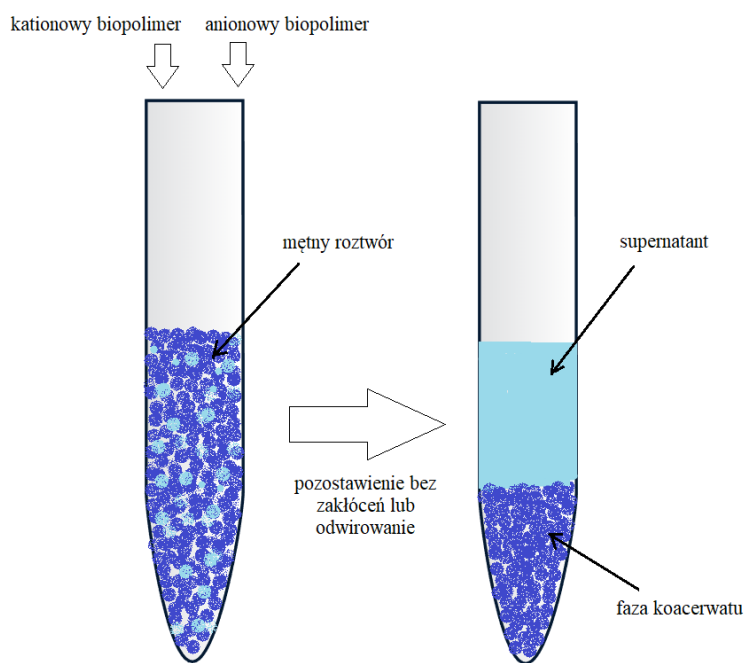


Rysunek 23. Widmo ^{13}C NMR w D_2O dla karboksymetylochitozanu (CMC).

5. Otrzymywanie koacerwatów

Historycznie, słowo „koacerwat” pochodzi od łacińskiego słowa „acervus”, które oznacza agregat, a przedrostek „co” oznacza połączenie cząstek koloidalnych. Termin „koacerwat” oznacza metastabilną zawiesinę kropelek bogatych w makrojonny. Koacerwacja to zjawisko, w którym roztwór koloidalny rozdziela się na fazę bogatą w koloid (faza koacerwatu) i fazę ubogą w koloid (faza równowagowa) [179], [180]. W oparciu o układy polimerowe biorące udział w reakcji i mechanizm rozdzielenia faz wyróżnia się dwa rodzaje koacerwacji: koacerwację prostą i kompleksową (złożoną). W koacerwację prostą zaangażowany jest pojedynczy polimer, a koacerwaty uzyskuje się poprzez zmianę warunków, np. przez zmianę różnych parametrów, takich jak dodanie mikrojonów, odwodnienie, zmianę temperatury czy zmianę pH. Koacerwacja kompleksowa obejmuje oddziaływanie przeciwieście naładowanych polimerów, zwykle białek i polisacharydów. Głównym czynnikiem napędzającym ten rodzaj koacerwacji jest oddziaływanie elektrostatyczne między naładowanymi makrocząsteczkami obecnymi w medium reakcyjnym [181]. Koacerwacja kompleksowa przeciwieście naładowanych polielektrolitów może prowadzić do uzyskania hydrożeli o kontrolowanych właściwościach pod względem elastyczności i wytrzymałości [182]. Koacerwacja wykorzystuje przyciąganie elektrostatyczne pomiędzy dwoma polimerami o przeciwnych ładunkach,

a tworzenie koacerwatów występuje w małym zakresie pH. Utworzone koacerваты to makroskopowe, podobne do cieczy wodne kondensaty bogate w polijony, które są w równowadze z wodną fazą ubogą w polijony, zwaną również supernatantem. W zależności od składu chemicznego polijonów i warunków środowiskowych mogą również tworzyć się kondensaty przypominające ciała stałe, zwane kompleksami polielektrolitowymi.



Rysunek 24. Schemat koacerwacji kompleksowej.

Kompleksowe koacerваты polisacharydowo-białkowe należą do wiodących par układów biopolimerów, które były stosowane w ciągu ostatnich dziesięcioleci do kapsułkowania wielu składników aktywnych [183]. Na koacerwację kompleksową między polisacharydem i białkiem ma wpływ wiele ważnych parametrów, takich jak stosunek białka do polisacharydu, pH, siła jonowa (stężenie soli), całkowite stężenie polimeru, masa cząsteczkowa polisacharydów i białek [183], [184]. Kapsułkowanie metodą koacerwacji cieszy się ostatnio coraz większym zainteresowaniem ze względu na praktyczne zastosowania m.in. w rolnictwie czy w przemyśle pestycydowym.

Z literatury patentowej znane są koacerваты chitozanu. Dokument patentowy WO2019054971A2 [185] ujawnia wytwarzanie koacerwatów chitozanu z kwasem hialuronowym, który ma zastosowanie w inżynierii tkankowej, natomiast dokument patentowy US2020054786A1 [186] ujawnia wytwarzanie koacerwatów chitozanu z kwasem hialuronowym – zastosowanie jako wypełniacze skórne. Kolejny patent US2011059162A1 [187] opisuje tworzenie koacerwatów z kwasem taninowym jako ujemnie naładowanym elektrolitem – zastosowanie w inżynierii tkankowej, do dostarczania leków, do zastosowań przeciwbakteryjnych i/lub przeciwgrzybiczych, do zastosowań związanych z gojeniem się ran. W kolejnym patencie CN106942703A [188] do tworzenia koacerwatów chitozanowych zastosowano zeinę, białko występujące w kukurydzy. Chociaż opisano wiele

przykładów koacerwatów z chitozanem, to technologia ta ma ograniczenia, które są związane z wrażliwością koacerwatów na pH, siłę jonową i temperaturę. Głównym ograniczeniem związanym z zastosowaniem chitozanu w tworzeniu koacerwatów jest słaba rozpuszczalność chitozanu w wodzie, stąd konieczne jest stosowanie rozpuszczalników o charakterze kwasowym.

Proponowane, nowe rozwiązanie zakłada wykorzystanie rozpuszczalnych w wodzie pochodnych chitozanu, otrzymanie koacerwatów na ich bazie i użycie ich jako biodegradowalnych komponentów nawozowych. Do badań wytypowano dwie pochodne chitozanu – czwartorzędową sól amoniową chitozanu (HACC) oraz karboksymetylochitozan (CMC). Takie rozwiązanie nie zostało do tej pory zaproponowane ani w literaturze naukowej, ani w patentowej – niniejsza praca doktorska jest pierwszym doniesieniem na temat koacerwacji wyżej wymienionych pochodnych chitozanu i zastosowaniu ich jako komponentów nawozowych. Czwartorzędowe sole amoniowe chitozanu mają dobrą rozpuszczalność w wodzie, wysoką zdolność zatrzymywania wilgoci oraz poprawiają działanie przeciwdrobnoustrojowe. Z literatury wynika, że czwartorzędowe sole amoniowe chitozanu stosowano do tworzenia hydrożeli, m.in. z alginianem sodu [189]. Z kolei CMC to rozpuszczalna w wodzie pochodna chitozanu, która oprócz doskonałej rozpuszczalności w wodzie cieszy się dużym zainteresowaniem ze względu na zdolność do tworzenia powłok, a także właściwości przeciwbakteryjne. Z literatury wynika, że CMC był stosowany do tworzenia koacerwatów z innymi polimerami, np. z alginianem sodu [190]. Podczas przeglądu literaturowego i patentowego nie spotkano się z próbami badań koacerwacji między CMC i HACC. Syntezy wytypowanych pochodnych chitozanu są proste do przeprowadzenia, nie wymagają skomplikowanej aparatury oraz odczynników. Zalety proponowanego rozwiązania to: synteza pochodnych chitozanu z łatwo dostępnych reagentów z możliwością zwiększenia skali, proces koacerwacji jest prowadzony w środowisku wodnym i nie wymaga innych rozpuszczalników ani dodatkowych związków wspomagających, proces koacerwacji przebiega w temperaturze pokojowej i nie wymaga stosowania czynników sieciujących.

W przypadku koacerwacji dwóch przeciwnie naładowanych polimerów: kationowej czwartorzędowej soli amoniowej chitozanu – HACC oraz anionowego CMC, stosunek molowy grup naładowanych dodatnio i ujemnie w ich łańcuchach odgrywa kluczową rolę. Podczas zwiększania stosunków molowych kationów do anionów i/lub anionów do kationów obserwowano rozpuszczenie koacerwatów i zmniejszenie mętności roztworów. Zastosowanie podobnych stosunków molowych obu polimerów (objętości zawierające równomolowe ilości pochodnych) powodowało powstanie bardzo mętnego roztworu, co w efekcie po odwirowaniu prowadziło do wytworzenia dużej ilości frakcji kondensatu (Tabela 18). Otrzymanie koacerwatów potwierdzono wizualnie. Utworzone kompleksy przedstawia Rysunek 25 – otrzymane mieszaniny CMC:HACC były bardziej lub mniej mętne. Zmętnienie roztworów mierzono przez pomiar absorbancji przy 600 nm. Dodatkowo próbki odwirowano i zważono odwirowane frakcje powstałych koacerwatów – potwierdzono również w ten sposób, w których próbkach utworzyło się najwięcej koacerwatu.

Obie pochodne, zarówno HACC jak i CMC, zostały zsyntezowane z tego samego chitozanu – chitozan firmy Sigma, M_w : 50 000 – 190 000 (deklaracja producenta), oznaczona $M_w \approx 128\ 000$ (ten sam substrat użyty do syntez obu pochodnych).

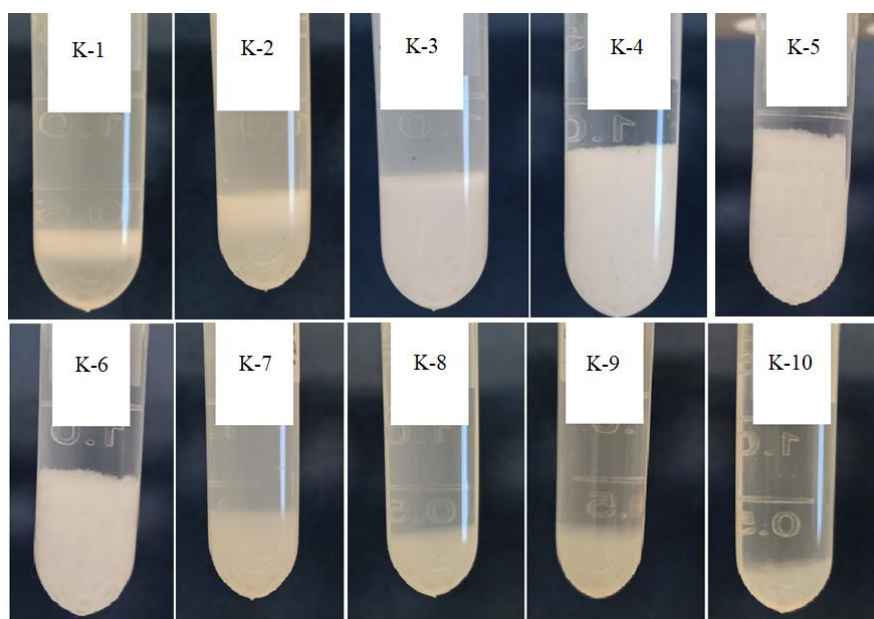
Tabela 18. Koacerwaty HACC i CMC – skład mieszanin oraz charakterystyka.

Nazwa próbki	Stosunek objętościowy (v/v) CMC:HACC ^{1), 2)}	pH	Absorbancja ($\lambda = 600\text{ nm}$)	Masa koacerwatu po odwirowaniu ³⁾ [g]
CMC	10:0	9,70	0,0502	-
K-1	9:1	9,60	0,1489	0,61
K-2	8:2	9,57	0,3807	1,51
K-3	7:3	9,51	1,0178	4,08
K-4	6:4	9,42	2,2831	10,30
K-5	5,5:4,5	9,28	2,7741	11,22
K-6	5:5	9,19	2,6501	10,78
K-7	4:6	8,99	2,4247	10,09
K-8	3:7	8,81	0,6302	2,55
K-9	2:8	8,61	0,2348	0,98
K-10	1:9	8,32	0,1474	0,60
HACC	0:10	7,03	0,0327	-

1) Stężenia użytych wodnych roztworów CMC oraz HACC – 1%

2) DS = 108% (dla CMC), DQ = 105% (dla HACC)

3) Objętość całkowita zmieszanych roztworów wynosiła 20 cm³



Rysunek 25. Utworzone koacerwaty dla mieszanin karboksymetylochitozanu (CMC) i 2-hydroksypropylo-3-trimetylamoniowego chlorku chitozanu (HACC).

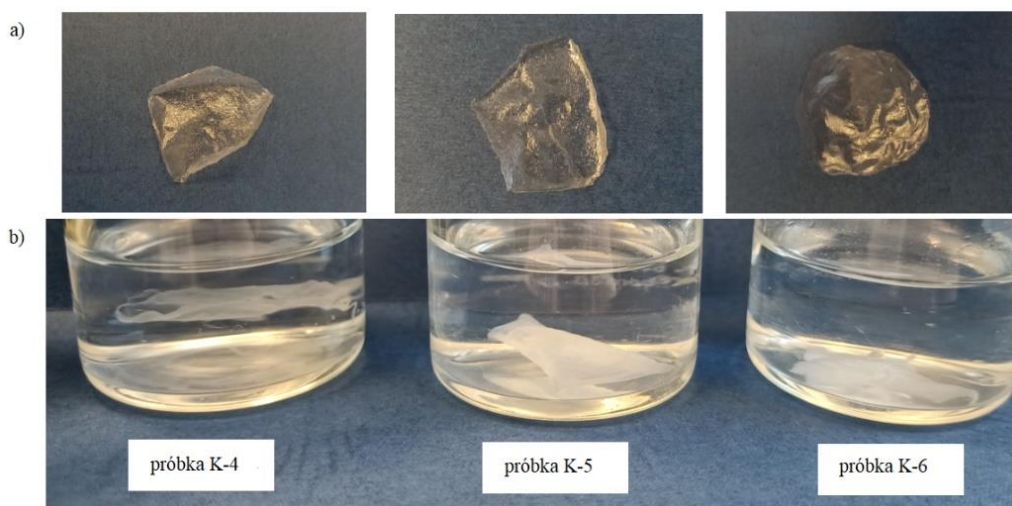
Dla próbek, w których powstało najwięcej koacerwatu (K-4, K-5, K-6, K-7) przeprowadzono badania chłonności wody (Q) – korzystano ze wzoru nr 12, który został opisany w części eksperymentalnej. Tabela 19 przedstawia uzyskane wyniki. Próbki wykazywały oczekiwane cechy hydrożelu fizycznego. Po wysuszeniu produkty były ciałami stałymi, co umożliwia ich zastosowanie jako dodatki do komponowania nawozów stałych.

Tabela 19. Badania chłonności wody [Q] dla wybranych próbek koacerwatów.

Nazwa próbki	Nr próbki	Naważka suchej próbki [g]	Naważka mokrej próbki [g]	Q [%]	Q _{sr} (SD) [%]
K-4	1	0,5012	1,1821	135,9	136,4 (3,7)
	2	0,5063	1,1795	133,0	
	3	0,5008	1,2032	140,3	
K-5	1	0,5102	1,3301	160,7	162,8 (6,1)
	2	0,5014	1,3522	169,7	
	3	0,5033	1,2986	158,0	
K-6	1	0,5002	1,2501	149,9	151,8 (6,8)
	2	0,5011	1,2995	159,3	
	3	0,5018	1,2352	146,2	
K-7	1	0,5018	1,2012	139,4	135,8 (4,3)
	2	0,4992	1,1834	137,1	
	3	0,5033	1,1629	131,1	

Dla poprawy efektywności upraw niezbędna jest w glebie obecność zarówno składników odżywczych, jak i wody. Potrzebna jest technologia, która łączy nawóz ze składnikiem magazynującym wodę. Istnieją już CRF/SRF, które kontrolują zarówno uwalnianie składników nawozowych, jak i zachowują duże ilości wody po nawożeniu, poprawiają efektywność wykorzystania składników odżywczych, poprawiają retencję wody w glebie i zmniejszenie zużycia wody. Jednakże ich zastosowanie jest ograniczone ze względu na to, że większość materiałów magazynujących wodę wytwarzanych jest na bazie syntetycznych, niedegradowalnych polimerów, głównie poliakrylanów. Zaletami proponowanego rozwiązania są: synteza pochodnych chitozanu z łatwo dostępnych reagentów z możliwością zwiększenia skali, proces koacerwacji jest prowadzony w środowisku wodnym (nie wymaga innych rozpuszczalników, czynników sieciujących) oraz przebiega w temperaturze pokojowej. Badania zostały opublikowane w czasopiśmie Przemysł chemiczny pt. „Fizyczne hydrożele na bazie pochodnych chitozanu” [191]. Wynalazek został zgłoszony do Urzędu Patentowego RP – nr zgłoszenia P.441708 „Sposób otrzymywania koacerwatów na bazie pochodnych chitozanu i zastosowanie koacerwatów na bazie pochodnych chitozanu”.

Przeprowadzono również dodatkowe badania – możliwość otrzymywania filmów z CMC oraz HACC oraz koacerwatów CMC/HACC. W tym celu 1% roztwory CMC i HACC oraz uzyskane mieszaniny koacerwatów K1-K10 wlewano na szalki Petriego, po czym suszono je w suszarce przez noc w 40°C, w celu odparowania wody. Po wyciągnięciu z suszarki otrzymano stabilne, cienkie filmy, które zanurzano w wodzie, sprawdzając ich rozpuszczalność. Rozpuszczalność otrzymanych filmów w wodzie po 1 i 7 dniach przedstawia Tabela 20. Najlepsze, nierozpuszczalne w wodzie filmy otrzymano dla próbek K-4, K-5 oraz K-6, co przedstawia Rysunek 26.



Rysunek 26. Badania rozpuszczalności otrzymanych folii w wodzie: a) folie przed umieszczeniem w wodzie, b) folie po zanurzeniu w wodzie (po 7 dniach).

Tabela 20. Rozpuszczalność filmów utworzonych w wyniku koacerwacji CMC i HACC.

Nazwa próbki	Rozpuszczalność filmu po 1 dniu	Rozpuszczalność filmu po 7 dniach
CMC	rozpuszcza się	-
K-1	rozpuszcza się	-
K-2	rozpuszcza się	-
K-3	rozpuszcza się częściowo	rozpuszcza się
K-4	nie rozpuszcza się	nie rozpuszcza się
K-5	nie rozpuszcza się	nie rozpuszcza się
K-6	nie rozpuszcza się	nie rozpuszcza się
K-7	nie rozpuszcza się	rozpuszcza się częściowo
K-8	rozpuszcza się częściowo	rozpuszcza się
K-9	rozpuszcza się	-
K-10	rozpuszcza się	-
HACC	rozpuszcza się	-

Sprawdzono również możliwość tworzenia koacerwatów poprzez utworzenie filmu z jednej pochodnej, a następnie natryśnięcie na wysuszony film drugiej pochodnej. Badania te wykonano w celu sprawdzenia możliwości tworzenia wielowarstwowych otoczek w procesie wieloetapowej koacerwacji. W tym celu na szalkę Petriego wylano 5 ml 1% wodnego roztworu CMC, włożono do suszarki (40°C/noc) w celu wysuszenia, a następnie na szalkę z uprzednio wysuszonym filmem wylano 5 ml 1% wodnego roztworu HACC. Zaobserwowano tworzenie się koacerwatu. Po wysuszeniu otrzymanego koacerwatu w suszarce (40°C/noc) otrzymano nierozpuszczalny w wodzie film. Możliwe jest zatem wykorzystanie powstałych koacerwatów do otoczkowania nawozów poprzez tworzenie wielowarstwowych otoczek w procesie wieloetapowej koacerwacji, w którym dodatkowe warstwy byłyby dodawane w kolejnych natryskach. Rozwiązanie to zostało przetestowane poprzez natryskiwanie roztworów pochodnych chitozanu na granulki nawozu (Salmag) – badania te zostały ujęte w części tajnej pracy doktorskiej.

6. Zastosowanie mieszanin głęboko eutektycznych jako plastyfikatorów do folii chitozanowych

W ostatnich latach poświęcono wiele uwagi badaniom mającym na celu zastąpienie tworzyw sztucznych na bazie surowców z ropy naftowej w opłacalny sposób materiałami biodegradowalnymi oferującymi konkurencyjne właściwości mechaniczne. Za najbardziej obiecujące materiały do tego celu zostały uznane biopolimery. Niestety, wykazują one na ogół słabe właściwości mechaniczne w zakresie przetwarzalności i zastosowania końcowego ze względu na twardość i kruchość. W celu przezwyciężenia tego problemu dodaje się plastyfikatory w celu zapewnienia niezbędnej elastyczności biopolimerów [105], [113]. W związku z tym zaproponowano procedurę wytwarzania folii chitozanowych z użyciem trzech mieszanin DES: chlorek choliny-glikol etylenowy, chlorek cynku-glikol etylenowy oraz chlorek choliny-mocznik.

Składniki wyżej wymienionych DES wykazują wiele korzystnych właściwości w zastosowaniach rolniczych [103], [106]. Chlorek choliny odgrywa ważną rolę w żywieniu zwierząt. 60% chlorek choliny jest znany jako witamina B4, która jest organicznym związkiem chemicznym wspomagającym prawidłowe funkcjonowanie wątroby oraz jest stosowana jako składnik pasz dla zwierząt. Chlorek choliny wspomaga układ odpornościowy zwierząt, znany jest również z tego, że zwiększa płodność, przyspiesza przyrost masy ciała oraz poprawia jakość jaj ściółkowych. Chlorek cynku znajduje zastosowanie jako mikronawóz (produkt wykorzystywany do nawożenia, który zawiera potrzebne roślinom mikroelementy), szczególnie przy nawożeniu kukurydzy – plonotwórcze działanie cynku, poprzez lepsze wykorzystanie azotu, przekłada się na zwiększenie długości kolb i ich uziarnienia. Z kolei mocznik najczęściej stosowany jest jako nawóz – mocznik ma najwyższą zawartość azotu

(ok. 46%) wśród innych nawozów. Jest bardzo uniwersalny, ponieważ można go stosować w uprawach zbóż, warzyw, kwiatów, drzew i krzewów owocowych czy trawników. Należy jednak zaznaczyć, że jest on mniej skuteczny na glebach bardzo kwaśnych, silnie zasadowych czy też świeżo zwapnowanych. Mocznik jest higroskopijny, ma również silne działanie antyseptyczne, złuszczone i regenerujące, dlatego jest też szeroko stosowany w kosmetyce. Mocznik jest stosowany jako dodatek do żywności (symbol E927b) – stosuje się go jako spoiwo w gumach do żucia i wypiekach, jest stosowany też jako środek brązujący (ds. w preclach). Ponadto mocznik znajduje się w paszach dla zwierząt, gdyż pomaga poprawić wchłanianie i trawienie paszy. Grupa Azoty Zakłady Azotowe Kędzierzyn S.A. jest jednym z największych producentów mocznika w Polsce.

Badania prowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej koncentrują się na opracowaniu biodegradowalnej otoczki na bazie chitozanu do nawozów azotowych na bazie azotan(V) amonu, która pozwoliłaby na kontrolowane uwalnianie substancji odżywczych z granul nawozu. W związku z tym w celu polepszenia właściwości mechanicznych folii/otoczek chitozanowych przygotowano trzy mieszaniny DES: chlorek choliny-glikol etylenowy (CC:GE) w stosunku molowym 1:2, chlorek cynku-glikol etylenowy (ZnCl₂:GE) w stosunku molowym 1:4 oraz chlorek choliny-mocznik (CC:U) w stosunku molowym 1:2. Tabela 21 przedstawia wybrane, zmierzone właściwości fizykochemiczne (lepkość i gęstość w 25°C) dla sporządzonych DES.

Tabela 21. Właściwości fizykochemiczne sporządzonych DES.

DES	lepkość w 25°C [mPa·s]	gęstość w 25°C [g/cm³]
CC:GE = 1:2	47	1,1171
ZnCl ₂ :GE = 1:4	478	1,4467
CC:U = 1:2	1280	1,2024

Dla DES na bazie CC i U odnotowano wysoką lepkość (1280 mPa·s w 25°C). Eutektyki zawierające glikol są mniej lepkie (lepkość DES na bazie CC i GE wynosi 47 mPa·s, lepkość DES na bazie ZnCl₂:GE wynosi 478 mPa·s, oba pomiary wykonano w 25°C).

Przygotowano 1,5% roztwory chitozanowe – odpowiednią ilość chitozanu rozpuszczono w 1% kwasie octowym. Badaniu poddano dwa chitozany: chitozan firmy Acros Organics (M_w: 90 293, na podstawie oznaczenia w GA ZAK), dla którego DD wynosił 95,6% oraz chitozan firmy Sigma (M_w: 128 187, na podstawie oznaczenia w GA ZAK), dla którego DD wynosił 83%. Folie chitozanowe przygotowane zostały przez rozpuszczenie chitozanu w kwasie octowym, wylaniu powstałych roztworów (2 ml) na szalki Petriego i wysuszeniu w suszarce. Otrzymane folie chitozanowe (bez dodatku DES) były twarde i kruche. Dodatek DES do roztworów chitozanowych zmienia sztywne, kruche folie chitozanowe w elastyczne, co potwierdza właściwości plastyfikujące DES (Tabela 22 i Tabela 23).

Tabela 22. Dodawanie DES do 1,5% r-ru chitozanu firmy Acros Organics (M_w : 90 293, $DD=95,6\%$).

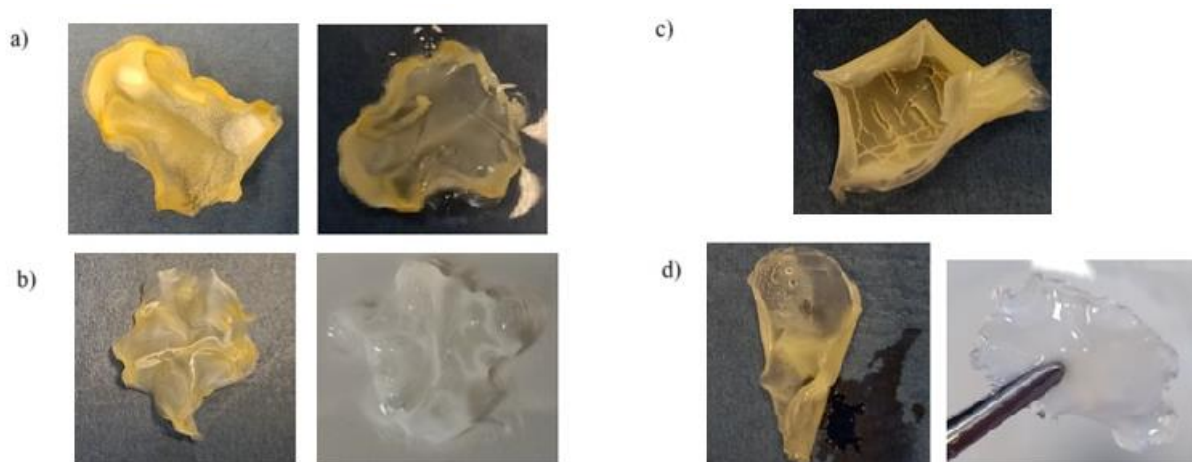
DES	% wagowy dodatku DES do roztworu chitozanu	wygląd folii po wysuszeniu w suszarce	rozpuszczalność folii w H_2O_{dest}
CC:GE = 1:2	1	twarda, krucha, nie poci się	nietrwała
	2	twarda, krucha, nie poci się	trwała
	3	półkrucha/półelastyczna, nie poci się	trwała
	4	elastyczna, poci się	trwała
	5	elastyczna, poci się	trwała
	10	elastyczna, poci się	trwała
ZnCl ₂ :GE = 1:4	1	twarda, krucha, nie poci się	nietrwała
	2	twarda, krucha, nie poci się	trwała po pierwszym zalaniu, po drugim zalaniu rozpuszcza się częściowo
	3	twarda, krucha, nie poci się	trwała
	4	twarda, krucha, nie poci się	trwała
	5	elastyczna, nie poci się	trwała
	10	elastyczna, nie poci się, popękana	trwała
CC:U = 1:2	2	elastyczna, poci się (nieznacznie)	trwała
	4	elastyczna, poci się	trwała

W przypadku roztworów chitozanowych uzyskanych przez rozpuszczenie odpowiedniej ilości chitozanu firmy Acros (M_w : 90 293, $DD = 95,6\%$) najlepsze folie otrzymano poprzez dodatek:

- 3% DES na bazie CC:GE=1:2 – otrzymane folie są półkruche/półelastyczne, nie pocią się i są trwałe po zanurzeniu w wodzie (Rysunek 27a). Dodatek 4% wyżej wymienionego DES powoduje, że folie są elastyczne, również trwałe po zanurzeniu w wodzie, ale za to pocią się.

- 5 % DES na bazie ZnCl₂:GE=1:4 – otrzymane folie są elastyczne, nie pocią się i są trwałe po zanurzeniu w wodzie (Rysunek 27b). Dodatek 10% DES powoduje, że folia jest elastyczna, nie pocią się, jest trwała po zanurzeniu w wodzie, ale widać liczne spękania na powierzchni tej folii (Rysunek 27c).

- zarówno dodatek 2% jak i 4% DES na bazie CC:U=1:2 powoduje, że folie są elastyczne, trwałe po zanurzeniu w wodzie, ale pocią się (Rysunek 27d).



Rysunek 27. Wybrane zdjęcia otrzymanych folii chitozanowych (chitozan firmy Acros Organics) z dodatkiem: a) 3% DES – CC:GE=1:2 (po lewej folia przed zanurzeniem w wodzie, po prawej folia po zanurzeniu w wodzie); b) 5% DES – ZnCl₂:GE=1:4 (po lewej folia przed zanurzeniem w wodzie, po prawej folia po zanurzeniu w wodzie); c) 10% DES – ZnCl₂:GE=1:4; d) 4% DES – CC:U=1:2 (po lewej folia przed zanurzeniem w wodzie, po prawej folia po zanurzeniu w wodzie).

Tabela 23. Dodawanie DES do 1,5% r-ru chitozanu firmy Sigma (M_w : 128 187, DD=83%).

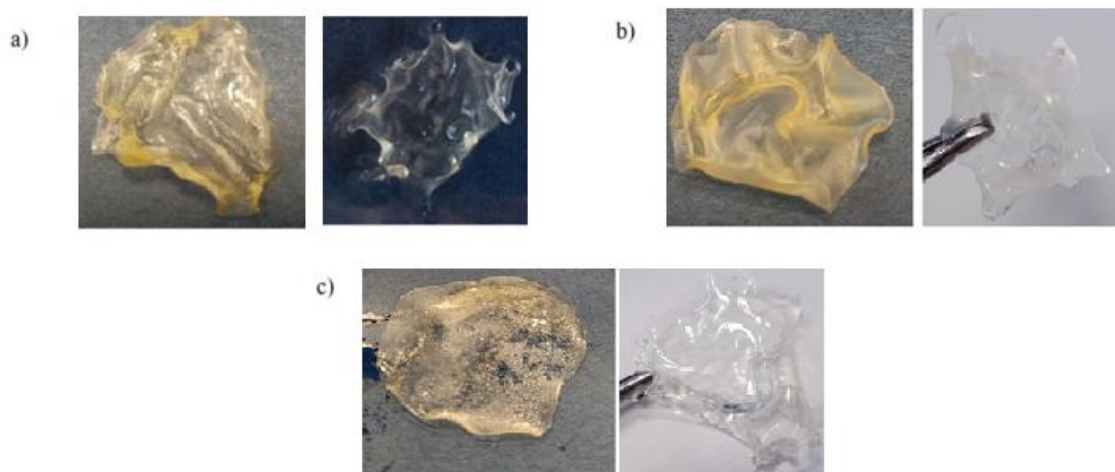
DES	% wagowy dodatku DES do roztworu chitozanu	wygląd folii po wysuszeniu w suszarce	rozpuszczalność folii w H ₂ O _{dest}
CC:GE = 1:2	1	elastyczna, nie poci się	nietrwała
	2	elastyczna, nie poci się	trwała
	3	elastyczna, nie poci się	trwała
	4	elastyczna, poci się	trwała
	5	elastyczna, poci się	trwała
	10	elastyczna, poci się	trwała
ZnCl ₂ :GE = 1:4	1	twarda, nie poci się	nietrwała
	2	twarda, nie poci się	trwała
	3	twarda, nie poci się	trwała
	4	twarda, nie poci się	trwała
	5	elastyczna, nie poci się	trwała
	10	elastyczna, nie poci się	trwała
CC:U = 1:2	2	elastyczna, poci się (nieznacznie)	trwała
	4	elastyczna, poci się	trwała

W przypadku roztworów chitozanowych uzyskanych przez rozpuszczenie odpowiedniej ilości chitozanu firmy Sigma (M_w : 128 187, DD = 83%) najlepsze folie otrzymano poprzez dodatek:

- 3% DES na bazie CC:GE=1:2 – otrzymane folie są elastyczne, nie pocią się i są trwałe po zanurzeniu w wodzie (Rysunek 28a). Dodatek 4% wyżej wymienionego DES powoduje, że folie są elastyczne, również trwałe po zanurzeniu w wodzie, ale za to pocią się.

- 5% i 10% DES na bazie $\text{ZnCl}_2:\text{GE}=1:4$ – otrzymane folie są elastyczne, nie pękają i są trwałe po zanurzeniu w wodzie (Rysunek 28b).

- zarówno dodatek 2% jak i 4% DES na bazie $\text{CC:U}=1:2$ powoduje, że folie są elastyczne, trwałe po zanurzeniu w wodzie, ale pękają (Rysunek 28c).



Rysunek 28. Wybrane zdjęcia otrzymanych folii chitozanych (chitozan firmy Sigma) z dodatkiem: a) 3% DES – $\text{CC:GE}=1:2$ (po lewej folia przed zanurzeniem w wodzie, po prawej folia po zanurzeniu w wodzie); b) 5% DES – $\text{ZnCl}_2:\text{GE}=1:4$ (po lewej folia przed zanurzeniem w wodzie, po prawej folia po zanurzeniu w wodzie); c) 4% DES – $\text{CC:U}=1:2$ (po lewej folia przed zanurzeniem w wodzie, po prawej folia po zanurzeniu w wodzie).

Folie uzyskane z chitozanu z firmy Sigma wydają się bardziej elastyczne niż folie uzyskane z chitozanu z firmy Acros, które wydają się mniej elastyczne niż te pierwsze. W związku z tym dla folii chitozanej firmy Sigma, która najlepiej rokowała, z dodatkiem 5% DES na bazie $\text{ZnCl}_2:\text{GE}$ (stosunek molowy 1:4) przeprowadzono badania właściwości mechanicznych folii. Właściwości mechaniczne folii oznaczono na maszynie wytrzymałościowej Zwick Roell, która znajduje się w Laboratorium Aplikacyjnym Plastyfikatorów, w Departamencie Rozwoju GA ZAK. Porównano parametry: wytrzymałość na rozciąganie oraz wydłużenie przy zerwaniu dla folii chitozanej bez dodatku oraz z dodatkiem DES. Otrzymane wyniki przedstawia Tabela 24. Wyniki przedstawiają wartości średnie uzyskane z 3 pomiarów. Dodatek 5% DES ($\text{ZnCl}_2:\text{GE}=1:4$) powoduje zmniejszenie wytrzymałości na rozciąganie i zwiększenie wydłużenia przy zerwaniu, co potwierdza dobre właściwości plastyfikujące DES. Zmniejszenie wytrzymałości na rozciąganie i zwiększenie wydłużenia przy zerwaniu uzyskano również w pracy [115] dla DES na bazie chlorku cholinylu i kwasu mlekowego.

Tabela 24. Badania właściwości mechanicznych folii chitozanowej firmy Sigma (M_w : 128 187) bez oraz z 5% dodatkiem DES na bazie $ZnCl_2$ i GE (stosunek molowy 1:4).

	folia chitozanowa bez dodatku DES	folia chitozanowa z 5% dodatkiem DES
wytrzymałość na rozciąganie [MPa]	30,3±1,4	13,0±0,2
wydłużenie przy zerwaniu [%]	13,9±2,7	25,0±7,3

Warunki procesu, właściwości chitozanu, rodzaj plastyfikatora i stężenie determinują funkcjonalność filmów chitozanowych – folie przygotowane bez użycia plastyfikatora wykazują słabsze właściwości mechaniczne/elastyczne niż folie przygotowane z dodatkiem DES jako plastyfikatora. Badania wykazały, że folie chitozanowe, początkowo kruche, stały się bardziej elastyczne po dodaniu DES. Dodatek DES poprawia jednorodność i elastyczność filmów chitozanowych. Efekt zależy od zawartości DES oraz od M_w chitozanu. Z przeprowadzonych obserwacji można wywnioskować, że lepiej sprawdza się chitozan o większej M_w (chitozan firmy Sigma) – folie chitozanowe są bardziej elastyczne niż dla roztworów chitozanowych powstałych poprzez użycie chitozanu o mniejszej M_w (chitozan firmy Acros). Wzrost M_w chitozanu powoduje wzrost lepkości jego roztworów i lepsze właściwości błonotwórcze, co jest zgodne z wynikami opublikowanymi w pracy [146]. W związku z tym, że najlepsze folie uzyskano z dodatkiem DES na bazie $ZnCl_2$:GE (możliwość dodatku nawet 10% DES do roztworu chitozanu i uzyskanie elastycznych folii, bez oznak pocenia się) w części tajnej pracy doktorskiej w głównym stopniu skupiono się właśnie na tych roztworach chitozanowych.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Część literaturowa rozprawy doktorskiej obejmuje przegląd doniesień publikacyjnych z zakresu CRF i SRF oraz biodegradowalnych polimerów stosowanych do otoczkowania nawozów. Omówiono zaproponowane w literaturze techniki powlekania nawozów oraz badania szybkości wymywania składników odżywczych z otoczkowanych nawozów. Następnie omówiono budowę, otrzymywanie, właściwości i zastosowanie chitozanu w rolnictwie. Zwrócono uwagę na jego dużą dostępność, gdyż jest komercyjnie produkowany z naturalnie regenerujących się zasobów, takich jak odpady muszli z owoców morza. Ponadto chitozan charakteryzuje się dobrą biodegradacją oraz korzystnymi właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi. Głównym czynnikiem ograniczającym wykorzystanie chitozanu jest jego słaba rozpuszczalność w wodzie. Wymieniono metody modyfikacji chitozanu prowadzące do zwiększenia rozpuszczalności. Omówiono literaturę dotyczącą potencjalnych możliwości wykorzystania hydrożeli chitozanowych w rolnictwie. Poruszono również temat mieszanin głęboko eutektycznych, które mogą być stosowane jako plastyfikatory folii chitozanowych. Przedstawiono klasyfikację mieszanin głęboko eutektycznych oraz metody ich przygotowania.

Część doświadczalna rozprawy doktorskiej została podzielona na dwie części: część jawną oraz część tajną. Część jawna pracy doktorskiej obejmowała realizację trzech etapów.

Pierwszy etap to ocena właściwości fizykochemicznych chitozanu. Stopień deacetylacji determinuje reaktywność i rozpuszczalność polimeru, a jego określenie jest jedną z rutynowych analiz przeprowadzanych w celu kontroli jakości chitozanów produkowanych przemysłowo. Do oznaczenia stopnia deacetylacji chitozanu potrzebne są tanie, proste, ale też solidne metody i procedury, które można zastosować w zakładzie. W ramach pracy doktorskiej przetestowano i porównano – na tych samych zestawach próbek chitozanu – techniki analityczne dostępne w Grupie Azoty Zakłady Azotowe Kędzierzyn S.A. Zastosowano w tym celu miareczkowanie potencjometryczne przy użyciu trzech różnych metod obliczeniowych, dwie różne metody spektroskopii UV-VIS oraz analizę elementarną. Wyniki porównano ze stopniem deacetylacji zadeklarowanym przez producentów w dostarczonych certyfikatach/świadectwach jakości. Dobra zgodność uzyskanych wyników za pomocą miareczkowania potencjometrycznego z deklaracją producenta sugeruje, że metoda ta może zostać wykorzystana jako prosta i dokładna metoda w zastosowaniach przemysłowych. Metoda określania stopnia deacetylacji przez miareczkowanie jest tania, oparta na łatwo dostępnych odczynnikach i aparaturze. Zastosowania chitozanu są nie tylko uzależnione od stopnia deacetylacji, ale także od masy molowej. W związku z tym oznaczono masy molowe chitozanu za pomocą chromatografii żelowej. Dwa z spośród trzech badanych chitozanów nie spełniały deklarowanych parametrów – oznaczone masy molowe były dużo niższe niż gwarantował to producent. Dotyczy to obu chitozanów firmy Acros. Jeden spośród trzech badanych chitozanów – chitozan firmy Sigma, mieścił się w deklarowanym przedziale mas podanym przez producenta. Jak widać, konieczne jest określenie masy molowej surowca chitozanowego, przed

przystąpieniem do dalszej pracy. Wykonano również badania rozpuszczalności chitozanu w trzech rozpuszczalnikach (kwasie octowym, kwasie mrówkowym oraz w kwasie mlekowym) oraz określono lepkości powstałych roztworów. Chitozan, dla którego zbadana masa molowa była najmniejsza miał najmniejszą lepkość dynamiczną, natomiast chitozan, dla którego zbadana masa molowa była największa miał największą lepkość dynamiczną spośród wszystkich trzech badanych próbek chitozanu.

W drugim etapie realizacji części jawnej pracy doktorskiej omówiono reakcje czwartorzędowania oraz karboksymetylowania chitozanu. Dokonano przeglądu literaturowego metod syntezy pochodnych chitozanu. Zsyntezowano dwie pochodne chitozanu, które są rozpuszczalne w wodzie: 2-hydroksypropylo-3-trimetyloamoniowy chlorek chitozanu (HACC) i karboksymetylochitozan (CMC) oraz dokonano ich charakteryzacji za pomocą FTIR, NMR. Dla HACC oznaczono stopień czwartorzędowania ($DQ = 98,29\%$ za pomocą 1H NMR, $DQ=100\%$ za pomocą miareczkowania konduktometrycznego – jako alternatywa dla 1H NMR) – otrzymano *N,O*-podstawioną pochodną, gdzie *N*-podstawienie wynosiło 83%, natomiast *O*-podstawienie 17%. Dla CMC oznaczono stopień podstawienia ($DS=108\%$ za pomocą 1H NMR), udział pochodnych mono-*O* do mono-*N* wynosi odpowiednio 0,76:0,32. Zsyntezowane pochodne wykorzystano następnie w przygotowaniu koacerwatów. Dla otrzymanych koacerwatów przeprowadzono badania chłonności wody – próbki wykazywały oczekiwane cechy hydrożelu fizycznego. Po wysuszeniu koacerwaty były ciałami stałymi, co umożliwia ich zastosowanie jako dodatki do komponowania nawozów stałych. Sprawdzone również możliwość otrzymywania filmów przez otrzymane koacerwaty – możliwe jest wykorzystanie powstałych koacerwatów do otoczkowania nawozów poprzez tworzenie wielowarstwowych otoczek w procesie wieloetapowej koacerwacji.

Trzeci etap realizacji części jawnej pracy doktorskiej to opracowanie metod otrzymywania folii chitozanowych z dodatkiem mieszanin głęboko eutektycznych oraz badania rozpuszczalności otrzymanych folii. W celu polepszenia właściwości folii chitozanowych przygotowano trzy mieszaniny głęboko eutektyczne: chlorek choliny-glikol etylenowy w stosunku molowym 1:2, chlorek cynku-glikol etylenowy w stosunku molowym 1:4 oraz chlorek choliny-mocznik w stosunku molowym 1:2. Badania przeprowadzono dla dwóch chitozanów, które różniły się od siebie parametrami (stopniem deacetylacji oraz masą cząsteczkową). Dla roztworów chitozanowych z dodatkiem DES, uzyskanych przez rozpuszczenie w 1% kwasie octowym chitozanu o wyższej masie molowej ($M_w: 128\ 187$), otrzymano bardziej elastyczne folie, w porównaniu do folii wytworzonych na bazie chitozanu o niższej masie molowej ($M_w: 90\ 293$). Wytypowano najlepsze zawartości wagowe DES w celu poprawienia jakości folii chitozanowych: 3% dodatku DES ($CC:GE=1:2$) oraz 5% dodatku DES ($ZnCl_2:GE=1:4$). W obu przypadkach otrzymano folie elastyczne, bez oznak pocenia. Dla folii chitozanowej z dodatkiem 5% DES na bazie $ZnCl_2:GE=1:4$ oznaczono właściwości mechaniczne. Dodatek 5% DES ($ZnCl_2:GE=1:4$) powodował zmniejszenie wytrzymałości na rozciąganie i zwiększenie wydłużenia przy zerwaniu, co potwierdziło dobre właściwości plastyfikujące DES.

Część tajna rozprawy doktorskiej, która została zamieszczona w osobnej części, obejmuje metody otoczkowania nawozu na bazie azotanu(V) amonu – Salmagu za pomocą zsyntezowanych pochodnych chitozanu oraz wytypowanych roztworów chitozanowych z dodatkiem mieszanin głęboko eutektycznych. Ponadto dokonano charakterystyki otoczkowanych nawozów na bazie azotanu(V) amonu oraz przeprowadzono badania szybkości wymywania składników odżywczych z otoczkowanych nawozów na bazie azotanu(V) amonu.

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

1. Aparatura oraz odczynniki

1.1. Aparatura pomiarowa i sprzęt pomocniczy

- laboratoryjny miernik pH i przewodności SevenDirect SD23 (Mettler Toledo)
- spektrofotometr dwuwiązkowy UV-VIS Evolution 220 (ThermoSCIENTIFIC)
- analizator CHN/CHNS EuroEA3000 (EuroVector)
- aparat GPC z detektorem refraktometrycznym (Agilent Technologies)
- suszarka laboratoryjna
- waga laboratoryjna z dokładnością pomiarów do 0,0001g
- lepkościomierz SVM 3001 z podajnikiem próbek XSample™630 i kontrolerem temperatury XSample™Heating Controller (Anton Paar)
- lepkościomierz VISCOLEAD PRO z przystawką do pomiaru lepkości małych objętości próbek (FungiLab)
- spektrofotometr FTIR Nicolet iS10 (ThermoSCIENTIFIC)
- spektrofotometr ¹H NMR (600 MHz, Varian)
- wirówka laboratoryjna PRO-HOSPITAL PCVS (Centurion Scientific)
- liofilizator Alpha 1-2 LDplus (Martin Christ)
- maszyna wytrzymałościowa (Zwick Roell)

1.2. Odczynniki

- chitozan, masa cząsteczkowa: 100 000-300 000 (Acros Organics)
- chitozan, masa cząsteczkowa: 600 000-800 000 (Acros Organics)
- chitozan, masa cząsteczkowa: 50 000-190 000 (Sigma Aldrich)
- roztwory buforowe (HAMILTON):
 - DuraCal Buffer 4,01
 - DuraCal Buffer 7,00
 - DuraCal Buffer 9,21
- wzorce przewodności (Mettler Toledo):
 - 1413 μ S/cm
 - 12,88 mS/cm
- kwas ortofosforowy(V), 85% (VWR Chemicals®)
- kwas octowy, 5% (Chempur)
- kwas mrówkowy, 85% (WARCHEM)
- kwas mlekowy, 85% (Acros Organics)

- chlorek glicydylotrimetyloamoniowy (GTMAC), techniczny, $\geq 90\%$ (Sigma Aldrich)
- alkohol izopropylowy, $\geq 99,7\%$ (VWR Chemicals)
- alkohol etylowy, 96% (POCH)
- kwas monochlorooctowy, cz.d.a. (Chempur)
- wodorotlenek sodu, cz.d.a. (Stanlab)
- kwas solny, 35-38% (Chempur)
- glikol etylenowy bezwodny, 99,8% (Sigma Aldrich)
- chlorek choliny, $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich)
- mocznik, $> 99\%$ (Sigma Aldrich)
- chlorek cynku bezwodny, cz.d.a. (Chempur)

2. Opis stosowanych procedur badawczych

2.1. Oznaczanie stopnia deacetylacji chitozanu

2.1.1. Miareczkowanie potencjometryczne

Odpowiednią ilość (ok. 0,2 g) uprzednio wysuszonego chitozanu (105°C, 3h) rozpuszczono w 20 cm³ 0,1M HCl i dodano 20 cm³ H₂O – mieszano przez 30 minut. Następnie dodano kolejne 25 cm³ H₂O i mieszano przez kolejne 30 minut. Zlewkę z przygotowanym, analizowanym roztworem, zawierającą mieszaśedłko magnetyczne, umieszczono na płycie mieszadła magnetycznego. W roztworze zanurzono ogniwo pomiarowe pH-metru. Nad zlewką zamocowano biuretę z roztworem miareczkującym (0,1M NaOH). Po uruchomieniu mieszadła dokonano pierwszego odczytu pH odpowiadającego początkowej objętości titranta $V_{\text{titranta}} = 0,0 \text{ cm}^3$. Następnie dodawano ściśle określone porcje titranta (0,5 cm³). Po każdej porcji titranta roztwór dobrze wymieszano, aż ustaliło się pH, które odczytywano na pH-metrze. Dla każdej próbki chitozanu pomiar wykonano 5 razy.

Stopień deacetylacji analizowanych chitozanów obliczono za pomocą wzorów [66], [122], [142]:

$$DD [\%] = 2,03 \cdot \frac{V_2 - V_1}{m + 0,0042(V_2 - V_1)} \quad \text{Wzór 1}$$

gdzie:

m – masa wysuszonej próbki chitozanu [g]

V_1, V_2 – objętości 0,1 M NaOH odpowiadające punktom przegięcia [cm³],

2,03 – współczynnik wynikający z masy cząsteczkowej jednostki monomeru chityny,

0,0042 – współczynnik wynikający z różnicy między masami cząsteczkowymi jednostek monomeru chityny i chitozanu.

$$DD [\%] = \frac{\Delta V \cdot C_{NaOH} \cdot 10^{-3} \cdot 16}{m \cdot 0,0994} \cdot 100\% \quad \text{Wzór 2}$$

gdzie:

ΔV – objętość zużycia NaOH odpowiednio między dwiema nagłymi zmianami pH [cm³],

C_{NaOH} – stężenie NaOH [mol/dm³],

m – masa wysuszonej próbki chitozanu [g].

$$DD [\%] = \frac{(C_1 V_1 - C_2 V_2) \cdot 0,016}{m} \cdot 100\% \quad \text{Wzór 3}$$

gdzie:

C_1 – stężenie HCl [mol/dm³],

C_2 – stężenie NaOH [mol/dm³],

V_1 – objętość HCl [cm³],

V_2 – objętość NaOH [cm³],

0,016 – masa cząsteczkowa NH₂ w 1 cm³ 0,1M HCl [g],

m – masa wysuszonej próbki chitozanu [g],

9,94 - teoretyczny procent NH₂.

2.1.2. Metody spektroskopii UV-VIS

Do pomiarów widm UV wzorców i próbek wykorzystano spektrofotometr UV-VIS ThermoSCIENTIFIC Evolution 220. Zakres skanowania: 230-190 nm, szerokość szczeliny 1 nm. Zastosowano kuwety o długości drogi optycznej 10 mm.

a) Metoda I

- Przygotowanie krzywej kalibracyjnej

Krzywą kalibracyjną wykonano wykreślając wartości pierwszej pochodnej przy 199 nm w funkcji stężenia GlcNAc. Standardowe roztwory GlcNAc przygotowano w 0,85% H₃PO₄ o stężeniach: 2,5; 10,2; 20,4; 30,6; 40,8; 51,0 μg/cm³. Jako ciecz odniesienia zastosowano 0,85% H₃PO₄.

- o Przygotowanie próbki

Chitozan osuszono (105°C, 3h) i przechowywano w eksykatorze w temperaturze pokojowej do czasu analizy. Do przygotowania próbki zastosowano procedurę 3-etapową. Odpowiednią ilość chitozanu (ok. 100 mg) ogrzewano w 85% H₃PO₄ (20 cm³) przez 40 minut w 60°C przy ciągłym mieszaniu. Po tym czasie, gdy próbka całkowicie się rozpuściła, pobrano 1 cm³ klarownego roztworu i rozcieńczono do 100 cm³ wodą dejonizowaną. Rozcieńczenie było konieczne do uzyskania stężenia chitozanu w zakresie wykrywalnym przez spektrofotometr. Rozcieńczony roztwór inkubowano w 60°C przez 2 godziny przed pomiarem UV. Następnie wykonano widma UV-VIS w zakresie 190-230 nm. Najlepszą regresję liniową uzyskano przy 199 nm – wartość pierwszej pochodnej przy 199 nm została wybrana do pomiarów stopnia deacetylacji w tym badaniu. Pomiar dla każdej próbki przeprowadzono 3-krotnie.

W celu obliczenia stopnia deacetylacji korzystano ze wzoru [125]:

$$DD [\%] = 100 - \frac{\frac{m_1}{203,21} \cdot 100}{\frac{m_1}{203,21} + \frac{m_2}{161,17}} \quad \text{Wzór 4}$$

gdzie:

m_1 – masa GlcNAc w 1 cm³ roztworu chitozanu, obliczona z krzywej kalibracyjnej [g],

m_2 – masa GlcN w 1 cm³ roztworu chitozanu [g]

$$m_2 = M - m_1$$

M – masa chitozanu w 1 cm³ roztworu [g], którą obliczono jako:

$$M = \frac{M_1 \cdot M_3}{M_1 + M_2}$$

M_1 – masa stałej próbki chitozanu pobranej do analizy [g],

M_2 – masa 85% H₃PO₄, użyta do rozpuszczenia próbki chitozanu [g],

M_3 – masa 1 ml roztworu chitozanowego w stężonym kwasie ortofosforowym(V) [g].

b) Metoda II

- o Przygotowanie krzywej kalibracyjnej

Przygotowano wodne roztwory zawierające różne proporcje GlcN i GlcNAc w 0,1 M HCl – symulacja próbek chitozanu o różnych DD: 49,45%, 58,01%, 68,92%, 71,78%, 77,88%, 83,03%, 90,13%, 93,20%, 98,99%. Zarejestrowano widma UV tych roztworów. Krzywą kalibracji generowano przez odniesienie stosunku absorbanca/stężenie całkowite do stopnia acetylacji (DA). Absorbancję mierzono przy 201 nm.

o Przygotowanie próbki

Osuszony chitozan (105°C, 3h) odważono (ok. 6-8 mg) i rozpuszczono w 50 cm³ 0,1 M HCl. Następnie wykonano widma UV-VIS w zakresie 190-230 nm. Pomiar dla każdej próbki wykonano 3-krotnie.

Stożenie deacetylacji obliczono za pomocą wzoru [126]:

$$DD [\%] = \left(1 - \frac{161,1 \cdot A \cdot V \cdot C \cdot m}{k \cdot m \cdot 42,1 \cdot A \cdot V} \right) \cdot 100\% \quad \text{Wzór 5}$$

gdzie:

161,1 – masa cząsteczkowa D-glukozaminy [g/mol]

42,1 – różnica między masą cząsteczkową N-acetylo-D-glukozaminy a masą cząsteczkową D-glukozaminy [g/mol]

A – absorbancja przy 201 nm

V – objętość roztworu [dm³]

m – masa wysuszonej próbki chitozanu [mg]

C – przecięcie z osi x na krzywej

k – nachylenie na krzywej.

2.1.3. Analiza elementarna

Analizę ilościową próbek na zawartość C i N wykonano za pomocą analizatora CHN/CHNS EuroEA3000 firmy EuroVector, który umożliwia automatyczne, jednoczesne oznaczenie procentowej zawartości węgla, wodoru, azotu i siarki w próbkach stałych. Zasada działania aparatu oparta jest o metodę dynamicznego spalania Dumasa, po której następuje separacja chromatograficzna frakcji gazowych będących wynikiem tego spalania (N₂, CO₂, H₂O, SO₂), a następnie ich analiza z wykorzystaniem katarometru. Pomiar dla każdej próbki powtarzano dwukrotnie.

Stożenie deacetylacji analizowanych chitozanów obliczono ze stosunku węgla/azot (C/N) za pomocą wzorów [126], [134]:

$$DD [\%] = \left(1 - \left(\frac{1}{2} \cdot \frac{14 \cdot C\%}{12 \cdot N\%} - 6 \right) \right) \cdot 100\% \quad \text{Wzór 6}$$

$$DD [\%] = \left(1 - \frac{\frac{C\%}{N\%} - 5,145}{6,816 - 5,145} \right) \cdot 100\% \quad \text{Wzór 7}$$

gdzie:

C% - zawartość procentowa węgla w próbce,

N% - zawartość procentowa azotu w próbce,

5,145 - stosunek C/N w całkowicie N-deacetylowanym chitozanie (jednostka powtarzalna $C_6H_{11}O_4N$),
6,816 - stosunek C/N w chitynie, całkowicie N-acetylowanym polimerze (jednostka powtarzalna $C_8H_{13}O_5N$).

2.2. Oznaczenie masy molowej chitozanu

Badania GPC przeprowadzono na aparacie firmy Agilent Technologies z detektorem RI (refraktometrycznym). Fazę ruchomą stanowił bufor octanowy (pH = 4,3). Przepływ fazy przez kolumnę wynosił 0,8 ml/min. Temperatura kolumn i detektora wynosiła 30°C. Wykorzystano 2 kolumny Agilent PL aquagel-OH MIXED-H, 300 mm, 8 um. Próbkę chitozanu rozpuszczano w buforze octanowym (fazie ruchomej), pozostawiano na noc, aby ułatwić rozpuszczenie. Aparat skalibrowano za pomocą wzorców PEO/PEG.

2.3. Badania rozpuszczalności chitozanu, określenie lepkości przygotowanych roztworów

Odpowiednią ilość chitozanu rozpuszczono w 20 cm³ 1% kwasu octowego w celu otrzymania stężeń roztworów: 0,010, 0,015, 0,020, 0,025, 0,030, 0,035, 0,040 g/cm³. Adekwatnie przygotowano roztwory o takich samych stężeniach w 1% kwasie mrówkowym oraz w 1% kwasie mlekowym. Ocenę rozpuszczalności przeprowadzono wizualnie. Pomiary lepkości przygotowanych roztworów przeprowadzono na aparacie FungiLab – VISCOLEAD PRO z przystawką do pomiaru małych objętości próbek. Temperaturę próbki (25°C) kontrolowano za pomocą termostatu.

2.4. Otrzymywanie pochodnych chitozanu

2.4.1. Otrzymywanie czwartorzędowej soli amoniowej chitozanu

10 g chitozanu firmy Sigma (M_w : 50 000 – 190 000) dyspergowano w 225 cm³ alkoholu izopropylowego przez 4 godziny w 60°C w kolbie trój szyjnej o pojemności 500 cm³, wyposażonej w mieszadło magnetyczne (400 rpm). Następnie 50 g chlorku 2,3-epoksypropylotrimetyloamoniowego (GTMAC) rozpuszczono w 75 cm³ H₂O_{dest} i wkroplono do roztworu. Zawartość kolby ogrzano do 80-85°C i mieszano przez 24 godziny pod chłodnicą zwrotną.

W celu oczyszczenia produktu wykorzystano dwie różne metody:

- I) Otrzymany produkt po zakończeniu reakcji odsączono. Odważono 0,0829 g osadu, który rozpuszczono w 5 cm³ H₂O_{dest} (C=16,58 mg/cm³). Następnie przygotowaną próbkę przeniesiono do worka dializacyjnego (Spectra/Por[®]2 Dialysis Membrane MWCO 12-14 kD).

Worek dializacyjny umieszczono w dużej zlewce z H₂O_{dest} (5 dm³) i codziennie, przez 3 dni wymieniano wodę. Następnie próbkę poddano liofilizacji w aparacie Christ Alpha 1-2 LDplus.

- II) Otrzymany produkt po zakończeniu reakcji odsączono na zestawie do sączenia próżniowego, przemyto 3 krotnie 100 cm³ alkoholu etylowego. Otrzymany osad wysuszono w suszarce w 40°C, a następnie umieszczono go w gilzie i przeprowadzono ekstrakcję Soxhleta (ekstrakcja trwała 24 godziny), przy użyciu alkoholu etylowego. Po zakończeniu ekstrakcji osad wysuszono w suszarce w 40°C.

W celu potwierdzenia podstawienia grup aminowych w chitozanie wykonano analizę ¹H NMR oraz przeprowadzono miareczkowanie potencjometryczne. Potwierdzono również strukturę chitozanowej pochodnej za pomocą FTIR. W celu określenia stopnia czwartorzędowania (DQ) zastosowano miareczkowanie konduktometryczne oraz analizę ¹H NMR.

a) analiza ¹H NMR

20 mg próbki rozpuszczono w 991 μl D₂O oraz 16,1 μl DCl i poddano analizie NMR.

Za pomocą ¹H NMR oznaczono DD chitozanu, który poddano czwartorzędowaniu:

$$DD [\%] = \frac{I_{H-2 (GlcN)}}{I_{H-2 (GlcN)} + \frac{1}{3} \cdot I_{CH_3 (GlcNAc)}} \cdot 100 \quad \text{Wzór 8}$$

gdzie:

$I_{H-2 (GlcN)}$ – intensywność sygnału protonu H-2 z GlcN

$I_{CH_3 (GlcNAc)}$ – intensywność sygnałów protonów H (-COCH₃) z grupy GlcNAc

Za pomocą ¹H NMR oznaczono również DQ otrzymanej pochodnej:

$$DQ[\%] = \frac{\frac{I_{N^+(CH_3)_3} - I_{H-2 (GlcN)}}{9}}{\frac{1}{3} \cdot I_{CH_3 (GlcNAc)} + I_{H-2 (GlcN)}} \cdot 100 \quad \text{Wzór 9}$$

gdzie:

$I_{H-2 (GlcN)}$ – intensywność sygnału protonu H-2 z GlcN, którą obliczono jako:

$$I_{H-2 (GlcN)} = \frac{\frac{1}{3} \cdot I_{CH_3 (GlcNAc)} \cdot DD \cdot 0,01}{1 - DD \cdot 0,01}$$

$I_{CH_3 (GlcNAc)}$ – intensywność sygnałów protonów H (-COCH₃) z grupy GlcNAc

b) miareczkowanie potencjometryczne

0,2 g oczyszczonej próbki rozpuszczono w 40 cm³ H₂O_{dest.} Po całkowitym rozpuszczeniu próbki zmierzono jej pH. Za pomocą 0,1M HCl doprowadzono pH roztworu do wartości 2. Następnie roztwór miareczkowano 0,1M NaOH i mierzono pH roztworu po każdej dodanej porcji NaOH (0,5 cm³).

c) analiza FTIR

Pomiar wykonano metodą pastylki KBr – próbkę utarto w moździerzu z KBr, a następnie za pomocą prasy i pastylkarki wykonano z tej mieszaniny płaską pastylkę. Parametry pomiaru: zakres 400-4000 cm⁻¹, rozdzielczość 4 cm⁻¹, ilość skanów 64.

d) miareczkowanie konduktometryczne

0,1g oczyszczonej próbki rozpuszczono w 100 cm³ H₂O_{dest.} Przygotowany roztwór miareczkowano za pomocą 0,017 M AgNO₃ i mierzono przewodność roztworu po każdej dodanej porcji AgNO₃ (0,5 cm³).

Stopień czwartorzędowania (DQ) obliczono za pomocą wzoru [153], [160]:

$$DQ[\%] = \frac{1,7 \cdot 10^{-5} \cdot V_{AgNO_3}}{\left(\frac{W_w - (1,7 \cdot 10^{-5} \cdot V_{AgNO_3} \cdot m_{GTMAC})}{(m_G \cdot DD) + m_{AG}(1 - DD)} \right) \cdot DD} \cdot 100 \quad \text{Wzór 10}$$

gdzie:

W_w – naważka próbki

1,7·10⁻⁵ – liczba moli AgNO₃ w 1 cm³ roztworu

V_{AgNO₃} – objętość AgNO₃ przy najniższej przewodności dla roztworu

m_{GTMAC} – masa cząsteczkowa GTMAC (151 g/mol)

m_G – masa cząsteczkowa glukozaminy (161 g/mol)

m_{AG} – masa cząsteczkowa acetylowanej glukozaminy (203 g/mol)

DD – stopień deacetylacji chitozanu

2.4.2. Otrzymywanie soli sodowej karboksymetylochitozanu

10 g chitozanu firmy Sigma (M_w: 50 000 – 190 000) oraz 13,5 g NaOH umieszczono w kolbie trój szyjnej o pojemności 250 cm³, wyposażonej w mieszadło magnetyczne. Dodano 100 cm³ rozpuszczalnika (20 cm³ H₂O_{dest.} i 80 cm³ alkoholu izopropylowego). Kolbę umieszczono w czaszy grzejnej, podłączono chłodnicę zwrotną i termometr. Utrzymywano grzanie (60°C) i mieszanie (400 rpm) przez 2 godziny w celu spęcznienia i alkalizacji. Następnie 15 g kwasu monochlorooctowego rozpuszczono w 20 cm³ alkoholu izopropylowego. Przygotowany roztwór kwasu wkraplano do kolby przez pół godziny. Na czas dodawania kwasu wyłączono grzanie, ponieważ temperatura zawartości

kolby podczas wkraplania kwasu wzrastała – po zakończeniu wkraplania i ustabilizowaniu temperatury włączono grzanie. Roztwór mieszano w 60°C przez kolejne 4 godziny. Po zakończeniu syntezy do roztworu dodano 200 cm³ 70% alkoholu etylowego. Powstały osad odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemyto 100 cm³ 80% alkoholu etylowego, odsączono. Następnie osad przemyto 100 cm³ 90% alkoholu etylowego, odsączono. Otrzymany osad suszono przez 24 godziny w 40°C.

W celu potwierdzenia powstania pochodnej chitozanu wykonano analizę NMR. Potwierdzono również strukturę chitozanowej pochodnej za pomocą FTIR.

a) analiza ¹H NMR oraz analiza ¹³C NMR

20 mg próbki rozpuszczono w 991 μl D₂O oraz 16,1 μl DCl i poddano analizie NMR.

Analiza ¹H NMR posłużyła również do oznaczenia stopnia podstawienia (DS).

DS dla *N,O*-CMC obliczono za pomocą wzorów [165]:

$$DS_{N,O-CMC}[\%] = \frac{I_{CH_2} \cdot 0,5}{I_2 + I_3} \cdot 100 \quad \text{Wzór 11}$$

gdzie:

I_2 – intensywność sygnału protonu H-2''

I_3 – intensywność sygnałów protonów H-2 i H-2'

I_{CH_2} – intensywność sygnałów protonów metylenowych w karboksymetylowych grupach, obliczona jako:

$$I_{CH_2} = I_1 - [(I_2 + I_3) \cdot 5]$$

I_1 – intensywność sygnałów protonów H-3, H-4, H-5, H-6a,b.

Stopień podstawienia grupy N-karboksylowej obliczono za pomocą wzoru:

$$DS_{N-CMC}[\%] = \frac{I_2}{I_2 + I_3} \cdot 100 \quad \text{Wzór 12}$$

Różnica między $DS_{N,O-CMC}$ i DS_{N-CMC} odpowiada podstawieniu w pozycji *O*-.

b) analiza FTIR

Pomiar wykonano metodą pastylki KBr – próbkę utarto w moździerzu z KBr, a następnie za pomocą prasy i pastylkarki wykonano z tej mieszaniny płaską pastylkę. Parametry pomiaru: zakres 400-4000 cm⁻¹, rozdzielczość 4 cm⁻¹, ilość skanów 64.

2.5. Otrzymywanie koacerwatów

Przygotowano 1% wodne roztwory HACC i CMC, otrzymane w pkt. 2.4.1 i 2.4.2. Mieszaniny HACC i CMC otrzymano przez zmieszanie przygotowanych 1% roztworów wodnych o odpowiednim udziale objętościowym (Tabela 25). Dla każdej mieszaniny zmierzono pH. Zmętnienie roztworu mierzono spektrofotometrycznie poprzez pomiar absorbancji przy $\lambda = 600$ nm. Następnie wytrącone kompleksy polielektrolitowe odwirowano na wirówce laboratoryjnej (6000 rpm, 40 minut), oddzielono od supernatantu, zważono.

Dla odwirowanych koacerwatów wykonano badania oznaczania chłonności wody (Q). Oznaczanie chłonności wody przeprowadzono grawimetrycznie, wprowadzając to zlewki o pojemności 100 ml odważkę badanej, wysuszonej próbki (ok. 0,5 g) oraz 50 g H₂O_{dest.} Zawartość zlewki zabezpieczono parafilmem i pozostawiono na 24 godziny. Po wyjęciu spęcznionej próbki z wody, nadmiar wody usunięto za pomocą papierowego ręcznika, a próbkę zważono. Masę pochłoniętej wody w przeliczeniu na 1 g badanej próbki obliczono ze wzoru:

$$Q [\%] = \frac{m_w - m_d}{m_d} \cdot 100 \quad \text{Wzór 12}$$

gdzie:

Q – chłonność wody [%]

m_w – masa mokrej próbki/spęcznionej próbki [g],

m_d – masa suchej próbki [g].

Tabela 25. Skład mieszanin CMC:HACC.

Nazwa próbki	Objętość 1% CMC [cm ³]	Objętość 1% HACC* [cm ³]
K-1	18	2
K-2	16	4
K-3	14	6
K-4	12	8
K-5	11	9
K-6	10	10
K-7	8	12
K-8	6	14
K-9	4	16
K-10	2	18

* HACC po oczyszczaniu metodą II (ekstrakcja Soxhleta)

Przeprowadzono również badania możliwości tworzenia filmów przez koacerwaty CMC i HACC. W tym celu przygotowano w probówkach typu Eppendorf o pojemności 2 cm³ mieszaniny koacerwatów K1-K10 (stosunki objętościowe CMC:HACC – Tabela 25), a następnie wylewano roztwory mieszanin na szalki Petriego, po czym umieszczono je w suszarce (40°C/noc) w celu odparowania wody. Po odparowaniu wody otrzymano stabilne, cienkie filmy. Sprawdzone rozpuszczalność otrzymanych filmów w wodzie. W tym celu przygotowane filmy umieszczano w zlewce o pojemności 50 cm³, a następnie wlewano do niej 10 cm³ H₂O_{dest.} Zawartość zlewki zabezpieczono parafilmem i pozostawiono do obserwacji na 7 dni.

2.6. Otrzymywanie mieszanin głęboko eutektycznych, modyfikacja roztworów chitozanowych za pomocą mieszanin głęboko eutektycznych

Przygotowanie mieszaniny głęboko eutektycznej na bazie chlorku choliny i glikolu etylenowego

Do zlewki o pojemności 500 cm³ odważono 139,62 g CC (osuszonego uprzednio w suszarce w temperaturze 70°C/24h) oraz 124,14 g GE, uzyskując stosunek molowy składników CC:GE=1:2. Intensywnie mieszano zawartość zlewki i ogrzewano w łaźni olejowej w temperaturze 90°C, aż do uzyskania jednorodnej cieczy. Otrzymaną mieszaninę eutektyczną schłodzono następnie do temperatury pokojowej i używano bez dalszego oczyszczania. Dla otrzymanej mieszaniny zmierzono lepkość oraz gęstość w temperaturze 25°C.

Przygotowanie mieszaniny głęboko eutektycznej na bazie chlorku cynku i glikolu etylenowego

Do zlewki o pojemności 500 cm³ odważono 136,29 g ZnCl₂ oraz 248,28 g GE, uzyskując stosunek molowy składników ZnCl₂:GE=1:4. Intensywnie mieszano zawartość zlewki i ogrzewano w łaźni olejowej w temperaturze 90°C, aż do uzyskania jednorodnej cieczy. Otrzymaną mieszaninę eutektyczną schłodzono następnie do temperatury pokojowej i używano bez dalszego oczyszczania. Dla otrzymanej mieszaniny zmierzono lepkość oraz gęstość w temperaturze 25°C.

Przygotowanie mieszaniny głęboko eutektycznej na bazie chlorku choliny i mocznika

Do zlewki o pojemności 500 cm³ odważono 139,62 g CC oraz 120,12 g U, uzyskując stosunek molowy składników CC:U=1:2. Intensywnie mieszano zawartość zlewki i ogrzewano w łaźni olejowej w temperaturze 90°C, aż do uzyskania jednorodnej cieczy. Otrzymaną mieszaninę eutektyczną schłodzono następnie do temperatury pokojowej i używano bez dalszego oczyszczania. Dla otrzymanej mieszaniny zmierzono lepkość oraz gęstość w temperaturze 25°C.

Modyfikacja roztworów chitozanowych za pomocą mieszanin głęboko eutektycznych

a) Przygotowanie roztworów chitozanowych o stężeniu 1,5%

- 1,5% roztwór chitozanu firmy Sigma (M_w : 50 000 – 190 000 wg deklaracji producenta, oznaczona M_w : 128 187) – do zlewki o pojemności 2000 cm³ wsypano 15 g chitozanu i dodano 1000 cm³ 1% (v/v) roztworu kwasu octowego. Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 24 h za pomocą mieszadła mechanicznego.

- 1,5% roztwór chitozanu firmy Acros (M_w : 600 000 – 800 000 wg deklaracji producenta, oznaczona M_w : 90 293) – do zlewki o pojemności 2000 cm³ wsypano 15 g chitozanu i dodano 1000 cm³ 1% (v/v) roztworu kwasu octowego. Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 24 h za pomocą mieszadła mechanicznego.

W celu otrzymania folii pobrano 2 cm³ każdego z roztworu, wylano na szalki i włożono do suszarki (40°C/noc). Następnego dnia wyjęto wysuszone folie z suszarki, obserwowano ich wygląd. Wykonano próby rozpuszczalności w wodzie – folie zalano 25 cm³ H₂O_{dest}, obserwowano ich wygląd.

b) Przygotowanie roztworów chitozanowych o stężeniu 1,5% z dodatkiem DES

Do przygotowanych 1,5% roztworów chitozanowych dodano przygotowany DES w ilości 1, 2, 3, 4, 5 i 10% wag. (dla CC:GE=1:2 oraz dla ZnCl₂:GE=1:4) oraz 2 i 4% wag. (dla CC:U=1:2) Roztwory mieszano na mieszadle magnetycznym do uzyskania jednorodnych cieczy, następnie pobierano po 2 cm³ wymieszanego roztworu, wylewano na szalkę i wkładano do suszarki (40°C/noc). Następnego dnia wyjmowano wysuszone folie z suszarki, obserwowano ich wygląd. Wykonano próby rozpuszczalności w wodzie – folie zalano 25 cm³ H₂O_{dest}, obserwowano ich wygląd. Po całkowitym odparowaniu wody kolejny raz folie/pozostałości folii zalano 25 cm³ H₂O_{dest}.

c) Badanie właściwości mechanicznych folii chitozanowych przed i po modyfikacji za pomocą DES

Właściwości mechaniczne folii reprezentowane przez wytrzymałość na rozciąganie i wydłużenie przy zerwaniu oznaczono na maszynie wytrzymałościowej Zwick Roell wyposażonej w odpowiednie uchwyty do prób rozciągania w oparciu o normę PN-EN ISO 527-3:2019-01. Folie były poddawane siłom rozciągania przy prędkości badania 50 mm/min, odległość uchwytów przy pozycji startowej: 57,76 mm. Badania zostały wykonane w Departamencie Rozwoju Grupy Azoty Kędzierzyn, w Laboratorium Aplikacyjnym Plastyfikatorów (IC-3).

SPIS RYSUNKÓW ORAZ TABEL

Spis rysunków

Rysunek 1. Schemat ideowy otrzymywania chityny i chitozanu.

Rysunek 2. Struktura (a) chityny i (b) chitozanu.

Rysunek 3. Podział patentów na lata, na podstawie bazy patentów Espacenet pod hasłem 'otoczki chitozanowe' oraz 'otoczki chitozanowe i nawozy' [72].

Rysunek 4. Wymagania dla idealnego hydrożelu do stosowania w przemyśle rolniczym.

Rysunek 5. Klasyfikacja mieszanin głęboko eutektycznych.

Rysunek 6. Związki zawierające akceptory wiązań wodorowych (HBA) - przykłady.

Rysunek 7. Związki zawierające donory wiązań wodorowych (HBD) - przykłady.

Rysunek 8. a) Przykładowa krzywa miareczkowania dla próbki chitozanu nr 1; b) Wyznaczenie punktów V_1 oraz V_2 metodą pierwszej pochodnej dla próbki chitozanu nr 1.

Rysunek 9. Wykres zależności pierwszej pochodnej przy 199 nm wobec stężenia GlcNAc.

Rysunek 10. Krzywa zależności stosunku A/C od DA (201 nm).

Rysunek 11. N,N,N-trimetylochitozan.

Rysunek 12. Czwartorzędowe pochodne chitozanu a) *N*-podstawiona i b) *N,O*-podstawiona.

Rysunek 13. Schemat reakcji otrzymywania 2-hydroksypropylo-3-trimetyloamoniowego chlorku chitozanu (HACC).

Rysunek 14. Widmo FTIR chitozanu (kolor niebieski) i 2-hydroksypropylo-3-trimetyloamoniowy chlorek chitozanu (HACC) (kolor zielony).

Rysunek 15. Fragment widma ^1H NMR w D_2O chitozanu (chitozan firmy Sigma, M_w : 50 000 – 190 000).

Rysunek 16. Fragment widma ^1H NMR w D_2O dla 2-hydroksypropylo-3-trimetyloamoniowego chlorku chitozanu (HACC) po oczyszczeniu przez dializę.

Rysunek 17. Fragmenty widm ^1H NMR w D_2O dla 2-hydroksypropylo-3-trimetyloamoniowego chlorku chitozanu (HACC): a) produkt oczyszczony przez dializę, b) produkt oczyszczony w aparacie Soxhleta, c) surowy produkt.

Rysunek 18. a) Krzywa miareczkowania dla próbki HACC, b) Wyznaczenie punktu przegięcia metodą pierwszej pochodnej.

Rysunek 19. Krzywa miareczkowania konduktometrycznego dla otrzymanej pochodnej HACC w celu wyznaczenia jej DQ.

Rysunek 20. a) *O*-karboksymetylochitozan (*O*-CMC), b) *N*-karboksymetylochitozan (*N*-CMC), c) *N,O*-karboksymetylochitozan (*N,O*-CMC), d) *N,N*-karboksymetylochitozan (*N,N*-CMC).

Rysunek 21. Widmo FTIR chitozanu (kolor niebieski) i karboksymetylochitozanu (CMC) (kolor czerwony).

Rysunek 22. Fragment widma ¹H NMR w D₂O dla karboksymetylochitozanu (CMC).

Rysunek 23. Widmo ¹³C NMR w D₂O dla karboksymetylochitozanu (CMC).

Rysunek 24. Schemat koacerwacji kompleksowej.

Rysunek 25. Utworzone koacerwaty dla mieszanin karboksymetylochitozanu (CMC) i 2-hydroksypropylo-3-trimetylamoniowego chlorku chitozanu (HACC).

Rysunek 26. Badania rozpuszczalności otrzymanych folii w wodzie: a) folie przed umieszczeniem w wodzie, b) folie po zanurzeniu w wodzie (po 7 dniach).

Rysunek 27. Wybrane zdjęcia otrzymanych folii chitozanowych (chitozan firmy Acros Organics) z dodatkiem: a) 3% DES – CC:GE=1:2 (po lewej folia przed zanurzeniem w wodzie, po prawej folia po zanurzeniu w wodzie); b) 5% DES – ZnCl₂:GE=1:4 (po lewej folia przed zanurzeniem w wodzie, po prawej folia po zanurzeniu w wodzie); c) 10% DES – ZnCl₂:GE=1:4; d) 4% DES – CC:U=1:2 (po lewej folia przed zanurzeniem w wodzie, po prawej folia po zanurzeniu w wodzie).

Rysunek 28. Wybrane zdjęcia otrzymanych folii chitozanowych (chitozan firmy Sigma) z dodatkiem: a) 3% DES – CC:GE=1:2 (po lewej folia przed zanurzeniem w wodzie, po prawej folia po zanurzeniu w wodzie); b) 5% DES – ZnCl₂:GE=1:4 (po lewej folia przed zanurzeniem w wodzie, po prawej folia po zanurzeniu w wodzie); c) 4% DES – CC:U=1:2 (po lewej folia przed zanurzeniem w wodzie, po prawej folia po zanurzeniu w wodzie).

Spis tabel

Tabela 1. Zalety i wady polimerów biodegradowalnych stosowanych do otoczkowania nawozów.

Tabela 2. Podsumowanie technik powlekania nawozów.

Tabela 3. Badanie szybkości uwalniania składników odżywczych z otoczkowanych nawozów.

Tabela 4. Sposoby modyfikacji chitozanu.

Tabela 5. Hydrożele na bazie chitozanu do zastosowań rolniczych (lata 2010-2020) – Superchłonne polimery na bazie kwasu akrylowego/akrylamidu zawierające chitozan [89].

Tabela 6. Hydrożele na bazie chitozanu do zastosowań rolniczych (lata 2010-2020) – Hydrożele na bazie chitozanu wytwarzane przez sieciowanie chemiczne [89].

Tabela 7. Hydrożele na bazie chitozanu do zastosowań rolniczych (lata 2010-2020) – Hydrożele na bazie chitozanu wytwarzane przez sieciowanie fizyczne [89].

Tabela 8. Najpopularniejsze układy HBA-HBD stosowane do wytwarzania DES.

Tabela 9. DD chitozanu uzyskane za pomocą miareczkowania potencjometrycznego.

Tabela 10. Wyznaczenie DD chitozanu za pomocą spektroskopii UV-VIS – metoda I.

Tabela 11. Wyznaczenie DD chitozanu za pomocą spektroskopii UV-VIS – metoda II.

Tabela 12. Zawartość badanych pierwiastków w próbkach oraz obliczony DD chitozanu.

Tabela 13. Porównanie DD chitozanu oznaczonego różnymi metodami.

Tabela 14. Wyniki GPC dla próbek chitozanu.

Tabela 15. Sprawdzenie rozpuszczalności chitozanu w wytypowanych rozpuszczalnikach, określenie lepkości przygotowanych roztworów.

Tabela 16. Metody otrzymywania czwartorzędowych pochodnych chitozanu w wyniku reakcji z GTMAC.

Tabela 17. Metody otrzymywania karboksymetylochitozanu za pomocą kwasu monochlorooctowego.

Tabela 18. Koacerwaty HACC i CMC – skład mieszanin oraz charakterystyka.

Tabela 19. Badania chłonności wody [Q] dla wybranych próbek koacerwatów.

Tabela 20. Rozpuszczalność filmów utworzonych w wyniku koacerwacji CMC i HACC.

Tabela 21. Właściwości fizykochemiczne sporządzonych DES.

Tabela 22. Dodawanie DES do 1,5% r-ru chitozanu firmy Acros Organics (M_w : 90 293, DD=95,6%).

Tabela 23. Dodawanie DES do 1,5% r-ru chitozanu firmy Sigma (M_w : 128 187, DD=83%).

Tabela 24. Badania właściwości mechanicznych folii chitozanowej firmy Sigma (M_w : 128 187) bez oraz z 5% dodatkiem DES na bazie $ZnCl_2$ i GE (stosunek molowy 1:4).

LITERATURA

- [1] J. Chen, S. Lü, Z. Zhang, X. Zhao, X. Li, P. Ning, M. Liu, Environmentally friendly fertilizers: A review of materials used and their effects on the environment, *Science of the Total Environment*. 613–614 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.186>.
- [2] D. Tilman, Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96 (1999). <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.5995>.
- [3] P.A. Matson, R. Naylor, I. Ortiz-Monasterio, Integration of environmental, agronomic, and economic aspects of fertilizer management, *Science* (1979). 280 (1998). <https://doi.org/10.1126/science.280.5360.112>.
- [4] M.E. Abd El-Aziz, D.M. Salama, S.M.M. Morsi, A.M. Youssef, M. El-Sakhawy, Development of polymer composites and encapsulation technology for slow-release fertilizers, *Reviews in Chemical Engineering*. 38 (2022). <https://doi.org/10.1515/revce-2020-0044>.
- [5] J. Fu, C. Wang, X. Chen, Z. Huang, D. Chen, Classification research and types of slow controlled release fertilizers (SRFs) used - a review, *Commun Soil Sci Plant Anal*. 49 (2018). <https://doi.org/10.1080/00103624.2018.1499757>.
- [6] S. Fertahi, M. Ilsouk, Y. Zeroual, A. Oukarroum, A. Barakat, Recent trends in organic coating based on biopolymers and biomass for controlled and slow release fertilizers, *Journal of Controlled Release*. 330 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.12.026>.
- [7] D. Lawrencina, S.K. Wong, D.Y.S. Low, B.H. Goh, J.K. Goh, U.R. Ruktanonchai, A. Sootitiantawat, L.H. Lee, S.Y. Tang, Controlled release fertilizers: A review on coating materials and mechanism of release, *Plants*. 10 (2021). <https://doi.org/10.3390/plants10020238>.
- [8] A. Jarosiewicz, M. Tomaszewska, Controlled-release NPK fertilizer encapsulated by polymeric membranes, *J Agric Food Chem*. 51 (2003). <https://doi.org/10.1021/jf020800o>.
- [9] B. Azeem, K. Kushaari, Z.B. Man, A. Basit, T.H. Thanh, Review on materials & methods to produce controlled release coated urea fertilizer, *Journal of Controlled Release*. 181 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.02.020>.
- [10] M.E. Trenkel, Impr. Point 44), Slow- and controlled-release and stabilized fertilizers : an option for enhancing nutrient use efficiency in agriculture, IFA, International fertilizer industry Association, 2010.
- [11] Z. Majeed, N.K. Ramli, N. Mansor, Z. Man, A comprehensive review on biodegradable polymers and their blends used in controlled-release fertilizer processes, *Reviews in Chemical Engineering*. 31 (2015). <https://doi.org/10.1515/revce-2014-0021>.
- [12] E.V.R. Campos, J.L. de Oliveira, L.F. Fraceto, B. Singh, Polysaccharides as safer release systems for agrochemicals, *Agron Sustain Dev*. 35 (2015). <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0263-0>.
- [13] J.J. Perez, N.J. Francois, Chitosan-starch beads prepared by ionotropic gelation as potential matrices for controlled release of fertilizers, *Carbohydr Polym*. 148 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.054>.
- [14] R.C. Sabadini, V.C.A. Martins, A. Pawlicka, Synthesis and characterization of gellan gum: chitosan biohydrogels for soil humidity control and fertilizer release, *Cellulose*. 22 (2015). <https://doi.org/10.1007/s10570-015-0590-6>.

- [15] B.R. dos Santos, F.B. Bacalhau, T.D.S. Pereira, C.F. Souza, R. Faez, Chitosan-montmorillonite microspheres: A sustainable fertilizer delivery system, *Carbohydr Polym.* 127 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.064>.
- [16] A. Rattanamane, H. Niamsup, L. Ongnuan Srisombat, W. Punyodom, R. Watanesk, S. Watanesk, Role of Chitosan on Some Physical Properties and the Urea Controlled Release of the Silk Fibroin/Gelatin Hydrogel, *J Polym Environ.* 23 (2015). <https://doi.org/10.1007/s10924-014-0703-6>.
- [17] S. Lü, C. Gao, X. Wang, X. Xu, X. Bai, N. Gao, C. Feng, Y. Wei, L. Wu, M. Liu, Synthesis of a starch derivative and its application in fertilizer for slow nutrient release and water-holding, *RSC Adv.* 4 (2014). <https://doi.org/10.1039/c4ra06006g>.
- [18] J. Ma, X. Li, Y. Bao, Advances in cellulose-based superabsorbent hydrogels, *RSC Adv.* 5 (2015). <https://doi.org/10.1039/c5ra08522e>.
- [19] D.W. Davidson, M.S. Verma, F.X. Gu, Controlled root targeted delivery of fertilizer using an ionically crosslinked carboxymethyl cellulose hydrogel matrix, *Springerplus.* 2 (2013). <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-318>.
- [20] M. Fernández-Pérez, F.J. Garrido-Herrera, E. González-Pradas, M. Villafranca-Sánchez, F. Flores-Céspedes, Lignin and ethylcellulose as polymers in controlled release formulations of urea, *J Appl Polym Sci.* 108 (2008). <https://doi.org/10.1002/app.27987>.
- [21] C.E. Elhassani, Y. Essamlali, M. Aqlil, A.M. Nzenguet, I. Ganetri, M. Zahouily, Urea-impregnated HAP encapsulated by lignocellulosic biomass-extruded composites: A novel slow-release fertilizer, *Environ Technol Innov.* 15 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100403>.
- [22] W.J. Mulder, R.J.A. Gosselink, M.H. Vingerhoeds, P.F.H. Harmsen, D. Eastham, Lignin based controlled release coatings, *Ind Crops Prod.* 34 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.02.011>.
- [23] M.H. Sipponen, O.J. Rojas, V. Pihlajaniemi, K. Lintinen, M. Österberg, Calcium Chelation of Lignin from Pulp Spent Liquor for Water-Resistant Slow-Release Urea Fertilizer Systems, *ACS Sustain Chem Eng.* 5 (2017). <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b02348>.
- [24] Y. He, Z. Wu, L. Tu, Y. Han, G. Zhang, C. Li, Encapsulation and characterization of slow-release microbial fertilizer from the composites of bentonite and alginate, *Appl Clay Sci.* 109–110 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.clay.2015.02.001>.
- [25] Z. Wu, Y. Zhao, I. Kaleem, C. Li, Preparation of calcium-alginate microcapsuled microbial fertilizer coating *Klebsiella oxytoca* Rs-5 and its performance under salinity stress, *Eur J Soil Biol.* 47 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.11.008>.
- [26] L. Wu, M. Liu, Preparation and properties of chitosan-coated NPK compound fertilizer with controlled-release and water-retention, *Carbohydr Polym.* 72 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.08.020>.
- [27] M. Guo, M. Liu, F. Zhan, L. Wu, Preparation and properties of a slow-release membrane-encapsulated urea fertilizer with superabsorbent and moisture preservation, *Ind Eng Chem Res.* 44 (2005). <https://doi.org/10.1021/ie0489406>.
- [28] B. Ni, M. Liu, S. Lü, Multifunctional slow-release urea fertilizer from ethylcellulose and superabsorbent coated formulations, *Chemical Engineering Journal.* 155 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.08.025>.

- [29] L. Wu, M. Liu, Rui Liang, Preparation and properties of a double-coated slow-release NPK compound fertilizer with superabsorbent and water-retention, *Bioresour Technol.* 99 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.027>.
- [30] K. Zhong, Z.T. Lin, X.L. Zheng, G.B. Jiang, Y.S. Fang, X.Y. Mao, Z.W. Liao, Starch derivative-based superabsorbent with integration of water-retaining and controlled-release fertilizers, *Carbohydr Polym.* 92 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.030>.
- [31] H.A. Essawy, M.B.M. Ghazy, F.A. El-Hai, M.F. Mohamed, Superabsorbent hydrogels via graft polymerization of acrylic acid from chitosan-cellulose hybrid and their potential in controlled release of soil nutrients, *Int J Biol Macromol.* 89 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.071>.
- [32] Y. Wang, M. Liu, B. Ni, L. Xie, κ -Carrageenan-sodium alginate beads and superabsorbent coated nitrogen fertilizer with slow-release, water-retention, and anticompaction properties, *Ind Eng Chem Res.* 51 (2012). <https://doi.org/10.1021/ie2020526>.
- [33] T. Jamnongkan, S. Kaewpirom, Potassium Release Kinetics and Water Retention of Controlled-Release Fertilizers Based on Chitosan Hydrogels, *J Polym Environ.* 18 (2010). <https://doi.org/10.1007/s10924-010-0228-6>.
- [34] X. Li, Q. Li, Y. Su, Q. Yue, B. Gao, Y. Su, A novel wheat straw cellulose-based semi-IPNs superabsorbent with integration of water-retaining and controlled-release fertilizers, *J Taiwan Inst Chem Eng.* 55 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.04.022>.
- [35] H. Mansouri, H. Ait Said, H. Noukrati, A. Oukarroum, H. Ben youcef, F. Perreault, Advances in Controlled Release Fertilizers: Cost-Effective Coating Techniques and Smart Stimuli-Responsive Hydrogels, *Adv Sustain Syst.* (2023). <https://doi.org/10.1002/adsu.202300149>.
- [36] B. Beig, M.B.K. Niazi, Z. Jahan, A. Hussain, M.H. Zia, M.T. Mehran, Coating materials for slow release of nitrogen from urea fertilizer: a review, *J Plant Nutr.* 43 (2020). <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1744647>.
- [37] K.R.M. Ibrahim, F.E. Babadi, R. Yunus, Comparative performance of different urea coating materials for slow release, *Particuology.* 17 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.partic.2014.03.009>.
- [38] J. Liu, Y. Yang, B. Gao, Y.C. Li, J. Xie, Bio-based elastic polyurethane for controlled-release urea fertilizer: Fabrication, properties, swelling and nitrogen release characteristics, *J Clean Prod.* 209 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.263>.
- [39] Y.C. Yang, M. Zhang, Y. Li, X.H. Fan, Y.Q. Geng, Improving the quality of polymer-coated urea with recycled plastic, proper additives, and large tablets, *J Agric Food Chem.* 60 (2012). <https://doi.org/10.1021/jf302813g>.
- [40] C. Dai, L. Yang, J. Xie, T.J. Wang, Nutrient diffusion control of fertilizer granules coated with a gradient hydrophobic film, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 588 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.124361>.
- [41] L. Yang, D. An, T.J. Wang, C. Kan, Y. Jin, Swelling and diffusion model of a hydrophilic film coating on controlled-release urea particles, *Particuology.* 30 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.partic.2016.03.005>.
- [42] Y. Wang, H. Guo, X. Wang, Z. Ma, X. Li, R. Li, Q. Li, R. Wang, X. Jia, Spout Fluidized Bed Assisted Preparation of Poly(tannic acid)-Coated Urea Fertilizer, *ACS Omega.* 5 (2020). <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03310>.

- [43] A.S. Giroto, G.G. Guimarães, L.A. Colnago, A. Klamczynski, G. Glenn, C. Ribeiro, Controlled release of nitrogen using urea-melamine-starch composites, *J Clean Prod.* 217 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.01.275>.
- [44] S. Bi, V. Barinelli, M.J. Sobkowicz, Degradable controlled release fertilizer composite prepared via extrusion: Fabrication, characterization, and release mechanisms, *Polymers (Basel)*. 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/polym12020301>.
- [45] E.M. Ahmed, Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *J Adv Res.* 6 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>.
- [46] P. Wen, Z. Wu, Y. Han, G. Cravotto, J. Wang, B.C. Ye, Microwave-Assisted Synthesis of a Novel Biochar-Based Slow-Release Nitrogen Fertilizer with Enhanced Water-Retention Capacity, *ACS Sustain Chem Eng.* 5 (2017). <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b01721>.
- [47] P. Wen, Z. Wu, Y. He, B.C. Ye, Y. Han, J. Wang, X. Guan, Microwave-Assisted Synthesis of a Semi-interpenetrating Polymer Network Slow-Release Nitrogen Fertilizer with Water Absorbency from Cotton Stalks, *ACS Sustain Chem Eng.* 4 (2016). <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b01466>.
- [48] D. França, Â.F. Medina, L.L. Messa, C.F. Souza, R. Faez, Chitosan spray-dried microcapsule and microsphere as fertilizer host for swellable – controlled release materials, *Carbohydr Polym.* 196 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.014>.
- [49] J.J. Perez Bravo, N.J. François, Chitosan/Starch Matrices Prepared by Ionotropic Gelation: Rheological Characterization, Swelling Behavior and Potassium Nitrate Release Kinetics, *J Polym Environ.* 28 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01798-5>.
- [50] M.R. Hussain, R.R. Devi, T.K. Maji, Controlled release of urea from chitosan microspheres prepared by emulsification and cross-linking method, *Iranian Polymer Journal (English Edition)*. 21 (2012). <https://doi.org/10.1007/s13726-012-0051-0>.
- [51] M.M. Iftime, G.L. Ailiesei, E. Ungureanu, L. Marin, Designing chitosan based eco-friendly multifunctional soil conditioner systems with urea controlled release and water retention, *Carbohydr Polym.* 223 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115040>.
- [52] S. Noppakundilokrat, N. Pheatcharat, S. Kiatkamjornwong, Multilayer-coated NPK compound fertilizer hydrogel with controlled nutrient release and water absorbency, *J Appl Polym Sci.* 132 (2015). <https://doi.org/10.1002/app.41249>.
- [53] T. el Assimi, O. Lakbita, A. el Meziane, M. Khoulood, A. Dahchour, R. Beniazza, R. Boulif, M. Raihane, M. Lahcini, Sustainable coating material based on chitosan-clay composite and paraffin wax for slow-release DAP fertilizer, *Int J Biol Macromol.* 161 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.074>.
- [54] M. Mucha, Chitozan. Wszechstronny polimer ze źródeł odnawialnych., WNT, Warszawa, 2010.
- [55] S. (Gabriel) Kou, L.M. Peters, M.R. Mucalo, Chitosan: A review of sources and preparation methods, *Int J Biol Macromol.* 169 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.005>.
- [56] M.N.V. Ravi Kumar, A review of chitin and chitosan applications, *React Funct Polym.* 46 (2000). [https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(00\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(00)00038-9).
- [57] N. Morin-Crini, E. Lichtfouse, G. Torri, G. Crini, Fundamentals and Applications of Chitosan, in: 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16538-3_2.

- [58] N. Nwe, T. Furuike, H. Tamura, Isolation and characterization of chitin and chitosan from marine origin, in: *Adv Food Nutr Res*, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800269-8.00001-4>.
- [59] S. Kumari, S.H. Kumar Annamareddy, S. Abanti, P. Kumar Rath, Physicochemical properties and characterization of chitosan synthesized from fish scales, crab and shrimp shells, *Int J Biol Macromol.* 104 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.119>.
- [60] A. Hidangmayum, P. Dwivedi, D. Katiyar, A. Hemantaranjan, Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress, *Physiology and Molecular Biology of Plants.* 25 (2019). <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0633-1>.
- [61] R. Sharif, M. Mujtaba, M.U. Rahman, A. Shalmani, H. Ahmad, T. Anwar, D. Tianchan, X. Wang, The multifunctional role of chitosan in horticultural crops; a review, *Molecules.* 23 (2018). <https://doi.org/10.3390/molecules23040872>.
- [62] N. Morin-Crini, E. Lichtfouse, G. Torri, G. Crini, Applications of chitosan in food, pharmaceuticals, medicine, cosmetics, agriculture, textiles, pulp and paper, biotechnology, and environmental chemistry, *Environ Chem Lett.* 17 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00904-x>.
- [63] M.E.I. Badawy, E.I. Rabea, A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogens and Their Applications in Crop Protection, *International Journal of Carbohydrate Chemistry.* 2011 (2011). <https://doi.org/10.1155/2011/460381>.
- [64] M. Malerba, R. Cerana, Recent advances of chitosan applications in plants, *Polymers (Basel).* 10 (2018). <https://doi.org/10.3390/polym10020118>.
- [65] M. Malerba, R. Cerana, Chitosan effects on plant systems, *Int J Mol Sci.* 17 (2016). <https://doi.org/10.3390/ijms17070996>.
- [66] B. Cheng, B. Pei, Z. Wang, Q. Hu, Advances in chitosan-based superabsorbent hydrogels, *RSC Adv.* 7 (2017). <https://doi.org/10.1039/c7ra07104c>.
- [67] B. Tylińczak, S. Kudłacik-Kramarczyk, A. Drabczyk, M. Krzan, Comparison of polysaccharides-based hydrogel matrices, *Przemysł Chemiczny.* 96 (2017). <https://doi.org/10.15199/62.2017.12.30>.
- [68] F.N. Maluin, M.Z. Hussein, Chitosan-based agronanochemicals as a sustainable alternative in crop protection, *Molecules.* 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/molecules25071611>.
- [69] M. Mujtaba, K.M. Khawar, M.C. Camara, L.B. Carvalho, L.F. Fraceto, R.E. Morsi, M.Z. Elsabee, M. Kaya, J. Labidi, H. Ullah, D. Wang, Chitosan-based delivery systems for plants: A brief overview of recent advances and future directions, *Int J Biol Macromol.* 154 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.128>.
- [70] P.L. Kashyap, X. Xiang, P. Heiden, Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture, *Int J Biol Macromol.* 77 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.039>.
- [71] O. Cota-Arriola, M. Onofre Cortez-Rocha, A. Burgos-Hernández, J. Marina Ezquerra-Brauer, M. Plascencia-Jatomea, Controlled release matrices and micro/nanoparticles of chitosan with antimicrobial potential: Development of new strategies for microbial control in agriculture, *J Sci Food Agric.* 93 (2013). <https://doi.org/10.1002/jsfa.6060>.
- [72] R. Michalik, K. Kozioł, I. Wandzik, Possibilities of using chitosan in fertilizer coatings, *Przemysł Chemiczny.* 100 (2021) 1067–1070. <https://doi.org/10.15199/62.2021.11.8>.

- [73] M. Mahinroosta, Z. Jomeh Farsangi, A. Allahverdi, Z. Shakoori, Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications, *Mater Today Chem.* 8 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.02.004>.
- [74] F. Ullah, M.B.H. Othman, F. Javed, Z. Ahmad, H.M. Akil, Classification, processing and application of hydrogels: A review, *Materials Science and Engineering C.* 57 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.053>.
- [75] M.J. Zohuriaan-Mehr, H. Omidian, S. Doroudiani, K. Kabiri, Advances in non-hygienic applications of superabsorbent hydrogel materials, *J Mater Sci.* 45 (2010). <https://doi.org/10.1007/s10853-010-4780-1>.
- [76] A. Mignon, N. de Belie, P. Dubruel, S. van Vlierberghe, Superabsorbent polymers: A review on the characteristics and applications of synthetic, polysaccharide-based, semi-synthetic and 'smart' derivatives, *Eur Polym J.* 117 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.04.054>.
- [77] R.A. Ramli, Slow release fertilizer hydrogels: A review, *Polym Chem.* 10 (2019). <https://doi.org/10.1039/c9py01036j>.
- [78] M.R. Guilherme, F.A. Aouada, A.R. Fajardo, A.F. Martins, A.T. Paulino, M.F.T. Davi, A.F. Rubira, E.C. Muniz, Superabsorbent hydrogels based on polysaccharides for application in agriculture as soil conditioner and nutrient carrier: A review, *Eur Polym J.* 72 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.04.017>.
- [79] B. Tomadoni, C. Casalongué, V.A. Alvarez, Biopolymer-Based Hydrogels for Agriculture Applications: Swelling Behavior and Slow Release of Agrochemicals, in: *Polymers for Agri-Food Applications*, 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19416-1_7.
- [80] D. Pasqui, M. De Cagna, R. Barbucci, Polysaccharide-based hydrogels: The key role of water in affecting mechanical properties, *Polymers (Basel)*. 4 (2012). <https://doi.org/10.3390/polym4031517>.
- [81] A.G.B. Pereira, A.F. Martins, A.T. Paulino, A.R. Fajardo, M.R. Guilherme, M.G.I. Faria, G.A. Linde, A.F. Rubira, E.C. Muniz, Recent advances in designing hydrogels from chitin and chitin-derivatives and their impact on environment and agriculture: A review, *Revista Virtual de Quimica.* 9 (2017). <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170021>.
- [82] S. Nangia, S. Warkar, D. Katyal, A review on environmental applications of chitosan biopolymeric hydrogel based composites, *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry.* 55 (2018). <https://doi.org/10.1080/10601325.2018.1526041>.
- [83] C. Demitri, F. Scalerà, M. Madaghiele, A. Sannino, A. Maffezzoli, Potential of cellulose-based superabsorbent hydrogels as water reservoir in agriculture, *Int J Polym Sci.* 2013 (2013). <https://doi.org/10.1155/2013/435073>.
- [84] H. Ismail, M. Irani, Z. Ahmad, Starch-based hydrogels: Present status and applications, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials.* 62 (2013). <https://doi.org/10.1080/00914037.2012.719141>.
- [85] A.N. Jyothi, Starch graft copolymers: Novel applications in industry, in: *Compos Interfaces*, 2010. <https://doi.org/10.1163/092764410X490581>.
- [86] H.A. Abd El-Rehim, Characterization and possible agricultural application of polyacrylamide/sodium alginate crosslinked hydrogels prepared by ionizing radiation, *J Appl Polym Sci.* 101 (2006). <https://doi.org/10.1002/app.22487>.

- [87] M.C.G. Pellá, M.K. Lima-Tenório, E.T. Tenório-Neto, M.R. Guilherme, E.C. Muniz, A.F. Rubira, Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications, *Carbohydr Polym.* 196 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.033>.
- [88] S. Peers, A. Montembault, C. Ladavière, Chitosan hydrogels for sustained drug delivery, *Journal of Controlled Release.* 326 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.06.012>.
- [89] R. Michalik, I. Wandzik, A Mini-Review on Chitosan-Based Hydrogels with Potential for Sustainable Agricultural Applications, *Polymers (Basel).* 12 (2020) 2425. <https://doi.org/10.3390/polym12102425>.
- [90] M. Said, Y. Atassi, M. Tally, H. Khatib, Environmentally Friendly Chitosan-g-poly(acrylic acid-co-acrylamide)/Ground Basalt Superabsorbent Composite for Agricultural Applications, *J Polym Environ.* 26 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1269-5>.
- [91] A.M. Elbarbary, H.A.A. El-Rehim, N.M. El-Sawy, E.S.A. Hegazy, E.S.A. Soliman, Radiation induced crosslinking of polyacrylamide incorporated low molecular weights natural polymers for possible use in the agricultural applications, *Carbohydr Polym.* 176 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.050>.
- [92] N.H. Mat Nayan, M.S. Anwar Hamzah, A.A. Mohd Tahir, A.A.A. Rajali, E.F. Muslih, R. Mazlan, Development of Polyvinyl Alcohol/Chitosan Hydrogel Loaded with Fertilizer Compound: Preparation, Properties and Effect on Seed Germination, *Journal of Science and Technology.* 10 (2018). <https://doi.org/10.30880/jst.2018.10.04.004>.
- [93] A. Juárez-Maldonado, H. Ortega-Ortíz, F. Pérez-Labrada, G. Cadenas-Pliego, A. Benavides-Mendoza, Cu Nanoparticles absorbed on chitosan hydrogels positively alter morphological, production, and quality characteristics of tomato, *Journal of Applied Botany and Food Quality.* 89 (2016). <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2016.089.023>.
- [94] H. González Gómez, F. Ramírez Godina, H. Ortega Ortiz, A. Benavides Mendoza, V. Robledo Torres, M. Cabrera De la Fuente, Use of Chitosan-PVA Hydrogels with Copper Nanoparticles to Improve the Growth of Grafted Watermelon, *Molecules.* 22 (2017). <https://doi.org/10.3390/molecules22071031>.
- [95] E.P. Minet, C. O'Carroll, D. Rooney, C. Breslin, C.P. McCarthy, L. Gallagher, K.G. Richards, Slow delivery of a nitrification inhibitor (dicyandiamide) to soil using a biodegradable hydrogel of chitosan, *Chemosphere.* 93 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.08.043>.
- [96] O. León, A. Muñoz-Bonilla, D. Soto, J. Ramirez, Y. Marquez, M. Colina, M. Fernández-García, Preparation of Oxidized and Grafted Chitosan Superabsorbents for Urea Delivery, *J Polym Environ.* 26 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10924-017-0981-x>.
- [97] J.J. Perez, N.J. Francois, G.A. Maroniche, M.P. Borrajo, M.A. Pereyra, C.M. Creus, A novel, green, low-cost chitosan-starch hydrogel as potential delivery system for plant growth-promoting bacteria, *Carbohydr Polym.* 202 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.084>.
- [98] A. Narayanan, R. Dhamodharan, Super water-absorbing new material from chitosan, EDTA and urea, *Carbohydr Polym.* 134 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.010>.
- [99] A. Narayanan, R. Kartik, E. Sangeetha, R. Dhamodharan, Super water absorbing polymeric gel from chitosan, citric acid and urea: Synthesis and mechanism of water absorption, *Carbohydr Polym.* 191 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.028>.

- [100] D. Feng, B. Bai, H. Wang, Y. Suo, Enhanced mechanical stability and sensitive swelling performance of chitosan/yeast hybrid hydrogel beads, *New Journal of Chemistry*. 40 (2016). <https://doi.org/10.1039/c5nj02404h>.
- [101] J.C. López-Velázquez, R. Rodríguez-Rodríguez, H. Espinosa-Andrews, J.A. Qui-Zapata, S. García-Morales, D.E. Navarro-López, G. Luna-Bárceñas, E.C. Vassallo-Brigneti, Z.Y. García-Carvajal, Gelatin–chitosan–PVA hydrogels and their application in agriculture, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 94 (2019). <https://doi.org/10.1002/jctb.5961>.
- [102] B.R. Araújo, L.P.C. Romão, M.E. Doumer, A.S. Mangrich, Evaluation of the interactions between chitosan and humics in media for the controlled release of nitrogen fertilizer, *J Environ Manage*. 190 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.12.059>.
- [103] N. Özel, M. Elibol, A review on the potential uses of deep eutectic solvents in chitin and chitosan related processes, *Carbohydr Polym*. 262 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117942>.
- [104] E.L. Smith, A.P. Abbott, K.S. Ryder, Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications, *Chem Rev*. 114 (2014). <https://doi.org/10.1021/cr300162p>.
- [105] M. Zdanowicz, K. Wilpiszewska, T. Spychaj, Deep eutectic solvents for polysaccharides processing. A review, *Carbohydr Polym*. 200 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.078>.
- [106] T. El Achkar, H. Greige-Gerges, S. Fourmentin, Basics and properties of deep eutectic solvents: a review, *Environ Chem Lett*. 19 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01225-8>.
- [107] K.A. Omar, R. Sadeghi, Physicochemical properties of deep eutectic solvents: A review, *J Mol Liq*. 360 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119524>.
- [108] C. Florindo, F.S. Oliveira, L.P.N. Rebelo, A.M. Fernandes, I.M. Marrucho, Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on cholinium chloride and carboxylic acids, *ACS Sustain Chem Eng*. 2 (2014). <https://doi.org/10.1021/sc500439w>.
- [109] M.C. Gutiérrez, M.L. Ferrer, C.R. Mateo, F. del Monte, Freeze-drying of aqueous solutions of deep eutectic solvents: A suitable approach to deep eutectic suspensions of self-assembled structures, *Langmuir*. 25 (2009). <https://doi.org/10.1021/la900552b>.
- [110] Y. Dai, G.J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications, *Food Chem*. 187 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.123>.
- [111] N.E. Suyatma, L. Tighzert, A. Copinet, V. Coma, Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films, *J Agric Food Chem*. 53 (2005). <https://doi.org/10.1021/jf048790+>.
- [112] M.G.A. Vieira, M.A. da Silva, L.O. dos Santos, M.M. Beppu, Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review, *Eur Polym J*. 47 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011>.
- [113] A.C. Galvis-Sánchez, M.C.R. Castro, K. Biernacki, M.P. Gonçalves, H.K.S. Souza, Natural deep eutectic solvents as green plasticizers for chitosan thermoplastic production with controlled/desired mechanical and barrier properties, *Food Hydrocoll*. 82 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.026>.
- [114] A.C. Galvis-Sánchez, A.M.M. Sousa, L. Hilliou, M.P. Gonçalves, H.K.S. Souza, Thermo-compression molding of chitosan with a deep eutectic mixture for biofilms development, *Green Chemistry*. 18 (2016). <https://doi.org/10.1039/c5gc02231b>.

- [115] E. Jakubowska, M. Gierszewska, J. Nowaczyk, E. Olewnik-Kruszkowska, The role of a deep eutectic solvent in changes of physicochemical and antioxidative properties of chitosan-based films, *Carbohydr Polym.* 255 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117527>.
- [116] M.P. Sokolova, M.A. Smirnov, A.A. Samarov, N. V. Bobrova, V.K. Vorobiov, E.N. Popova, E. Filippova, P. Geydt, E. Lahderanta, A.M. Toikka, Plasticizing of chitosan films with deep eutectic mixture of malonic acid and choline chloride, *Carbohydr Polym.* 197 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.037>.
- [117] J. Yu, S. Xu, G. Goksen, C. Yi, P. Shao, Chitosan films plasticized with choline-based deep eutectic solvents: UV shielding, antioxidant, and antibacterial properties, *Food Hydrocoll.* 135 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108196>.
- [118] Kasai R, Various Methods for Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitin and Chitosan : A Review, *J Agric Food Chem.* 57 (2009).
- [119] X. Jiang, L. Chen, W. Zhong, A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan, *Carbohydr Polym.* 54 (2003). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.05.004>.
- [120] Y. Zhang, X. Zhang, R. Ding, J. Zhang, J. Liu, Determination of the degree of deacetylation of chitosan by potentiometric titration preceded by enzymatic pretreatment, *Carbohydr Polym.* 83 (2011) 813–817. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.058>.
- [121] N. Balázs, P. Sipos, Limitations of pH-potentiometric titration for the determination of the degree of deacetylation of chitosan, *Carbohydr Res.* 342 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.11.016>.
- [122] Z. Jia, D. Shen, Effect of reaction temperature and reaction time on the preparation of low-molecular-weight chitosan using phosphoric acid, *Carbohydr Polym.* 49 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00026-7](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00026-7).
- [123] K.C. Gupta, F.H. Jabrail, Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres, *Carbohydr Polym.* 66 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.02.019>.
- [124] S.C. Tan, E. Khor, T.K. Tan, S.M. Wong, The degree of deacetylation of chitosan: Advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination, in: *Talanta*, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(97\)00288-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(97)00288-9).
- [125] T. Wu, S. Zivanovic, Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method, *Carbohydr Polym.* 73 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.11.024>.
- [126] D. Liu, Y. Wei, P. Yao, L. Jiang, Determination of the degree of acetylation of chitosan by UV spectrophotometry using dual standards, *Carbohydr Res.* 341 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.01.008>.
- [127] H.Y. Hsiao, C.C. Tsai, S. Chen, B.C. Hsieh, R.L.C. Chen, Spectrophotometric determination of deacetylation degree of chitinous materials dissolved in phosphoric acid, *Macromol Biosci.* 4 (2004). <https://doi.org/10.1002/mabi.200400084>.
- [128] V.I. Pedroni, M.E. Gschaider, P.C. Schulz, UV Spectrophotometry: Improvements in the Study of the Degree of Acetylation of Chitosan, in: *Macromol Biosci*, 2003. <https://doi.org/10.1002/mabi.200300024>.

- [129] I.K.D. Dimzon, T.P. Knepper, Degree of deacetylation of chitosan by infrared spectroscopy and partial least squares, *Int J Biol Macromol.* 72 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.09.050>.
- [130] B. Fatima, Quantitative Analysis by IR: Determination of Chitin/Chitosan DD, in: *Modern Spectroscopic Techniques and Applications*, 2020. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89708>.
- [131] M.R. Kasaai, A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy, *Carbohydr Polym.* 71 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.07.009>.
- [132] M.L. Duarte, M.C. Ferreira, M.R. Marvão, J. Rocha, An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy, *Int J Biol Macromol.* 31 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(02\)00039-9](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(02)00039-9).
- [133] A. Zajac, J. Hanuza, M. Wandas, L. Dymińska, Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 134 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.06.071>.
- [134] M.R. Kasaai, J. Arul, G. Charlet, Intrinsic viscosity-molecular weight relationship for chitosan, *J Polym Sci B Polym Phys.* 38 (2000). [https://doi.org/10.1002/1099-0488\(20001001\)38:19<2591::AID-POLB110>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1099-0488(20001001)38:19<2591::AID-POLB110>3.0.CO;2-6).
- [135] Z.M. dos Santos, A.L.P.F. Caroni, M.R. Pereira, D.R. da Silva, J.L.C. Fonseca, Determination of deacetylation degree of chitosan: a comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis, *Carbohydr Res.* 344 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.08.030>.
- [136] Y. Zhang, C. Xue, Y. Xue, R. Gao, X. Zhang, Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction, *Carbohydr Res.* 340 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.05.005>.
- [137] A. Hirai, H. Odani, A. Nakajima, Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy, *Polymer Bulletin.* 26 (1991). <https://doi.org/10.1007/BF00299352>.
- [138] M. Lavertu, Z. Xia, A.N. Serreqi, M. Berrada, A. Rodrigues, D. Wang, M.D. Buschmann, A. Gupta, A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan, *J Pharm Biomed Anal.* 32 (2003). [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00155-9](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00155-9).
- [139] M.R. Kasaai, Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review, *Carbohydr Polym.* 79 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.051>.
- [140] L. Heux, J. Brugnerotto, J. Desbrières, M.F. Versali, M. Rinaudo, Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan, *Biomacromolecules.* 1 (2000). <https://doi.org/10.1021/bm000070y>.
- [141] L.S. Guinesi, É.T.G. Cavalheiro, The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples, *Thermochim Acta.* 444 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.tca.2006.03.003>.
- [142] R. Czechowska-Biskup, D. Jarosińska, B. Rokita, P. Ulański, J.M. Rosiak, Determination of degree of deacetylation of chitosan - Comparison of methods, *Prog Chem Appl Chitin Deriv.* 2012 (2012).
- [143] N. Liu, X.G. Chen, H.J. Park, C.G. Liu, C.S. Liu, X.H. Meng, L.J. Yu, Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*, *Carbohydr Polym.* 64 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.10.028>.

- [144] S. Liang, Y. Sun, X. Dai, A review of the preparation, analysis and biological functions of chitoooligosaccharide, *Int J Mol Sci.* 19 (2018). <https://doi.org/10.3390/ijms19082197>.
- [145] J. Lizardi-Mendoza, W.M. Argüelles Monal, F.M. Goycoolea Valencia, Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitosan, in: *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities*, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802735-6.00001-X>.
- [146] W. Zhang, J. Cao, W. Jiang, Analysis of film-forming properties of chitosan with different molecular weights and its adhesion properties with different postharvest fruit surfaces, *Food Chem.* 395 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133605>.
- [147] Z. Jia, D. Shen, W. Xu, Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan, *Carbohydr Res.* 333 (2001). [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(01\)00112-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00112-4).
- [148] T. Xu, M. Xin, M. Li, H. Huang, S. Zhou, J. Liu, Synthesis, characterization, and antibacterial activity of N,O-quaternary ammonium chitosan, *Carbohydr Res.* 346 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.08.002>.
- [149] Z. Guo, R. Xing, S. Liu, Z. Zhong, X. Ji, L. Wang, P. Li, The influence of the cationic of quaternized chitosan on antifungal activity, *Int J Food Microbiol.* 118 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.003>.
- [150] J. Wu, Z.G. Su, G.H. Ma, A thermo- and pH-sensitive hydrogel composed of quaternized chitosan/glycerophosphate, *Int J Pharm.* 315 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.01.045>.
- [151] J. Luo, X. Wang, B. Xia, J. Wu, Preparation and characterization of quaternized chitosan under microwave irradiation, *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry.* 47 (2010). <https://doi.org/10.1080/10601325.2010.501310>.
- [152] H. Ruihua, Y. Bingchao, D. Zheng, B. Wang, Preparation and characterization of a quaternized chitosan, *J Mater Sci.* 47 (2012). <https://doi.org/10.1007/s10853-011-5862-4>.
- [153] G. He, W. Ke, X. Chen, Y. Kong, H. Zheng, Y. Yin, W. Cai, Preparation and properties of quaternary ammonium chitosan-g-poly(acrylic acid-co-acrylamide) superabsorbent hydrogels, *React Funct Polym.* 111 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.12.001>.
- [154] P. Liu, W. Meng, S. Wang, Y. Sun, M. Aqeel Ashraf, Quaternary ammonium salt of chitosan: Preparation and antimicrobial property for paper, *Open Medicine (Poland).* 10 (2015). <https://doi.org/10.1515/med-2015-0081>.
- [155] R. Gruškiene, R. Deveikyte, R. Makuška, Quaternization of chitosan and partial destruction of the quaternized derivatives making them suitable for electrospinning, *Chemija.* 24 (2013).
- [156] M. Bulwan, S. Zapotoczny, M. Nowakowska, Robust “one-component” chitosan-based ultrathin films fabricated using layer-by-layer technique, *Soft Matter.* 5 (2009). <https://doi.org/10.1039/b909355a>.
- [157] S.H. Lim, S.M. Hudson, Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group, *Carbohydr Res.* 339 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.10.024>.
- [158] S.D. Li, P.W. Li, Z.M. Yang, Z. Peng, W.Y. Quan, X.H. Yang, L. Yang, J.J. Dong, Synthesis and characterization of chitosan quaternary ammonium salt and its application as drug carrier for ribavirin, *Drug Deliv.* 21 (2014). <https://doi.org/10.3109/10717544.2013.853708>.

- [159] B. Xiao, Y. Wan, X. Wang, Q. Zha, H. Liu, Z. Qiu, S. Zhang, Synthesis and characterization of N-(2-hydroxy)propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride for potential application in gene delivery, *Colloids Surf B Biointerfaces*. 91 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.10.053>.
- [160] J. Cho, J. Grant, M. Piquette-Miller, C. Allen, Synthesis and physicochemical and dynamic mechanical properties of a water-soluble chitosan derivative as a biomaterial, *Biomacromolecules*. 7 (2006). <https://doi.org/10.1021/bm060436s>.
- [161] S.P. Rwei, Y.M. Chen, W.Y. Lin, W.Y. Chiang, Synthesis and rheological characterization of water-soluble glycidyltrimethylammonium-chitosan, *Mar Drugs*. 12 (2014). <https://doi.org/10.3390/md12115547>.
- [162] Y. ho Kim, H.M. Choi, J. Hee Yoon, Synthesis of a Quaternary Ammonium Derivative of Chitosan and Its Application to a Cotton Antimicrobial Finish, *Textile Research Journal*. 68 (1998). <https://doi.org/10.1177/004051759806800607>.
- [163] E. Loubaki, M. Ourevitch, S. Sicsic, Chemical modification of chitosan by glycidyl trimethylammonium chloride. characterization of modified chitosan by ¹³C- and ¹H-NMR spectroscopy, *Eur Polym J*. 27 (1991). [https://doi.org/10.1016/0014-3057\(91\)90111-Z](https://doi.org/10.1016/0014-3057(91)90111-Z).
- [164] V.K. Mourya, N.N. Inamdar, A. Tiwari, Carboxymethyl chitosan and its applications, *Adv Mater Lett*. 1 (2010). <https://doi.org/10.5185/amlett.2010.3108>.
- [165] A. Jaidee, P. Rachtanapun, S. Luangkamin, ¹H-NMR analysis of degree of substitution in N,O-carboxymethyl chitosans from various chitosan sources and types, in: *Adv Mat Res*, 2012. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.506.158>.
- [166] F.R. de Abreu, S.P. Campana-Filho, Preparation and characterization of carboxymethylchitosan, *Polímeros*. 15 (2005). <https://doi.org/10.1590/s0104-14282005000200004>.
- [167] H.C. Ge, D.K. Luo, Preparation of carboxymethyl chitosan in aqueous solution under microwave irradiation, *Carbohydr Res*. 340 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.02.025>.
- [168] N.M.B. Ladeira, C.L. Donnici, J.P. de Mesquita, F.V. Pereira, Preparation and characterization of hydrogels obtained from chitosan and carboxymethyl chitosan, *Journal of Polymer Research*. 28 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10965-021-02682-z>.
- [169] X.G. Chen, H.J. Park, Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions, *Carbohydr Polym*. 53 (2003). [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00051-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00051-1).
- [170] X.F. Liu, Y.L. Guan, D.Z. Yang, Z. Li, K. de Yao, Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan, *J Appl Polym Sci*. 79 (2001). [https://doi.org/10.1002/1097-4628\(20010214\)79:7<1324::AID-APP210>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1097-4628(20010214)79:7<1324::AID-APP210>3.0.CO;2-L).
- [171] I.M. El-Sherbiny, Enhanced pH-responsive carrier system based on alginate and chemically modified carboxymethyl chitosan for oral delivery of protein drugs: Preparation and in-vitro assessment, *Carbohydr Polym*. 80 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.034>.
- [172] W. Xie, P. Xu, W. Wang, Q. Liu, Preparation of water-soluble chitosan derivatives and their antibacterial activity, *J Appl Polym Sci*. 85 (2002). <https://doi.org/10.1002/app.10424>.
- [173] H. Bidgoli, A. Zamani, M.J. Taherzadeh, Effect of carboxymethylation conditions on the water-binding capacity of chitosan-based superabsorbents, *Carbohydr Res*. 345 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.09.024>.

- [174] Y. Chen, Y. fei Liu, H. min Tan, J. xin Jiang, Synthesis and characterization of a novel superabsorbent polymer of N,O-carboxymethyl chitosan graft copolymerized with vinyl monomers, *Carbohydr Polym.* 75 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.07.022>.
- [175] Y. Chen, H. min Tan, Crosslinked carboxymethylchitosan-g-poly(acrylic acid) copolymer as a novel superabsorbent polymer, *Carbohydr Res.* 341 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.01.027>.
- [176] X. Kong, Simultaneous determination of degree of deacetylation, degree of substitution and distribution fraction of -COONa in carboxymethyl chitosan by potentiometric titration, *Carbohydr Polym.* 88 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.019>.
- [177] Y. Luo, Z. Teng, X. Wang, Q. Wang, Development of carboxymethyl chitosan hydrogel beads in alcohol-aqueous binary solvent for nutrient delivery applications, *Food Hydrocoll.* 31 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.011>.
- [178] P. Katugampola, C. Winstead, A. Adeleke, Thermal stability of carboxymethyl chitosan varying the degree of substitution, *International Journal of Pharmaceutical Science Invention* ISSN. 3 (2014).
- [179] C.G. de Kruif, F. Weinbreck, R. de Vries, Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides, *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 9 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2004.09.006>.
- [180] S.P. Moulik, A.K. Rakshit, A. Pan, B. Naskar, An Overview of Coacervates: The Special Disperse State of Amphiphilic and Polymeric Materials in Solution, *Colloids and Interfaces.* 6 (2022). <https://doi.org/10.3390/colloids6030045>.
- [181] Y.P. Timilsena, T.O. Akanbi, N. Khalid, B. Adhikari, C.J. Barrow, Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation, *Int J Biol Macromol.* 121 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.144>.
- [182] G. Lalevée, L. David, A. Montembault, K. Blanchard, J. Meadows, S. Malaise, A. Crépet, I. Grillo, I. Morfin, T. Delair, G. Sudre, Highly stretchable hydrogels from complex coacervation of natural polyelectrolytes, *Soft Matter.* 13 (2017). <https://doi.org/10.1039/c7sm01215b>.
- [183] N. Devi, M. Sarmah, B. Khatun, T.K. Maji, Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates, *Adv Colloid Interface Sci.* 239 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.05.009>.
- [184] D. Priftis, M. Tirrell, Phase behaviour and complex coacervation of aqueous polypeptide solutions, *Soft Matter.* 8 (2012). <https://doi.org/10.1039/c2sm25604e>.
- [185] A.B. Kayitmazer Büyükokutan, Ö. Karabiyik Acar, G. Torun Kose. Coacervate production method using coacervation and the usage of coacervatives obtained by this method as tissue. Patent światowy WO2019054971A2, zarejestrowany 14.09.2018 i wydany 21.03.2019. <https://patents.google.com/patent/WO2019054971A2>.
- [186] F. Liu, X. Yu, D. E. VanEpps, I.A. Strehin. Coacervate hyaluronan hydrogels for dermal filler applications. Patent USA US2020054786A1, zarejestrowany 13.10.2016 i wydany 20.02.2020. <https://patents.google.com/patent/US20200054786A1>.
- [187] J.D. Reed, C.G. Krueger, S. Madrigal-Carballo. Tannin-chitosan composites. Patent USA US20110059162A1, zarejestrowany 03.09.2010 i wydany 10.03.2011. <https://patents.google.com/patent/US20110059162A1>

- [188] Zeins chitosan complex coacervation thing and multi-mode supersonically preparation method. Patent chiński CN106942703A, zarejestrowany 13.02.2017 i wydany 14.07.2017. <https://patents.google.com/patent/CN106942703A>
- [189] E.G. Arafa, M.W. Sabaa, R.R. Mohamed, E.M. Kamel, A.M. Elzanaty, A.M. Mahmoud, O.F. Abdel-Gawad, Eco-friendly and biodegradable sodium alginate/quaternized chitosan hydrogel for controlled release of urea and its antimicrobial activity, *Carbohydr Polym.* 291 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119555>.
- [190] G.Q. Huang, J.X. Xiao, S.Q. Wang, H.W. Qiu, Rheological properties of O-carboxymethyl chitosan - gum Arabic coacervates as a function of coacervation pH, *Food Hydrocoll.* 43 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.06.015>.
- [191] R. Michalik, K. Kozioł, I. Wandzik, Physical hydrogels based on chitosan derivatives, *Przemysł Chemiczny.* 101 (2022) 822–826. <https://doi.org/10.15199/62.2022.10.14>.

STRESZCZENIE

Grupa Azoty Zakłady Azotowe Kędzierzyn S.A. jest znaczącym producentem granulowanych nawozów saletrzanych, ale konieczne są dalsze działania zmierzające do usprawnienia procesów produkcyjnych oraz poprawy jakości produktów. Zwiększone zapotrzebowanie na żywność wymaga intensyfikacji pól rolnych, jednak nadmierna chemizacja w rolnictwie przyczynia się także do negatywnych zjawisk takich jak eutrofizacja, efekt cieplarniany czy wysalanie gleb. Przenawożenie gleb przyczynia się do przedostawania składników pokarmowych do wód gruntowych rzek i zbiorników wodnych. W celu złagodzenia tych problemów wprowadzane są nawozy o kontrolowanym i spowolnionym uwalnianiu (CRF i SRF). Jednym ze sposobów wytwarzania CRF jest otoczkowanie nawozów – natryskiwanie warstwy lub kilku warstw materiału otoczkującego na powierzchnię nawozu, w celu utworzenia otoczki o niskiej przepuszczalności.

Celem rozprawy doktorskiej było opracowanie biodegradowalnej otoczki, z materiałów przyjaznych dla środowiska, które mogą zapewnić lepszą wydajność w kontrolowaniu szybkości uwalniania. W takich zastosowaniach zainteresowanie wzbudził chitozan i jego pochodne, które wykazują dobrą biodegradację. Ponadto chitozan ma właściwości przeciwdrobnoustrojowe i może być komercyjnie produkowany z naturalnie regenerujących się zasobów, takich jak odpady muszli z owoców morza.

Część literaturowa rozprawy doktorskiej obejmuje przegląd doniesień publikacyjnych z zakresu CRF i SRF oraz biodegradowalnych polimerów stosowanych do otoczkowania nawozów. Omówiono techniki powlekania nawozów oraz badania szybkości wymywania składników odżywczych z otoczkowanych nawozów. Następnie scharakteryzowano właściwości chitozanu i jego zastosowanie w rolnictwie. Poruszono również temat mieszanin głęboko eutektycznych, które mogą być stosowane jako plastyfikatory folii chitozanowych.

Część doświadczalna rozprawy doktorskiej została podzielona na dwie części: część jawną oraz część tajną. Część jawna pracy doktorskiej obejmowała realizację trzech etapów: (1) ocenę właściwości fizykochemicznych chitozanu, (2) syntezę pochodnych chitozanu: 2-hydroksypropylo-3-trimetyloamoniowego chlorku chitozanu (HACC) i karboksymetylochitozanu (CMC) oraz ich charakterystykę, (3) opracowanie metod otrzymywania folii chitozanowych z dodatkiem mieszanin głęboko eutektycznych.

Część tajna rozprawy doktorskiej, która została zamieszczona w osobnej części, obejmuje metody otoczkowania nawozu na bazie azotanu(V) amonu – Salmagu za pomocą zsyntezowanych pochodnych chitozanu oraz roztworów chitozanu z dodatkiem mieszanin głęboko eutektycznych, charakterystykę otoczkowanych nawozów oraz badanie szybkości wymywania składników odżywczych z otoczkowanych nawozów.

SUMMARY

Grupa Azoty Zakłady Azotowe Kędzierzyn S.A. is a significant manufacturer of granulated nitrate fertilizers, but further efforts are needed to streamline production processes and improve product quality. The increased demand for food requires the intensification of agricultural products, but excessive use of chemicals in agriculture also contributes to negative phenomena such as eutrophication, the greenhouse effect and soil salting. Overfertilization of soil contributes to the penetration of nutrients into the groundwater of rivers and water reservoirs. To alleviate these problems, controlled and slow release fertilizers (CRF and SRF) are being introduced. One way to produce CRF is to encapsulate fertilizers - spraying a layer or several layers of encapsulating material onto the surface of the fertilizer to create a low permeability coating.

The aim of the doctoral dissertation was to develop a biodegradable shell, made of environmentally friendly materials, which can provide better performance in controlling the rate of release. In such applications, chitosan and its derivatives, which show good biodegradability have aroused interest. In addition, chitosan has antimicrobial properties and can be commercially produced from naturally regenerating resources such as seafood shell waste.

The literature part of the doctoral dissertation includes a review of publications in the field of CRF and SRF and biodegradable polymers used to coat fertilizers. The techniques of coating fertilizers proposed in the literature and the study of the release rate of nutrients from coated fertilizers are discussed. Then, the properties of chitosan and its use in agriculture were characterized. The topic of deep eutectic mixtures that can be used as plasticizers of chitosan films was also discussed.

The experimental part of the doctoral dissertation was divided into two parts: the open part and the confident part. The open part of the doctoral dissertation involved the implementation of three stages: (1) assessment of the physicochemical properties of chitosan, (2) synthesis of chitosan derivatives: 2-hydroxypropyl-3-trimethylammonium chitosan chloride (HACC) and carboxymethyl chitosan (CMC) and their characterization, (3) development of methods obtaining chitosan films with the addition of deep eutectic mixtures.

The confident part of the doctoral dissertation, which has been included in a separate part, covers the methods of encapsulating fertilizers based on ammonium nitrate(V) - Salmag with the use of synthesized derivatives of chitosan and chitosan solutions with the addition of deep eutectic mixtures, characteristics of encapsulated fertilizers and testing the release rate of nutrients from encapsulated fertilizers.

DOROBEK NAUKOWY

1. Publikacje związane z tematyką pracy doktorskiej:

- R. Michalik, I. Wandzik, *A mini-review on chitosan-based hydrogels with potential for sustainable agricultural applications*, Polymers, 2020, vol. 20, nr 10, s. 1-16, numer artykułu: 2325, doi:10.3390/polym12102425 (IF=4,33), liczba cytowań: 55 (Scopus), 70 (GoogleScholar)
- R. Michalik, K. Koziół, I. Wandzik, *Możliwości zastosowania chitozanu w otoczkach do nawozów*, Przemysł Chemiczny, 2021, vol. 100, nr 11, s. 1067-1070, doi:10.15199/62.2021.11.8 (IF=0,49)
- R. Michalik, K. Koziół, I. Wandzik, *Fizyczne hydrożele na bazie pochodnych chitozanu*, Przemysł Chemiczny, 2022, vol. 101, nr 10, s.822-826, doi:10.15199/62.2022.10.14 (IF=0,50)

Całkowity Impact Factor (IF): 5,32

2. Wystąpienia konferencyjne związane z tematyką pracy doktorskiej

Postery:

- R. Michalik, I. Wandzik, K. Koziół, *Fizyczne hydrożele chitozanowe do powlekania złożem fluidalnym*, X Kongres Technologii Chemicznej, 11–14.05.2022, Wrocław
- R. Michalik, I. Wandzik, K. Koziół, *Fizyczne hydrożele chitozanowe*, I Regionalna Konferencja Innowacje – Innowacyjność 2022 „Innowacyjność Województwa Opolskiego w nowym okresie programowania Zielone Innowacje w przemyśle i rolnictwie”, 5-6.10.2022, Zakrzów

Wystąpienia ustne:

- A. Wawoczny, K. Stanula, R. Michalik, *Rozpuszczalniki głęboko eutektyczne stosowane w celu rozpuszczania i modyfikacji polimerów naturalnych*, Biologia, chemia i środowisko - spojrzenie młodych naukowców: Edycja III, 20-22.05.2022, Kraków

3. Zgłoszenia patentowe związane z tematyką pracy doktorskiej

- R. Michalik, K. Koziół, E. Pankalla, I. Wandzik. Sposób otrzymywania koacerwatów na bazie pochodnych chitozanu i zastosowanie koacerwatów na bazie pochodnych chitozanu. Nr zgłoszenia w Urzędzie Patentowym RP – P. 441708, zarejestrowany 12.07.2022
- R. Michalik, J. Janik, G. Różański, I. Wandzik, D. Gillner, A. Wawoczny. Sposób otrzymywania biodegradowalnych otoczek na bazie chitozanu do nawozów azotowych oraz kompozycja na bazie chitozanu. Nr zgłoszenia w Urzędzie patentowym RP – P.445791, zarejestrowany 07.08.2023

- R. Michalik, J. Janik, G. Różański, I. Wandzik, D. Gillner, A. Wawoczny. Sposób otrzymywania biodegradowalnych otoczek na bazie chitozanu do nawozów azotowych oraz kompozycja na bazie chitozanu. Nr zgłoszenia w Urzędzie Patentowym RP – P.445793, zarejestrowany 07.08.2023

4. Udział w projektach realizowanych przez Grupę Azoty Zakłady Azotowe Kędzierzyn Spółka Akcyjna

- projekt numer POIR.01.01.01-00-1497/19 „Nowe formułacje wysokoazotowych nawozów typu CRF/SRF na bazie azotanów amonowych i powłok biodegradowalnych” w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój na lata 2014-2020, Działanie: Projekty B+R przedsiębiorstw

- od 1.02.2021 – pełnienie funkcji Kluczowego Personelu B+R (obowiązki: prowadzenie badań nad opracowywanym nawozem otoczkowanym, badanie efektywności nawożenia oraz czasy uwalniania składników, konsultacje procesowe dotyczące dostosowywania parametrów do wymogów istniejących procesów, doradztwo w pracach montażowych, konsultacje w testach w warunkach rzeczywistych, prowadzenie niezbędnych badań związanych z korekcją składu nawozów i ustalania grubości powłoki, konsultacje z dostawcami aparatury, udział w opracowywaniu strategii marketingowej, konsultacje podczas badań rejestracyjnych, przygotowywanie dokumentacji niezbędnej przy rejestracji produktów),
- od 1.02.2023 – pełnienie funkcji Pracownika technicznego w ramach w/w projektu (obowiązki: obsługa instalacji podczas rozruchu, obsługa instalacji przy produkcji nawozów otoczkowanych).

- projekt numer POIR.01.01.01-00-0741/18 „Specjalistyczne nawozy wieloskładnikowe na bazie azotanów amonowych zawierające podstawowe składniki pokarmowe (NPK), mikroskładniki, selen oraz stymulatory wzrostu” w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój na lata 2014-2020, Działanie: Projekty B+R przedsiębiorstw

- od 1.02.2021 – pełnienie funkcji Kluczowego Pracownika B+R (obowiązki: prowadzenie badań, prowadzenie procedur rejestracyjnych, identyfikacja problemów technicznych i rozwiązywanie ich w porozumieniu z Kierownikiem B+R, identyfikacja zagrożeń i znalezienie sposobów ich rozwiązania, konsultacje procesowe dotyczące dostosowywania parametrów do wymogów istniejących procesów).

- projekt numer POIR.01.01.01-00-1166/19 „Opracowywanie innowacyjnego procesu otrzymywania gamy estrów wobec katalizatora w postaci cieczy jonowej” w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój na lata 2014-2020, Działanie: Projekty B+R przedsiębiorstw

- od 1.10.2020 – pełnienie funkcji Specjalisty (obowiązki: współpraca z całym zespołem badawczym, zaangażowanie w badaniach przemysłowych i rozwojowych, współpraca

z jednostkami zewnętrznymi, monitorowanie badań, przekazywanie wyników w obrębie zespołu projektowego, identyfikacja problemów technicznych i rozwiązywanie ich w porozumieniu z technologami oraz Kierownikiem B+R, udział w przetargach wyboru podwykonawców, identyfikacja zagrożeń i znalezienie sposobów ich rozwiązania).

- projekt numer POIR.01.01.01-00-1167/19 „Opracowanie technologii wytwarzania glikolu neopentyłowego wysokiej czystości oraz oksymu aldehydu hydroksypivalowego z wykorzystaniem niskocennego półproduktu oraz strumienia wodoru odpadowego” w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój na lata 2014-2020, Działanie: Projekty B+R przedsiębiorstw

- od 1.10.2020 – pełnienie funkcji Specjalisty (obowiązki: udział w prowadzeniu prac przemysłowych w projekcie, badania laboratoryjne, weryfikacja otrzymanych wyników z badań przemysłowych i rozwojowych, nadzór nad pracami podwykonawczymi, udział w pracach rozwojowych w projekcie, udział w uruchomieniu instalacji pilotowej).