

Utjecaj bioaktivnog stakla na svojstva kompozitnih mikrosfera

Marić, Lora

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:936733>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Lora Marić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Lora Marić

**UTJECAJ BIOAKTIVNOG STAKLA NA SVOJSTVA KOMPOZITNIH
MIKROSFERA**

ZAVRŠNI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Marica Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Marica Ivanković

doc. dr. sc. Anamarija Rogina

dr. sc. Leonard Bauer

Zagreb, rujan 2023.

Zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Marici Ivanković, na prihvaćenom mentorstvu, prijedlogu teme te stručnom vodstvu prilikom izrade ovoga rada.

Veliko hvala i asistentu dr. sc. Leonardu Bauer na posvećenom vremenu, pomoći i svim savjetima za vrijeme izrade kako eksperimentalnog tako i pisanog dijela.

Hvala svim prijateljima što su bili uz mene. I za kraj ono najvažnije, posebno hvala mojoj obitelji na velikoj podršci i razumijevanju.

SAŽETAK

Kitozan, linearni polisaharid koji se može dobiti djelomičnom deacetilacijom prirodnog polimera hitina, odlikuje se izuzetnim fizikalno-kemijskim svojstvima poput biorazgradljivosti i biokompatibilnosti. Osim proučavanja keliranja s metalnim ionima do danas je mali broj istraživanja proveden s ciljem povezivanja kitozana s drugim komponentama. Cilj ovoga rada je priprava kompozitnih mikrosfera na temelju kitozana, Cu^{2+} iona i bioaktivnog stakla metodom elektroštrcanja. Pretražnim optičkim fluorescentnim i pretražnim elektronskim mikroskopom, rendgenskom analizom i infracrvenom spektroskopijom ispitan je utjecaj različitog udjela bakrovih (II) iona i bioaktivnog stakla na veličinu, oblik, morfologiju te sastav kitozanskih mikrosfera.

Nađeno je da je površina mikrosfera naborana, neporozna i uglavnom sferična za sve uzorke osim za one s najmanjim ispitanim udjelom Cu^{2+} iona. Dodatkom bioaktivnog stakla na površini kompozitnih mikrosfera uočene su izbočine za koje je detekcija atoma SEM-EDS metodom potvrdila da su čestice biostakla. Raspodjela veličina čestica seže od 38 μm do 60 μm i ovisi o sastavu. Povećanjem udjela Cu^{2+} iona i povećanjem udjela bioaktivnog stakla mikrosfere imaju sve uniformniju raspodjelu i interval raspodjele veličine čestica se znatno sužava.

FTIR spektri pokazuju da dodatak metalnog iona dovodi do neznatne razlike u položaju vrpce koje odgovaraju vibracijama O-H i N-H veza, iz čega se zaključuje kako na tim skupinama dolazi do povezivanja kitozana i bakra. Dodatkom bioaktivnog stakla ne uočavaju se značajnije razlike. Difrakcijska slika kitozana ne mijenja se uz Cu^{2+} ione, što potvrđuje stvaranje kompleksa, a pojavljuje se novi difrakcijski maksimum karakterističan za bioaktivno staklo.

Primjenom metode elektroštrcanja uz kontroliranu promjenu udjela bakra i bioaktivnog stakla može se utjecati na morfologiju i raspodjelu veličine kompozitnih mikrosfera na temelju kitozana.

Ključne riječi: kitozan, mikrosfere, bakrovi (II) ioni, bioaktivno staklo, elektroštrcanje

ABSTRACT

Influence of bioactive glass on properties of composite microspheres

Chitosan, a linear polysaccharide that can be obtained by partial deacetylation of the natural polymer chitin, possesses exceptional physicochemical properties, including biodegradability and biocompatibility. Apart from the study of chelation with metal ions, there is a small amount of research based on chitosan's connection to other components. The aim of this work is to prepare composite microspheres based on chitosan, Cu^{2+} ions and bioactive glass using an electrospraying method. The influence of different proportions of copper (II) ions and bioactive glass on the size, shape, morphology and composition of chitosan microspheres was investigated using scanning optical fluorescence and scanning electron microscopy, X-ray analysis and infrared spectroscopy.

The surface of the microspheres is wrinkled, non-porous and mostly spherical for all samples except those with the smallest investigated proportion of Cu^{2+} ions. Upon introducing bioactive glass, noticeable protrusions are observed on the surface of the composite microspheres, which are confirmed by SEM-EDS atomic detection to be bioglass particles. The distribution of particle sizes ranges from 38 μm to 60 μm depending on the composition of each sample. With the increase of Cu^{2+} ion and bioglass content, the microspheres have a more uniform size distribution and the interval of particle size distribution narrows significantly.

FTIR spectra show that the addition of the metal ion leads to a minor difference in the position of the bands corresponding to the O-H and N-H bond vibrations, indicating the interaction between chitosan and copper in these functional groups. Conversely, no significant differences are observed with the addition of bioactive glass. Likewise, the diffraction pattern of chitosan does not change with Cu^{2+} ions, which confirms the formation of a complex, while a new diffraction maximum characteristic for bioactive glass appears.

The morphology and size distribution of composite chitosan-based microspheres obtained by electrospraying method can be controlled with the amount of cupric ions and bioactive glass.

Keywords: chitosan, microspheres, cupric ions, bioactive glass, electrospray

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. MIKROSFERE	2
2.2. METODE PRIPREME MIKROSFERA	3
2.2.1. Metoda elektroštrecanja	4
2.3. KITOZAN	6
2.3.1. Kompleks kitozan i bakar	7
2.4. BIOAKTIVNO STAKLO	8
2.4.1. Kompozitni sustav bioaktivnog stakla i polimera	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. MATERIJALI	10
3.2. PRIPREMA MIKROSFERA	11
3.2.1. Priprema otopina	11
3.2.2. Priprava mikrosfera metodom elektroštrecanja	12
3.3. KARAKTERIZACIJA MIKROSFERA	14
3.3.1. Optička i pretražna elektronska mikroskopija	14
3.3.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom	14
3.3.3. Rendgenska difrakcijska analiza	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1. SEM analiza	16
4.2. SOFM analiza	20
4.3. FTIR analiza	25
4.4. XRD analiza	29
5. ZAKLJUČAK	31
6. POPIS SIMBOLA	32
7. LITERATURA	33

1. UVOD

U posljednje vrijeme mnoga istraživanja usmjerena su na proučavanje mikrosfera pridodajući im raznoliku primjenu u određenim znanstvenim područjima. Zbog karakterističnih svojstava kao što su izuzetno mala veličina i velika specifična površina, mikrosfere pronalaze svoju ulogu u biomedicini, inženjerstvu tkiva i brojnim drugim industrijskim granama, a posebice su značajne kod liječenja bolesti temeljem prijenosa djelatne tvari. Moguće ih je proizvesti različitim tehnikama poput emulgiranja, elektroštrcanja i koacervacije, a odabir pogodne metoda sinteze ovisi o namjeni za koju se proizvode [1].

Zbog niza povoljnih fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava kitozan je vrlo atraktivan materijal za sintezu mikrosfera. Kitozan je biokompatibilan i biorazgradljiv biomaterijal koji nije toksičan i ne izaziva alergijske reakcije [2]. Dobiva se deacetilacijom iz prirodnog polimera hitina, drugog najzastupljenijeg polisaharida na svijetu kojeg se može pronaći u oklopmi rakova, kukaca i micelama gljiva. Kationski je polisaharid čija molekulska težina i stupanj deacetilacije (*DD*, engl. *degree of deacetylation*) određuju fizikalno-kemijska svojstva kao što je topljivost. Kako bi se kitozanu poboljšala stabilnost u kiseloj sredini i vodenom okruženju koriste se kompleksi kitozana s prijelaznim metalnim ionima poput bakra i cinka [3].

Jedan od načina poboljšanja svojstava kitozana je modifikacija dodatkom punila poput bioaktivnog stakla i biokeramike. Na taj način dobiva se čvršći i bioaktivniji kompozitni materijal s dodatnim primjenskim svojstvima. U usporedbi s biokeramikom, bioaktivno staklo ima kratku povijest primjene, a obilježava ga amorfnu strukturu na bazi silikata. Kompatibilan je s ljudskim tijelom gdje se veže za kosti i može stimulirati rast nove, to jest omogućuje regeneraciju i nastanak novog koštanog tkiva dok se on sam razgrađuje s vremenom [4]. Struktura biostakla i njene modulacije uz dopiranje terapijskim ionima poput bakra aktualna su tema mnogih znanstvenih istraživanja.

Ovaj rad temelji se na pripremi kitozanskih mikrosfera uz dodatak različitog udjela Cu^{2+} iona i bioaktivnog stakla te proučavanju svojstava s obzirom na udjele dodanih komponenata. Korištena tehnika dobivanja je elektroštrcanje, a karakterizacija je provedena optičkim inverznim fluorescentnim mikroskopom, pretražnom elektronskom mikroskopijom, infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom i rendgenskom difrakcijskom analizom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MIKROSFERE

Mikrosfere su čestice sferičnog oblika čiji promjer seže od 1 do 1000 μm , a ne rijetko se u literaturi poistovjećuju s pojmom mikročestica [5]. Međutim, općenito mikročestice obuhvaćaju više različitih struktura mikrometarskih veličina, a ovisno o načinu raspodjele aktivne komponente u odnosu na maticu, razlikuju se još i mikrokapsule. Karakteristika svojstvena mikrosferama podrazumijeva otapanje ili suspendiranje djelatne tvari, dok se ona kod mikrokapsula nalazi u jezgri obavijenoj membranom [6].

Osnova za izradu mikrosfera mogu biti različiti materijali, bilo da se radi o onima sintetskog ili prirodnog porijekla, pri čemu su danas tržišno dostupne one uglavnom građene od keramike, polimera ili stakla. Kada je riječ o polimernim mikrosferama dvije najčešće sintetske vrste su polietilenske, koje se koriste kao privremeno ili trajno punilo u materijalima poput keramike gdje sa svojom nižom temperaturom taljenja stvaraju poroznu strukturu, te polistirenske, čija je primjena u području biomedicine usredotočena na selektivno djelovanje na različite vrste stanica [7]. S druge strane, prirodni polimeri pružaju biokompatibilnost i biorazgradljivost što je dovelo do interesa brojnih istraživača u različitim područjima. Dodatno, dobivanje velikih količina iz obnovljivih izvora omogućuje nisku cijenu i široku dostupnost prirodnih materijala. Iako ih postoji mnoštvo, kitozan je jedan od značajnijih prirodnih polimera za izradu mikrosfera, a u tablici 1. prikazana su njihova svojstva [1].

Tablica 1. Svojstva polimernih mikrosfera i njihova pojašnjenja [1]:

SVOJSTVO	OBJAŠNJENJE
mala veličina i volumen	raspodjela; mali volumen omogućava brzo djelovanje na podražaj
velika specifična površina	mjerne jedinice cm^2/g , obrnuto proporcionalna masi, a važna za procese adsorpcije/desorpcije, kemijske reakcije i raspršenje svjetlosti
sposobnost difuzije u koloidnim sustavima	niska viskoznost polimernog koloida u kojemu se makroskopski mikrosfere gibaju pod utjecajem električnog polja ili sile teže, a mikroskopski Brownovim gibanjem
stabilna disperzija	otežano odvajanja mikrosfera od disperznog medija zbog čega je ponekad centrifugiranje beskorisno pa se poseže za magnetskim ili električnim poljem

Kitozanske mikrosfere vrlo su važne zbog raznolike primjene koja uključuje obradu otpadnih voda uklanjanjem teških metala, regeneraciju tkiva posebice hrskavičnog i koštanog, služe kao pojačavao okusa u prehrambenoj industriji te svojim antimikrobnim djelovanjem štite usjeve od bakterija i gljivica u poljoprivredi [3]. Osim već nabrojanog, posebno su učinkovite na polju biomedicine gdje imaju snažan utjecaj na pretklinički i klinički razvoj lijeka. Naime, njihova je primjena temeljena na kontroliranoj i ciljanoj isporuci djelatne tvari pri čemu se traženi lijek oslobađa difuzijom iz polimerne matice ili njenom razgradnjom, a prednosti korištenju su [8]:

- kontinuirano i produženo djelovanje koje smanjuje potrebu za učestalim dozama
- pogodne veličine i oblici za umetanje u tijelo gutanjem ili injektiranjem
- poboljšanje biokompatibilnosti i bioaktivnosti

Potencijal za upotrebu kitozanskih mikrosfera postoji u raznim liječenjima poput terapije karcinoma na jetri, mozgu i drugim organima koja ovise o isporuci visoke koncentracije gadolinija te njegovom zadržavanju u tumoru radi hvatanja neutrona iz zračenja [2].

2.2. METODE PRIPREME MIKROSFERA

Mikrosfere se mogu proizvesti različitim tehnikama što omogućava golemu raznolikost u kvaliteti, morfologiji i sferičnosti, kao i raspodjeli veličina i ujednačenosti čestica [7]. U konačnici izbor metode pripreme ovisi o zahtjevima koji su određeni samom namjenom. Kod izrade mikrosfera za isporuku lijekova priprema se mora prilagoditi prirodi polimera, aktivnoj tvari i potrebnom vremenu djelovanja [9].

Načini pripreme mogu biti kemijski ili fizikalno-kemijski [7,8,10]:

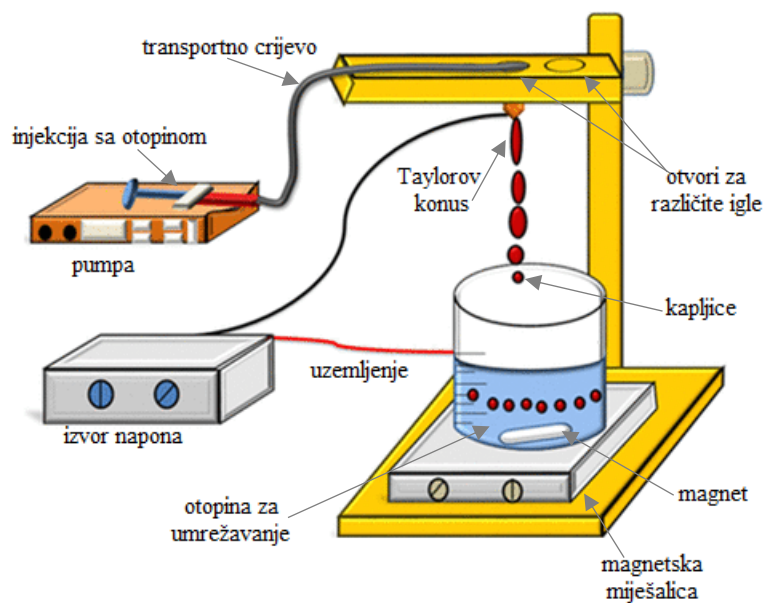
- polimerizacijom monomera
- isparavanjem otapala
- sušenje raspršivanjem
- odjeljivanjem faza iz vodenih i nevodnih medija – koacervacijom
- emulzijskom metodom
- elektroštrcanjem i slično

Rad se temelji na metodi elektroštrcanja zbog čega će ona opsežnije biti opisana u nastavku.

2.2.1. Metoda elektroštrcanja

Iako se za dobivanje polimernih mikročestica u većini slučajeva koriste metode poput koacervacije, emulgiranja i sušenja raspršivanjem, one posjeduju određene nedostatke kao što su niska sposobnost stvaranja čestica mikrometarskih veličina, polidisperznost te mogućnost degradacije i inaktivacije ugrađenog lijeka zbog izlaganja visokim temperaturama, organskim otapalima ili smičnim naprezanjima. Takvi negativni učinci konvencionalnih tehnika mogu se zaobići korištenjem elektroštrcanja, poznatog još pod nazivima elektrosprejanje ili elektrohidrodinamička atomizacija (EHDA, engl. *electrohydrodynamic atomization*) [11]. Dodatne prednosti EHDA su jednostavnost, ponovljivost, mogućnost korištenja polimera velike molekulske mase, ekonomičnost procesa te pogodna morfologija dobivenih čestica [3].

Aparatura se sastoji od pumpe, injekcije s otopinom, metalne igle, kolektora i napajanja kao izvora visokog napona čiji je način povezivanja u cjelinu prikazan na slici 1.



Slika 1. Prikaz aparature za metodu elektroštrcanja [12].

Proces izrade mikrosfera ovim načinom odvija se u tri faze [3,13]:

1. Protjecanje polimerne otopine uzorka zadanim protokom kroz transportno crijevo i iglu ravnog vrha spojenu na visoki napon na kojoj dolazi do stvaranja stožastog mlaza poznatijeg kao Taylorov konus. Ova pojava rezultat je ravnoteže različitih sila uključujući površinsku napetost, gravitaciju te električna i viskozna naprezanja.

2. Mlaz prelazi u kapljice koje se dalje raspadaju na još manje veličine, u konačnici čineći mikročestice. Naime, djelovanje električnog polja na sustav dovodi do stvaranja nabijenih kapljica kojima vlada elektrostatska ili Coulombova sila. U trenutku kada ona nadvlada kohezijsku silu same kapi, to jest kada se suprotstavi njenoj površinskoj napetosti, dolazi do navedenog raspada kapi na manje kapljice.
3. Rezultirajuće kapljice uske su raspodjele veličina i ne spajaju se za vrijeme putovanja prema kolektoru zbog Coulombovog odbijanja naboja.

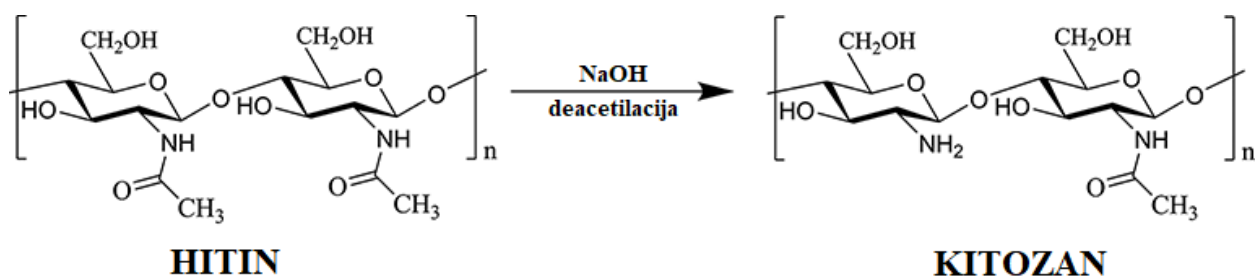
Kako bi se dobile čestice željene veličine i raspodjele potrebno je uzeti u obzir parametre koji utječu na provedbu same metode. Među bitnim varijablama su brzina protoka otopine, primijenjeni napon, udaljenost kolektora, viskoznost otopina te molekulska masa i koncentracija polimera. Utjecaj parametara na ponašanje sustava i dobivanje čestica prikazan je u tablici 2 [12].

Tablica 2. Utjecaj parametara sustava metode elektroštrcanja na veličinu čestica [12]:

PARAMETAR SUSTAVA	POVEĆANJE PARAMETRA	SMANJENJE PARAMETRA
električni potencijal	optimalan raspon od 10 do 20 kV; veći iznosi uvode nestabilnost Taylorovog stošca	nema formiranja Taylorovog stošca
brzina protoka	veće čestice zbog manjeg isparavanja otapala	idealno za mikro- i nano- čestice
udaljenost kolektora	veće isparavanje otapala i pogodno za male čestice	ukoliko je veća električna vodljivost rezultirat će manjim česticama
viskoznost	javlja se pri većoj koncentraciji polimera, a daje veće čestice	javlja se povećanjem brzine protoka i napona, a daje male čestice
površinska napetost	veće čestice	fisija kapljica što dovodi do malih veličina

2.3. KITOZAN

Hitin je linearni polisaharid, biopolimer sastavljen od niza jedinica N-acetil-D-glukozamina međusobno povezanih $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidnim vezama. Dobiva se ekstrakcijom iz rakova, školjki, škampi i micela gljiva, a karakterističan je po svojoj tvrdoći, netopljivosti i fleksibilnosti zbog čega mu je otežana primjena. Djelomičnom ili potpunom deacetilacijom hitina prevodi se u derivat poznatiji kao kitozan (CHT, engl. *chitosan*), koji ima bolju topljivost, a samim time i lakšu primjenu. Ukoliko se radi o djelomičnom procesu, prikazanom na slici 2., kitozan se može klasificirati kao kopolimer koji sadrži acetilirane jedinice N-acetil-D-glukozamina i deacetilirane jedinice glukozamina povezane $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidnim vezama. Monomerni dijelovi mogu biti raspoređeni nasumično ili u blokovima što doprinosi krutoj i neravnomjernoj strukturi. Glavna razlika između hitina i kitozana je udio amino skupina zbog čega imaju različita fizikalno-kemijska svojstva koja su u korelaciji s njihovim kemijskim ponašanjem i biološkim funkcijama. Općenito, kada je sadržaj N-acetilnih skupina veći od 50 % riječ je o kitozanu dok se niže vrijednosti odnose na hitin [14].



Slika 2. Dobivanje kitozana iz hitina procesom deacetilacije [14].

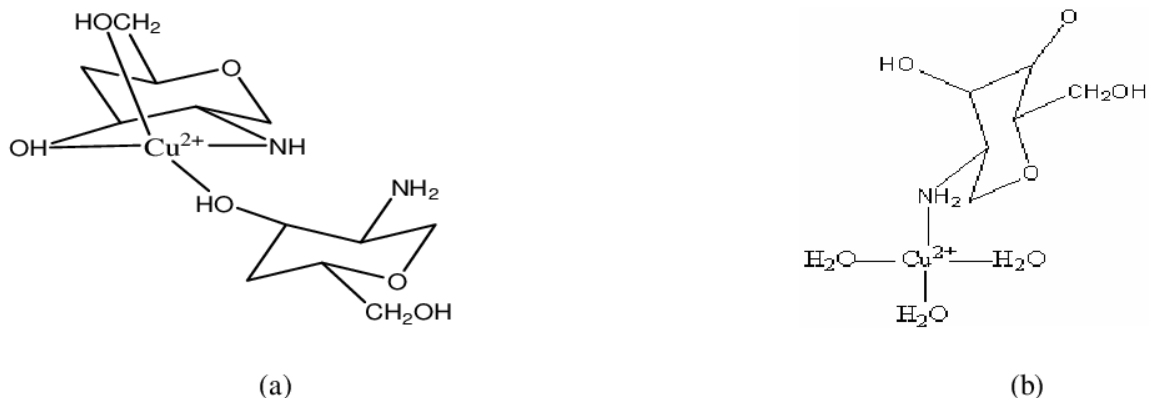
Biokompatibilnost, biorazgradljivost i netoksičnost čine kitozan pogodnim za primjenu u medicini, a zbog svoje topljivosti u kiselom vodenom mediju nalazi primjenu i na industrijskoj razini. Inače se ponaša kao slaba baza netopljiva u vodi i organskim otapalima dok se u prisutnosti razrijeđenih kiselina ($\text{pH} < 6,5$) jedinice glukozamina pretvaraju u topljivi oblik R-NH_3^+ [15]. Njegovo fizičko svojstvo topljivost ovisi o stupnju deacetilacije, molekularnoj masi i raspodjeli N-acetilne te amino skupine po dužini lanca. Dodatno antimikrobno djelovanje posjeduje kada su amino skupine u kationskom obliku što znači da je navedena aktivnost veća pri nižim pH vrijednostima [14].

2.3.1. Kompleks kitozan i bakar

Kao rezultat svojih protoniranih amino skupina ($-\text{NH}_2$) u kiselom mediju, kitozan je polikationska makromolekula visoke gustoće naboja. Nastale $-\text{NH}_3^+$ skupine osiguravaju prisutnost pozitivnog naboja zbog čega je omogućeno stvaranje kompleksa s drugim polimerima ukupnog negativnog naboja ili s anionskim spojevima. Ujedno, veliki sadržaj amino i hidroksilnih skupina može dovesti do kompleksa s prijelaznim metalnim ionima poput bakrovih kationa (Cu^{2+}) zahvaljujući atomima dušika i kisika, to jest njihovim elektronskim parovima. Ovisno o vrsti metala i pH otopine povezuju se različitim mehanizmima kao što su elektrostatsko privlačenje i keliranje [3].

Interakcija kitozana s Cu^{2+} ionima može se klasificirati u dvije skupine vidljive na slici 3 [16]:

- model mosta
- model privjeska



Slika 3. Struktura kitozan-bakar (II): a) model mosta i b) model privjeska [16].

U modelu mosta metalni ion vezan je s dvije ili više amino skupine iz istog ili različitog lanca preko intra- ili intermolekularnog kompleksiranja dok je u modelu privjeska vezan za jednu amino skupinu [3,16].

Bakrovi ioni terapijskog su značaja u regulaciji fizioloških puteva, antibakterijskih su svojstava i potencijalna im je primjena u regeneraciji tkiva. Kombinacija s kitozanskim mikrosferama stvara višenamjenske nosače i sustave isporuke [10].

2.4. BIOAKTIVNO STAKLO

Bioaktivno staklo (BG, engl. *bioactive glass*) je čvrst, neporozan i tvrd materijal čija je glavna komponenta silicijev dioksid uz različiti sadržaj natrijevog oksida, kalcijevog oksida i fosfora. Ovisno o udjelima navedenih osnovnih spojeva moguće je izraditi bioaktivno staklo različitog sastava što posljedično uvjetuje primjenu [17]. Općenito, ono pripada skupini površinski reaktivnih staklo-keramičkih biomaterijala te ima izvrsnu sposobnost povezivanja s koštanim tkivom što ga čini pogodnim u inženjerstvu tkiva, regenerativnoj i dentalnoj medicini. Biokompatibilnost BG-a temelji se na silikatnom dijelu stakla te omogućuje brzo spajanje za kost kada staklo sadrži 45-53 % silicija. Vezanje traje čak od dva do četiri tjedna ukoliko sadrži 54-60 %, dok za količine veće od 60 % silicija nema izravne veze. S druge strane, amorfnost struktura samoga stakla povećava njegovu bioaktivnost, ali smanjuje mehaničku čvrstoću i otpornost na lom [18].

Bioaktivna stakla se zbog zadovoljavanja zahtjeva poput biokompatibilnosti, osteokonduktivnosti i kontrolirane brzine razgradnje u kontekstu tkivnog inženjerstva klasificiraju kao nositelji lijekova, to jest biomolekula. Iako se i polimerni materijali koriste kao nosači sa sličnim svojstvima, njima nedostaje potrebna osteokonduktivnosti i krutosti, premda pružaju veću fleksibilnost i lakšu mogućnost obrade. Prilikom odabira pravih materijala potrebno je uzeti u obzir dosta kriterija, a istraživanja se sve više zasnivaju na kompozitnim sustavima koji kombiniraju prednosti bioaktivnih stakala i polimera [19].

2.4.1. Kompozitni sustav bioaktivnog stakla i polimera

Cilj stvaranja kompozita je sintetizirati materijal različit po svojstvima od onih koji ga sačinjavaju. Ovdje se primarno odnosi na poboljšanje čvrstoće i bioaktivnosti koju daje anorganska komponenta uz zadržavanje fleksibilnosti polimera. Biostaklo dodatno može usporiti razgradnju polimera otpuštanjem iona alkalijskih metala koji smanjuju kiseli pH. Obzirom na to, stupanj razgradnje ovisi o udjelu biostakla u kompozitu.

Međutim, određene studije ukazuju na stvaranje jake kovalentne veze između polimera i biostakla što uzrokuje degradaciju kompozita, a treba napomenuti i povećano bubrenje čineći kompozit hidrofilnijim [20].

S ciljem povećanja interakcija između komponenti u kompozitu razvijaju se čestice velikih specifičnih površina i malih veličina, a uvođenje punila doprinosi poboljšanju svojstava matice. Prema dosadašnjem istraživanju kompozitni sustavi bioaktivno staklo/polimer mogu se podijeliti u sljedeće skupine [20]:

- spužvaste strukture
- vlaknasti kompoziti
- mikrosferni nosači
- dvoslojni ili višeslojni nosači
- nosači sa stanicama

Mogu se koristiti sintetički ili prirodni polimeri poput poli(vinil-alkohol)a, poliuretana i kitozana uz davanje prednosti biopolimerima zbog njihove biorazgradnje.

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Priprema kompozitnih mikrosfera u ovom radu temelji se na dvije osnovne komponente, kitozanu i bioaktivnom staklu:

- kitozan medicinske čistoće, $(C_6H_{11}NO_4)_n$; (DD = 85 %; CHT85/100, HMC+)
- Biostaklo 45S5, prah; Schott Vitryxx MD01, $d_{50} = 4,0 \pm 1,0 \mu m$, $d_{95} \leq 20 \mu m$ (SiO₂ 45 mas.%, CaO 24,5 mas.%, Na₂O 24,5 mas.%, P₂O₅ 6 mas.%)

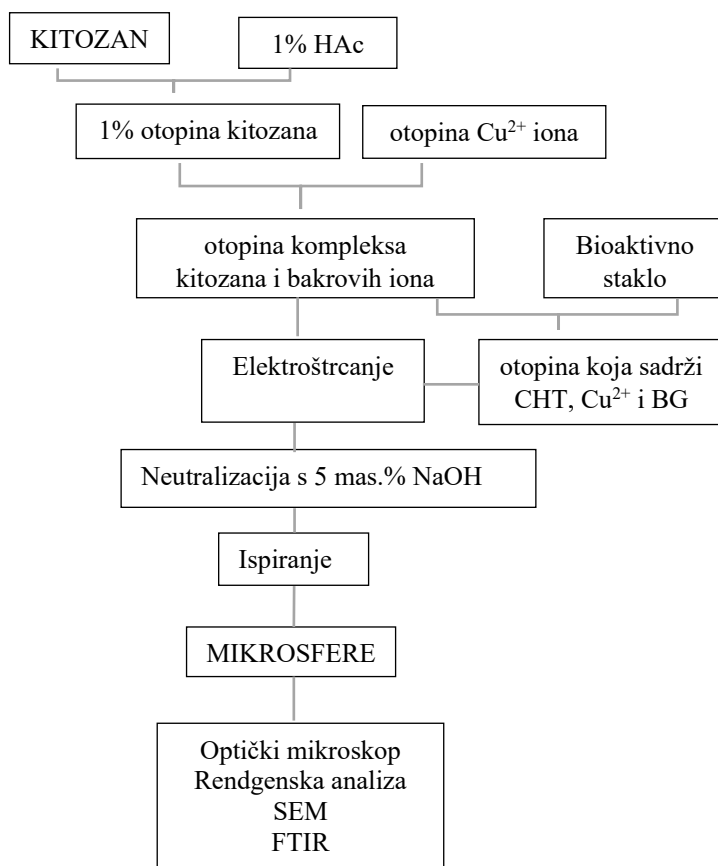
Ostale kemikalije koje se koriste su:

- octena kiselina, CH₃COOH; (HAc \geq 99,8 vol.%, Lach-Ner s.r.o.)
- bakrov (II) acetat monohidrat, Cu(CH₃COO)₂ x H₂O; (98+%, BDH Prolabo)
- natrijev hidroksid, NaOH; (min. 99,0%, Gram-Mol d.o.o.)
- etanol, C₂H₆O; (96%, KEFO d.o.o.)
- aceton, C₃H₆O; (\geq 99,5%, Honeywell)

Svi reagensi odgovaraju analitičkom stupnju čistoće.

3.2. PRIPREMA MIKROSFERA

Tijek pripreme polimernih kitozanskih mikrosfera bez i uz dodatak bioaktivnog stakla te u konačnici njihova karakterizacija prikazani su shemom na slici 4.



Slika 4. Shematski prikaz tijeka pripreme i analize mikrosfera.

3.2.1. Priprema otopina

Otopina kitozana 1 mas. % koncentracije priprema se otapanjem polimernog praha u 1 % otopini octene kiseline miješanjem na magnetskoj miješalici pri sobnim uvjetima. Nakon čega se filtrira radi uklanjanja zaostalih neotopljenih dijelova ili nečistoća.

Otopina Cu²⁺ iona priprema se u različitim koncentracijama, a na poslijetku se dodaje već opisanoj profiltriranoj otopini kitozana u svrhu stvaranja kompleksa CHT i metalnog iona. Kako bi se ostvarila potpuna homogenost sustava, njihovo miješanje odvija se u razdoblju od 24 sata. Količina Cu²⁺ iona koja se upotrebljava, zadovoljava množinski omjer metalnog iona i amino skupina u kitozanu : $n(\text{Me}^{2+}) : n(-\text{NH}_2)$.

U konačnici, dio mikrosfera se proizvodi iz otopina kitozana s različitim udjelima bakrovih iona, a dio iz istih otopina u koje je dodatno umiješano bioaktivno staklo u različitim masenim udjelima. Sastav polaznih otopina za elektroštrcanje dan je u tablici 3.

Tablica 3. Otopine pripremljene u svrhu izrade mikrosfera:

SASTAV OTOPINE				
CHT- <i>n</i> Cu		CHT- <i>n</i> Cu- <i>w</i> BG		
	$n(-NH_2):n(Me^{2+})$		$n(-NH_2):n(Me^{2+})$	$m(BG)/(m(BG)+m(CHT))$
CHT-2,5Cu	0,0458	CHT-2,5Cu-10BG	0,0458	0,10
CHT-5Cu	0,0916	CHT-5Cu-5BG	0,0916	0,05
		CHT-5Cu-10BG	0,0916	0,10
		CHT-5Cu-15BG	0,0916	0,15
CHT-10Cu	0,1832	CHT-10Cu-10BG	0,1832	0,10

Posljednje se priprema 5 mas.% otopina natrijevog hidroksida, koji se lako otapa uz oslobađanje topline, a otopina služi za neutralizaciju, odnosno kao medij za geliranje u kolektoru.

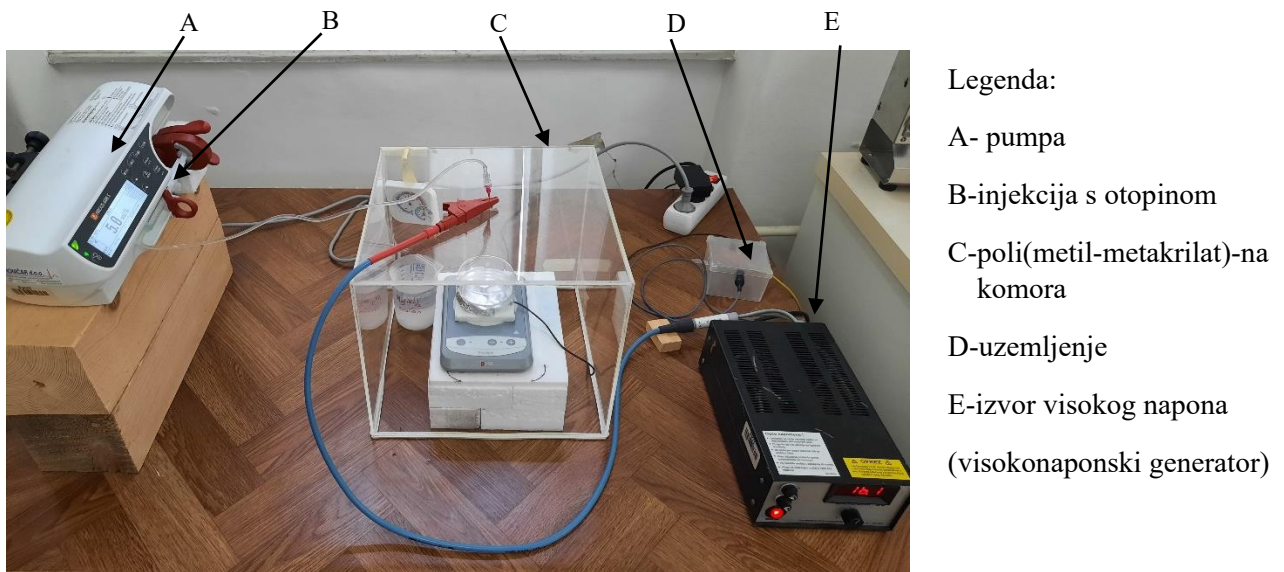
3.2.2. Priprava mikrosfera metodom elektroštrcanja

Aparatura koja se koristi za izradu mikrosfera slaže se kako je prikazano na slici 5.1. i slici 5.2., dok se eksperimentalni parametri koje je potrebno bilježiti nalaze u tablici 4.

Na samom početku kolektor se napuni s 50 mL 5 mas.% otopine NaOH, a injekcija (10 mL, Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France) s 10 mL jedne od pripremljenih otopina iz tablice 3. Kolektor predstavlja uzemljena staklena posuda postavljena na aluminijsku foliju dok je na crijevo injekcije spojena igla s tupim vrhom. Udaljenost igle i otopine natrijevog hidroksida je 10 cm. Nakon njihova postavljanja na pripadajuća mjesta u aparaturi prate se relativna vlažnost i temperatura u komori poznatih dimenzija 30 cm / 30 cm / 25 cm (dužina/širina/visina). Protok polimerne otopine namjesti se na pumpi u iznosu od 5 ml/h, upali izvor visokog napona te započne s procesom elektroštrcanja.

Igla je pozitivno nabijena naponom koji se korigira ovisno o vrijednosti na kojoj dolazi do formiranja stabilnog Taylorovog konusa, a uočeno je kako se stabilnost postiže naponom oko

17,3 kV. Metoda se provodi 2 h tijekom kojeg se mikrosfere skupljaju u kolektoru, a stvaranje agregata onemogućuje kontinuiranim miješanjem medija za geliranje. Početnih 30 min služi za stabilizaciju cjelokupnog sustava pa se mikrosfere dobivene u tom vremenu odvajaju od ostatka. Kako bi došlo do njihova taloženja, one se skupa s otopinom NaOH ostavljaju u epruvetama sljedeća 24 h. A po završetku, mikrosfere se ispiru po tri puta s destiliranom vodom, etanolom i acetonom nakon kojeg se ostavljaju otvorene u sobnim uvjetima zbog njihova sušenja.



Legenda:

A- pumpa

B-injekcija s otopinom

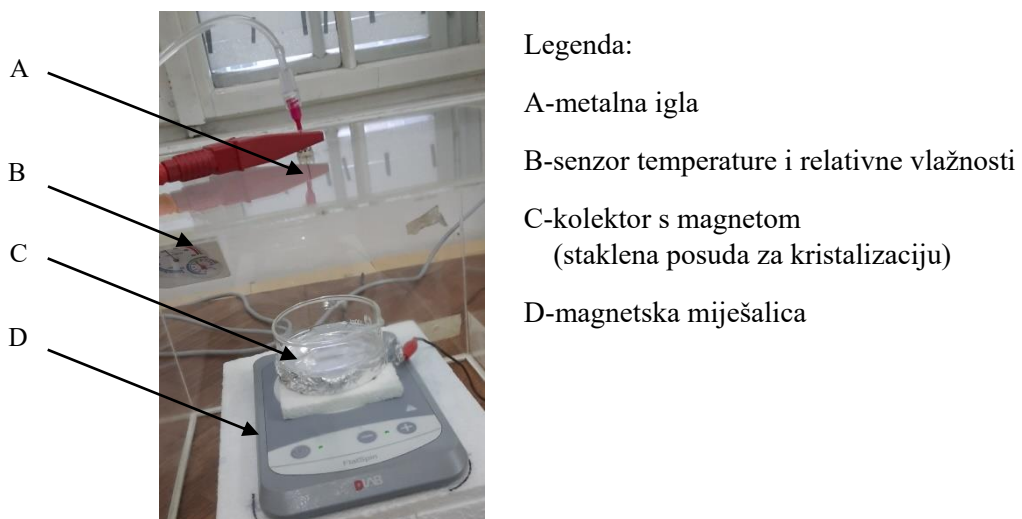
C-poli(metil-metakrilat)-na komora

D-uzemljenje

E-izvor visokog napona

(visokonaponski generator)

Slika 5.1. Aparatura za pripremu mikrosfera metodom elektroštrcanja.



Legenda:

A-metalna igla

B-senzor temperature i relativne vlažnosti

C-kolektor s magnetom
(staklena posuda za kristalizaciju)

D-magnetska miješalica

Slika 5.2. Prikaz dijela aparature u komori za pripremu mikrosfera metodom elektroštrcanja.

Tablica 4. Eksperimentalni parametri metode elektroštrcanja:

PARAMETAR	IZNOS	MJERNA JEDINICA
promjer igle	25	G
protok otopine	5	mL/h
udaljenost vrha igle i površine NaOH u kolektoru	10	cm
temperatura	26±1	°C
relativna vlažnost	52±10	%
napon	17,3±2,8	kV
vrijeme	80	min

3.3. KARAKTERIZACIJA MIKROSFERA

3.3.1. Optička i pretražna elektronska mikroskopija

Karakterizacija mokrih i suhih mikrosfera provodi se pretražnim optičkim fluorescentnim mikroskopom (SOFM, engl. *scanning optical fluorescence microscope*; Olympus IX3 opremljen kamerom Hamamatsu ORCA-Flash 4.0 i softverom za analizu slike) pomoću kojeg se iz površine objekata na snimljenim mikrografima dobiva uvid u promjer i raspodjelu veličina čestica. Pretražni elektronski mikroskop (SEM, engl. *scanning electron microscope*; Tescan Vega III Easyprobe) znatno nadmašuje razlučivost optičkog mikroskopa. SEM omogućuje visokorezolucijski prikaz površine uzroka što je dovoljno za istraživanje mikrostrukture, a koriste se suhe mikrosfere prethodno izložene plazmi paladija i zlata.

3.3.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR, engl. *Fourier transform infrared spectroscopy*; Bruker Vertex 70, Bruker Optics) metoda je za identifikaciju spojeva pri čemu se provodi kvalitativna analiza uzoraka suhih mikrosfera. Tehnika mjerenja je prigušenom totalnom refleksijom (ATR, engl. *Attenuated Total Reflectance*) u mjernom području od 4000 cm⁻¹ do 400 cm⁻¹ uz 32 snimanja.

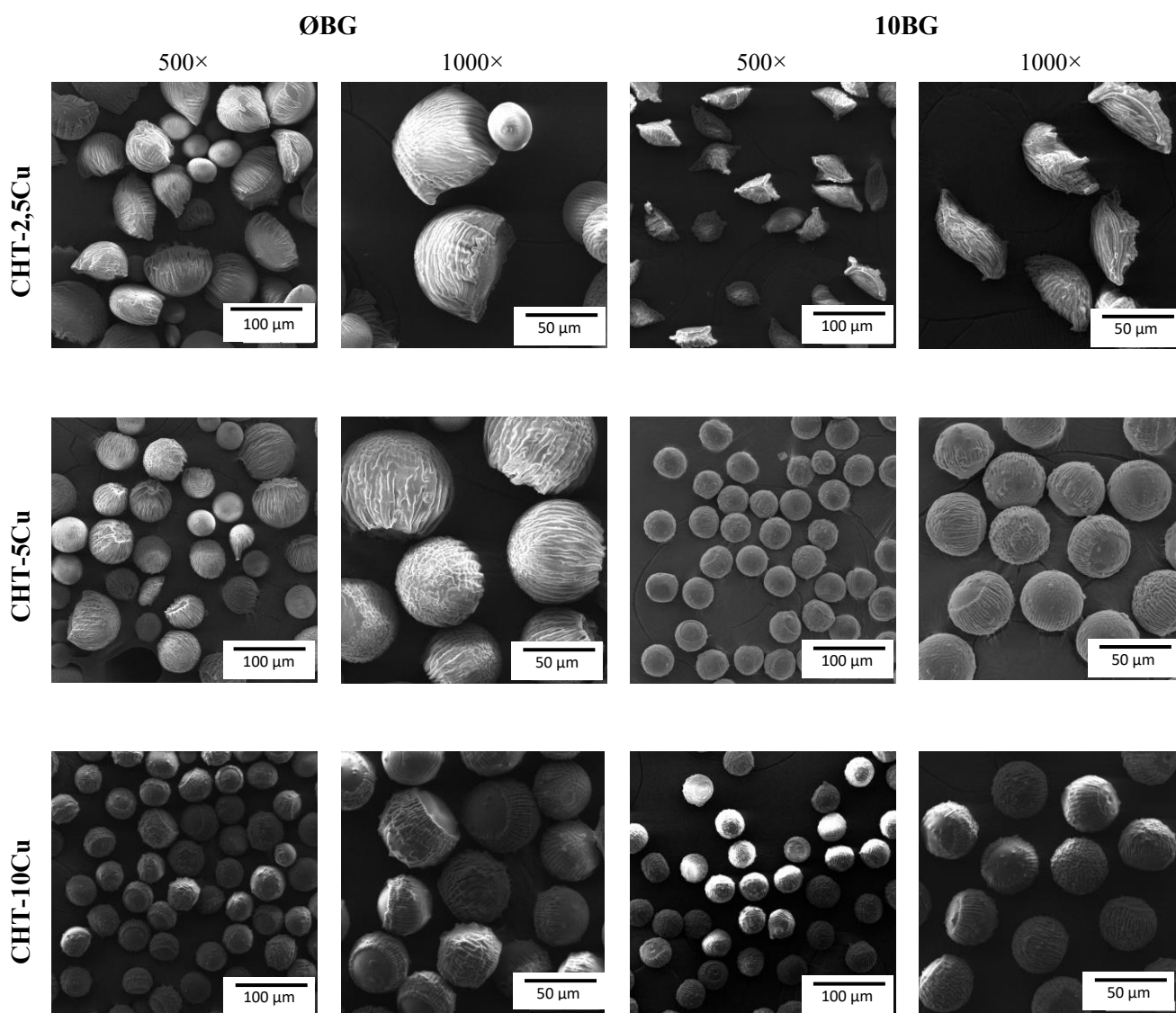
3.3.3. Rendgenska difrakcijska analiza

Difrakcijskom rendgenskom analizom (XRD, engl. *X-ray powder diffraction*) ispituje se kristalnost i sastav uzoraka. XRD analiza provedena je na instrumentu XRD Shimadzu 6000 s Bragg-Brenatano geometrijom i $\text{CuK}\alpha$ izvorom rendgenskog zračenja. Snimanje je obavljeno u području difrakcijskih kuteva od 5 do 70 °s 2θ korakom od 0,02 ° 0,6 s⁻¹.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. SEM analiza

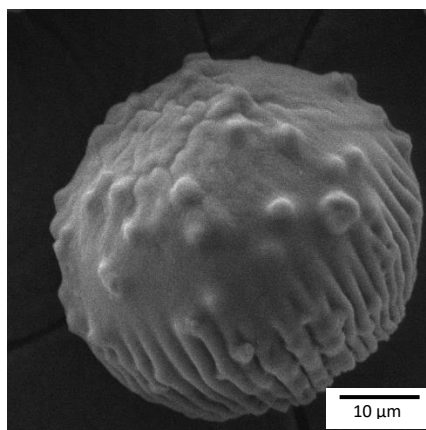
Pretražni elektronski mikroskop omogućuje morfološku karakterizaciju površine uzorka, a uz pomoć energetske disperzivne spektroskopije (EDS, engl. *Energy-Dispersive Spectrometry*) daje uvid u elementarnu analizu površine uzorka. Slika 6. prikazuje mikrografije pripremljenih suhih mikrosfera dobivenih iz otopina navedenih u tablici 3.



Slika 6. SEM mikrografije mikrosfera različitog sastava (s i bez bioaktivnog stakla) pri uvećanju od 500× čija skala odgovara 100 μm i 1000× sa skalom od 50 μm.

Uočava se promjena oblika mikrosfera ovisno o udjelu Cu^{2+} iona i bioaktivnog stakla. Mikrografi sustava CHT-5Cu, CHT-5Cu-10BG, CHT-10Cu i CHT-10Cu-10BG pokazuju da su mikrosfere pretežito sferične, naborane i neporozne površine. Dok su CHT-2,5Cu i CHT-2,5Cu-10BG, mikrosfere s najmanjim udjelom bakra, nepravilne i odstupaju od kružnog oblika te ih odlikuje naboranost i neporoznost.

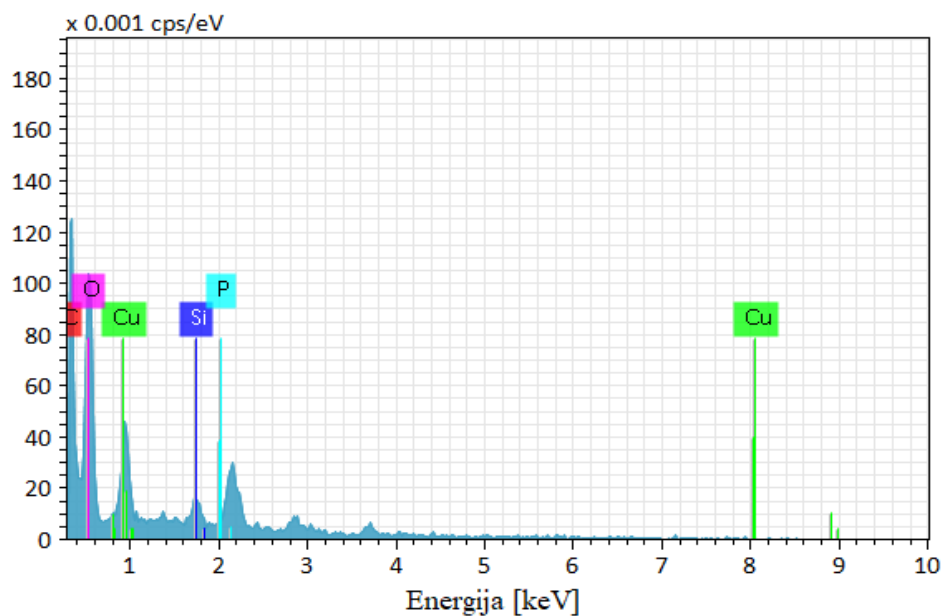
Slično kao kod Jayanudin i suradnika [21] na određenim uzorcima lokalno su prisutne grudice. Prema njihovom istraživanju kitozanske mikrosfere proizvedene emulzijskom metodom posjeduju izrasline kao posljedicu neravnomjernog umreživanja slojeva kitozana sa sredstvom za umreživanje. Dodatno, u ovom radu na površinsku morfologiju utječe i dodatak bioaktivnog stakla s česticama veličine oko 4 μm , vidljivih na mikrografijama uzoraka s BG čiji je primjer prikazan na slici 7.



Slika 7. Primjer mikrosfere s izraženim česticama biostakla na površini pri uvećanju od 4000 \times te skali od 10 μm .

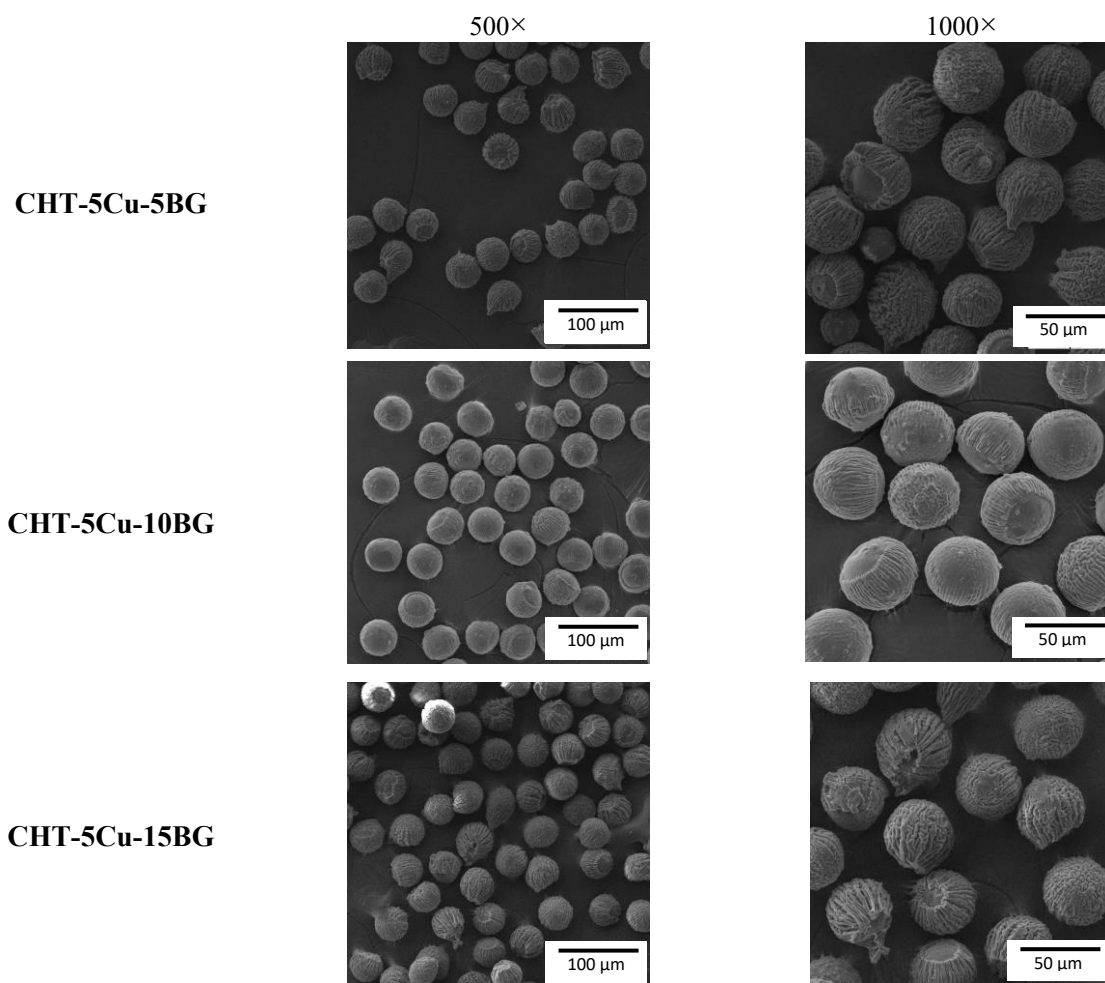
Nadalje, Peng i suradnici [22] primijetili su da tretiranje čistim acetonom dovodi do mikrosfera naborane površine. Navedena pojava rezultat je skupljanja polimernih kuglica zbog brzog isparavanja acetona koji je prethodno apsorbirao u mikrosfere za vrijeme njihova pranja. Pranje i sušenje bitni su procesi koji utječu na morfologiju, a kao što je već navedeno uz vodu i etanol ovdje je korišten i aceton koji prema autorima potencijalno stvara nabore vidljive na mikrografijama. Ukoliko se takav način sušenja zamijeni liofilizacijom, mikrosfere bi bile porozne strukture. Međutim, Lončarević i suradnici [3] u ovisnost dovode naboranost i koncentraciju metalnih iona. Njihovim proučavanjem uz povećanje udjela Cu^{2+} iona, površina kitozanskih mikrosfera od hrapave postala je glatka. Unutar ovog rada nije vidljiv utjecaj koncentracije bakrovih iona na morfologiju obzirom da SEM snimke uzorka pri najvišem udjelu od CHT-10Cu isto tako sadrže izražene nabore.

SEM-EDS analiza omogućuje detekciju elemenata sadržanih u mikrosferama. Za uzorke bez bioaktivnog stakla kvantificirani su udjeli kisika i bakra. Na temelju njihovog omjera pretpostavlja se kako povećanje pronađenog bakra odgovara povećanju njegovog udjela u uzorku. Identificirani atomski postotak nije nužno proporcionalnog porasta ovisno o dodanom bakru, ali je sve veći i za mirkosfere CHT-2,5Cu, CHT-5Cu, CHT-10Cu redom iznosi 4,25 %, 5,79 % i 8,02 %. Preostali dio omjera odgovara kisiku iz kitozana. Primjer EDS spektra za mikrosferu s bioaktivnim staklom CHT-10Cu-10BG prikazan je na slici 8. Uz kisik i bakar dodatno su ustanovljeni atomi fosfora i silicija karakteristični za biostaklo, dok su paladij i zlato napareni na površinu izuzeti iz označavanja.



Slika 8. EDS spektar detektiranih atoma unutar uzorka mikrosfere CHT-10Cu-10BG.

Slika 9. prikazuje mikrografije CHT-5Cu-5BG, CHT-5Cu-10BG i CHT-5Cu-15BG sfera, koje sadrže jednak udio bakra i različiti udio biostakla. Isti uzorci podvrgnuti su i detekciji atoma povezanih sa staklom.



Slika 9. SEM mikrografije mikrosfera jednakog udjela bakra, a različitog bioaktivnog stakla pri uvećanju od 500× i 1000×.

CHT-5Cu-5BG sadrži 0,26 % atoma Si te 1,09 % atoma P. Sljedeći uzorak, CHT-5Cu-10BG sadrži više atoma karakterističnih za biostaklo – silicija 0,37-0,91 %, a fosfora 1,44-1,81 %. Rasponi su dobiveni temeljem nekoliko analiza iz kojih se zaključuje kako atomski postotci ovise o dijelu proučavane površine i ne mogu se kvantificirati za cijeli uzorak. Nadalje, potvrđena je nehomogena raspodjela BG, odnosno lokaliziran položaj čestica stakla inicijalne veličine 4 µm.

Odabir dijela površine mikrosfere ima veliki utjecaj na rezultate EDS metode. Prilikom analize elementarnog sastava površine uzorka CHT-5Cu-10BG na jednom od provedenih ispitivanja dogodilo se da atomi silicija uopće nisu detektirani. Pretpostavlja se da bi CHT-5Cu-15BG uspješnom identifikacijom sadržavao najviše postotaka atoma koji su povezani s bioaktivnim staklom. Na odabranim dijelovima površine prilikom provedenih analiza za uzorak CHT-5Cu-15BG udio Si je 0,23-0,24 % i P je 0,18-0,74 %, što je manje od udjela detektiranih kod uzorka CHT-5-Cu-5BG i CHT-5-Cu-10BG.

4.2. SOFM analiza

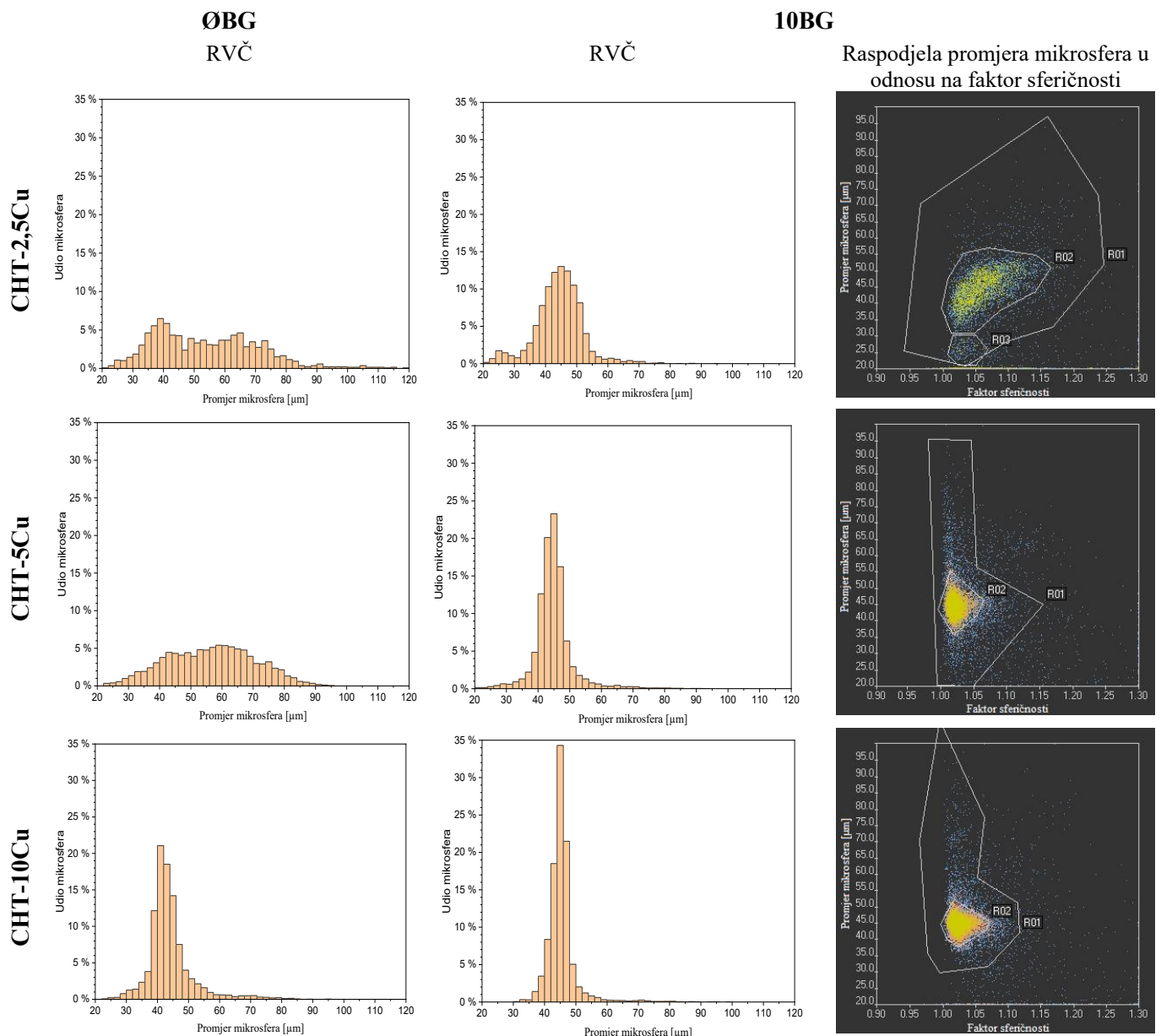
Kako oblik tako i veličina mikročestica ovise o brojnim parametrima postupka. U Tablici 2. unaprijed su prikazani mogući ishodi ovisno o promjeni određenog parametra. Međutim, unutar ovoga rada jedini podložan varijaciji je napon, što podrazumijeva da su ostali parametri poput brzine protoka i udaljenosti kolektora za svaki pojedini uzorak konstantni. Napon se prilagođava nastanku stabilnog Taylorovog konusa zbog potencijalnog stvaranja ujednačenijih sfera.

Raspodjela veličine čestica (RVČ) za uzorke s različitim udjelom bakra bez stakla (slika 10. prvi stupac) i sa staklom (slika 10. drugi stupac) definirana je pomoću optičkog inverznog fluorescentnog mikroskopa na temelju nekoliko tisuća sfera. Povećanjem udjela Cu^{2+} iona mikrosfere imaju sve uniformniju raspodjelu koja iz multimodalne kod CHT-2,5Cu i CHT-5Cu prelazi u unimodalnu kod CHT-10Cu. Dakle, porastom količine metalnog iona u uzorku uži je interval zastupljenih promjera mikrosfera, a samim time i veći udio čestica ima jednaku veličinu.

Treći stupac na slici 10. („Raspodjela promjera mikrosfera u odnosu na faktor sferičnosti“) odnosi se na mikrosfere s bioaktivnim staklom. Faktor sferičnosti funkcija je promjera i površine, a za savršeni kružni oblik iznosi 1 [23]. Prikazani grafički dijagrami dobiveni su direktno pomoću optičkog mikroskopa te daju vizualni uvid u to koliko eksperimentalno pripremljeni uzorci odstupaju od sferičnog oblika. Svaka plava točka označava jednu okarakteriziranu sferu. Računalni program prilagođen je da na temelju velikog broja prikupljenih mikrografa samostalno detektira objekte te da na temelju znanog povećanja i rezolucije kamere preračunava površinu piksela u mikrometre. Unutar područja R01 nalaze se objekti koji su uzeti u obzir kao uspješno detektirane sfere dok se izvan područja R01 nalaze neuspješno detektirani objekti koji su posljedica preklapljenih sfera ili nepravilnih vlaknastih nečistoća faktora sferičnosti znatno većeg od idealnog.

Regija R01 predstavlja sve mikrosfere koje su poslužile za crtanje raspodjela. Za uzorke CHT-2,5Cu-10BG, CHT-5Cu-10BG i CHT-10Cu-10BG unutar područja R01 nalazi se 91,2 % , 95,6 % , odnosno 95,0 % detektiranih sfera.

Regije R02 i R03 usmjerene su na mikrosfere zastupljenijih veličina. Dok je područje njihove najveće prisutnosti, koje nastaje kao posljedica preklapanja podataka, označeno žutom bojom. Unutar gusto definiranog R02 kod uzoraka CHT-2,5Cu-10BG, CHT-5Cu-10BG i CHT-10Cu-10BG redom se nalazi 78,3 %, 79,2 % i 82 % mikrosfera. Jedini prikaz s regijom R03 je kod uzorka CHT-2,5Cu zbog njegove bimodalne raspodjele. Ostala dva sadrže samo R02 jer su unimodalne.



Slika 10. Raspodjela veličina dobivenih mikrosfera (RVČ) s različitim udjelom bakra bez stakla (prvi stupac) i s bakrom (drugi stupac). Treći stupac prikazuje raspodjelu promjera mikrosfera u ovisnosti o faktoru sferičnosti za uzorke koje sadrže bakar i staklo.

Najčešće zastupljene veličine kod pojedinog uzorka dane su u tablici 5.

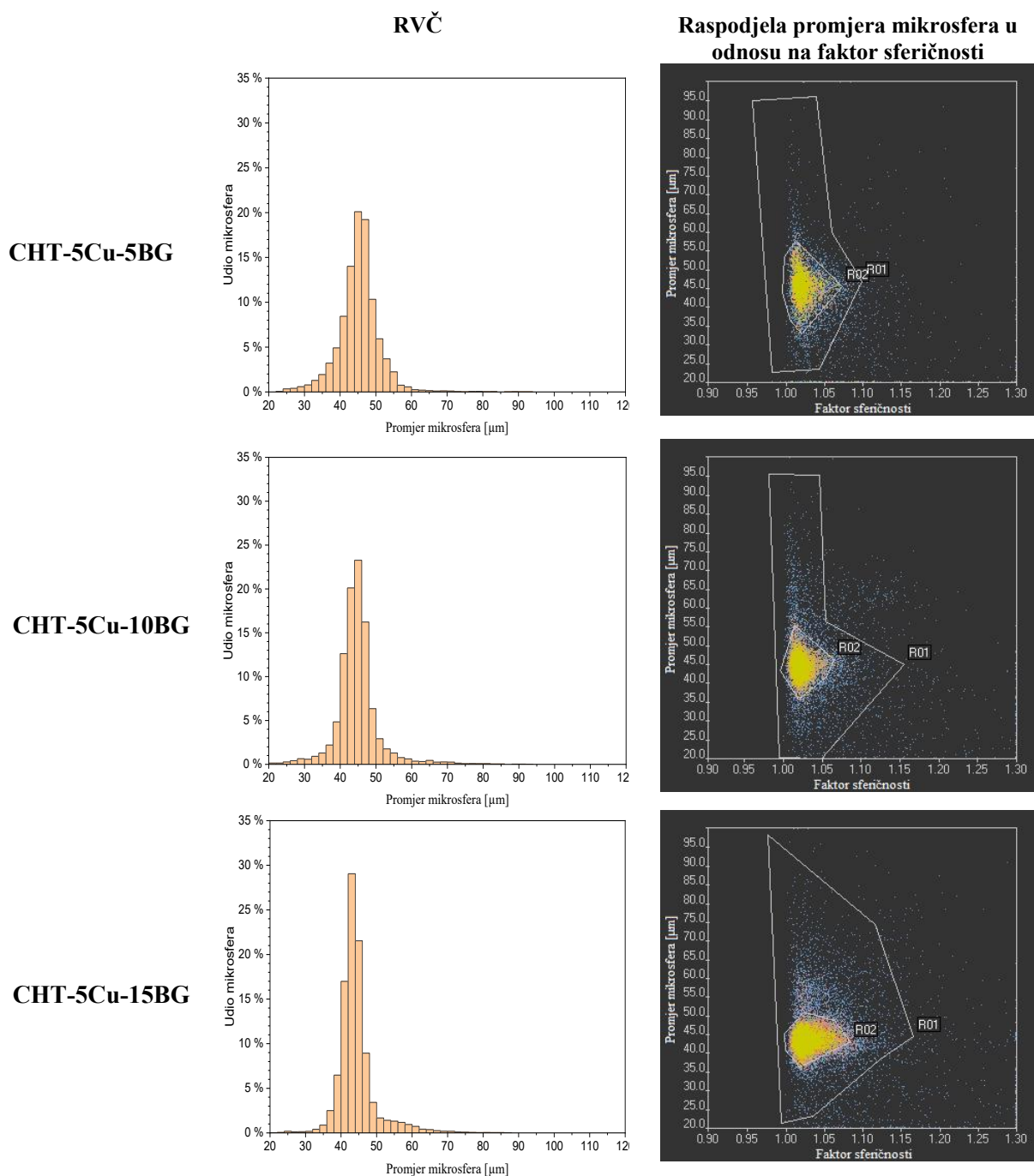
Tablica 5. Najzastupljenije veličine pojedinih uzoraka sa slike 10.

UZORAK	Područje R02			
	UDIO [%]	PROMJER [μm]	UDIO [%]	PROMJER [μm]
CHT-2,5Cu	6,49	38-40		
CHT-5Cu	5,40	58-60		
CHT-10Cu	21,06	40-42	81,6	32-54
CHT-2,5Cu-10BG	13,02	44-46	78,3	31-57
CHT-5Cu-10BG	23,27	44-46	79,2	36-55
CHT-10Cu-10BG	34,30	44-46	82,0	38-52

Navedena zapažanja slažu se s literaturom u kojoj se kod Lončarević i sur. [3] povećanjem udjela bakrovih iona u kitozanskim mikrosferama raspon veličina sužava. Međutim, kako oni tvrde, a ovdje se ne može sa sigurnošću utvrditi, povećanjem udjela metalnog iona mikrosfere postaju manje. U svom radu autori to pripisuju stvaranjem jakog CHT-Cu²⁺ kompleksa, a jednak uzrok dovode u ovisnost s oblikom. Pri čemu kod nižih c(Cu²⁺) mikrosfere poprimaju oblik elipsoide, a porastom koncentracije metalnih iona one postaju sferičnije. Ovim radom isto tako može se uvidjeti kako su uzorci CHT-2,5Cu i CHT-2,5Cu-10BG kao istegnute kapi odnosno u obliku zrna, dok se kod ostalih primjećuje kružni oblik. Takva razmatranja osim OM-a omogućuje i SEM.

Dodatkom iste količine BG prema slici 10. vidljivo je suženje raspodjele veličina čestica za razliku od uzoraka koji ga nemaju. Ujedno u prisutnosti bioaktivnog stakla potvrđeno je i suženje povećanjem udjela bakrovih iona. Zanimljivo je kako su najzastupljeniji promjeri jednaki kod svih prikazanih sastava s BG u vrijednosti 44-46 μm (tablica 5.).

Dodatak različitih količina BG pri jednakom udjelu Cu^{2+} iona rezultira raspodjelama veličina čestica prikazanim na slici 11.



Slika 11. Raspodjela veličina čestica i promjera mikrosfera u odnosu na faktor sferičnosti za mikrosfere različitog udjela BG.

Kako mikrosfere sadrže sve veću količinu bioaktivnog stakla tako im raspodjela veličina čestica poprima sve uži interval. U sva tri slučaja histogram je unimodalna zbog čega osim R01 postoje dodatno i R02 regije. Područje R01 kod CHT-5Cu-5BG pokriva 92,8 % detektiranih objekata. Kod CHT-5Cu-15BG 96,6 % programom određenih objekata spada u mikrosfere s uspješno okarakteriziranim parametrima. Najzastupljenije veličine ovisno o sastavu prikazane su u tablici 6.

Tablica 6. Najzastupljenije veličine pojedinih uzoraka sa slike 11.

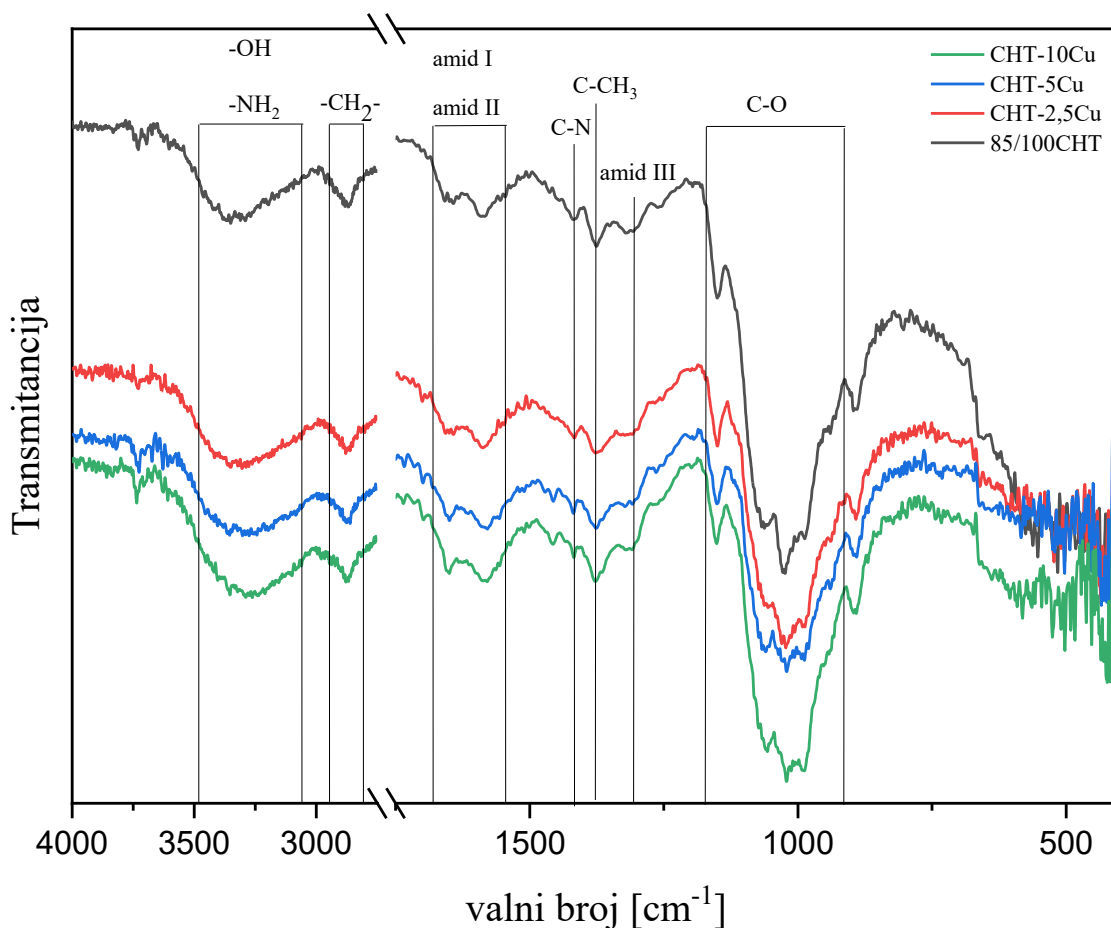
UZORAK	Područje R02			
	UDIO [%]	PROMJER [μm]	UDIO [%]	PROMJER [μm]
CHT-5Cu-5BG	20,09	44-46	81,6	34-56
CHT-5Cu-10BG	23,27	44-46	79,2	36-55
CHT-5Cu-15BG	29,05	42-44	78,1	36-51

Najučestaliji promjeri CHT-5Cu-5/10BG mikrosfera su jednaki i odgovaraju svim uzorcima s BG iz tablice 5. u vrijednosti 44-46 μm . Dok CHT-5Cu-15BG poprimaju nešto manji promjer od 42-44 μm .

Bitno je napomenuti kako su svi navedeni rezultati posljedica slučajno odabranih mikrosfera na kojima se temelji analiza. Odabir odgovarajućeg udjela BG posebice je bitan za primjenu budući da utječe na bioaktivnost, mehanička, biološka i mnoga druga svojstva [24]. Može se primijetiti da korišteni optički inverzni fluorescentni mikroskop s pripadajućim programom za obradu slika na brz, efikasan i nepristran način daje izrazito precizne podatke o veličini sfera na temelju velikog broja određenih objekata. Mikrografije pretražnog elektronskog mikroskopa imaju znatno veću rezoluciju, no promjer sfera može se odrediti uz pomoć skale samo na ograničenom i znatno manjem broju objekata.

4.3. FTIR analiza

Infracrveni spektri sa slike 12. i 13. prikazuju karakteristične vrpce ispitivanih mikrosfera u određenom području valnih brojeva. Vrpce sa slike 12. detaljnije su iskazane tablicom 7.



Slika 12. FTIR spektar mikrosfera bez bioaktivnog stakla.

Na slici 12. prikazan je FTIR spektar kitozana i uzoraka mikrosfera bez bioaktivnog stakla. Kitozan karakterizira široki signal u području $3463\text{--}3086\text{ cm}^{-1}$ koji odgovara vibraciji rastezanja O-H skupine njegove strukture, a može proizlaziti i iz vode zaostale u uzorku. Isto područje ukazuje na postojanje N-H rastezanja iz amina i amida. Područje valnih brojeva od $1670\text{--}1552\text{ cm}^{-1}$ obuhvaća vibracije karbonilne skupine (C=O) amida I (1657 cm^{-1}) i vibracije N-H savijanja te C-H istežanja sekundarnog amida (amid II veza na 1587 cm^{-1}). Amid III veze (1305 cm^{-1}) u sekundarnom amidu posljedica su N-H savijanja i C-H istežanja uz koje sudjeluje još i C-CH₃ istežanje [25].

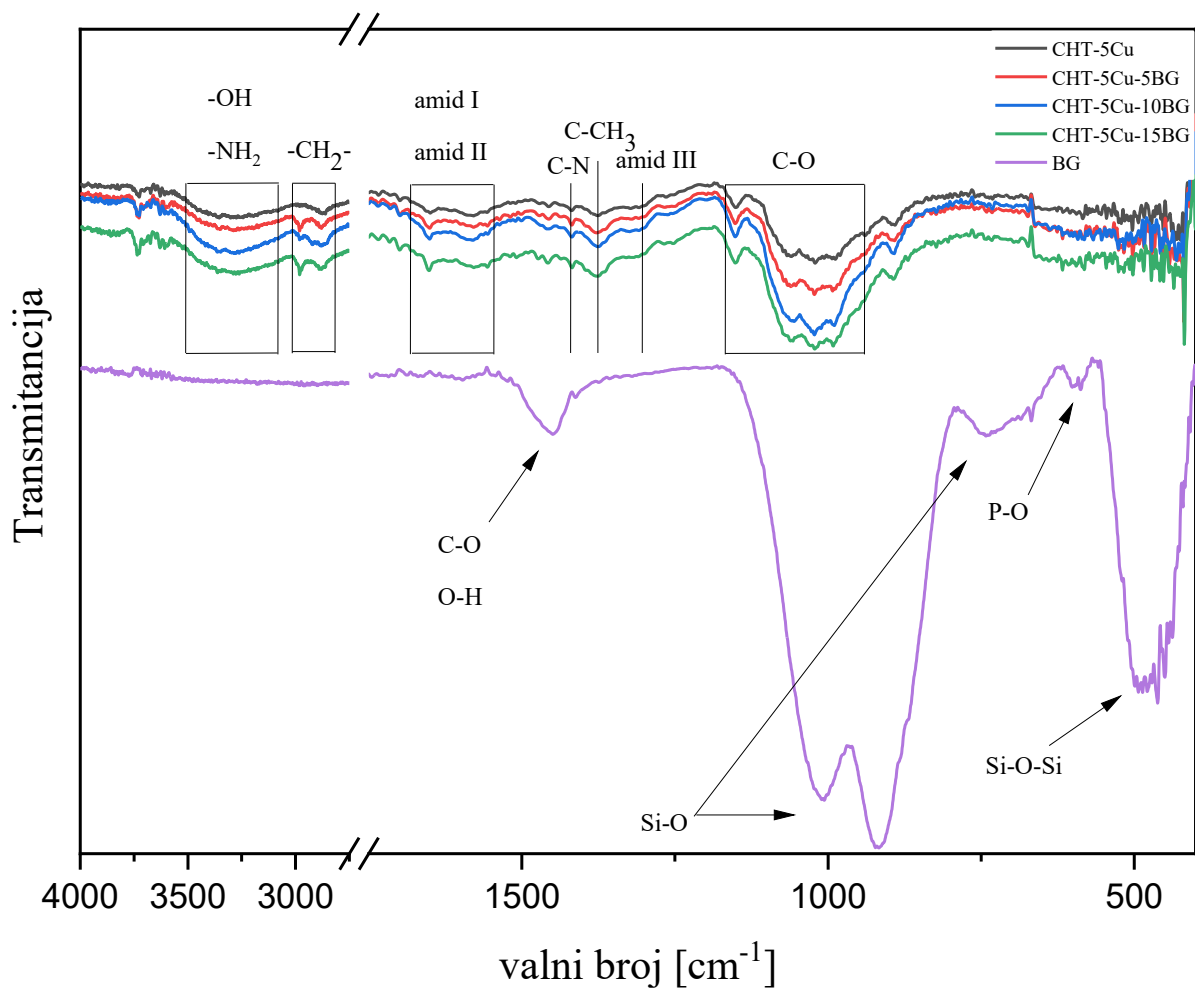
Na području spektra gdje se nalaze C-H istežanja najveći intenzitet pri valnom broju 2878 cm^{-1} dodijeljeno je simetričnim i asimetričnim vibracijama $-\text{CH}_2$ skupine. Posljednji signali značajni za kitozansku strukturu nalaze se na 1026 i 1061 cm^{-1} , a odgovaraju rastezanju C-O veze (ugljik koji se nalazi uz OH skupinu) te na 1151 cm^{-1} koji predstavlja C-O-C vibracije [16].

Tablica 7. Karakteristične vrpce funkcionalnih skupina sa slike 12.

UZORAK	O-H	N-H	C-H	amid I	amid II	amid III	C-O	C-O-C
	valni broj [cm^{-1}]							
85/100CHT	3371	3293	2878	1657	1587	1305	1061 1026	1151
CHT-2,5Cu	3362	3287	2875	1654	1584	1305	1058 1020	1151
CHT-5Cu	3356	3282	2872	1651	1580	1305	1061 1023	1151
CHT-10Cu	3353	3273	2872	1651	1577	1305	1058 1020	1151

Iz dobivenih spektara vidi se kako dodatkom bakrovih iona ne dolazi do značajne razlike u položaju signala obzirom na čisti polimerni prah kitozana. Iznimka je široka vrpca O-H i N-H vibracija koja se pomiče na manje valne brojeve stvaranjem kompleksa s metalom. Navedeno ukazuje na interakciju Cu^{2+} iona s polimerom u području OH i NH_2 skupina stvaranjem kompleksa jednim od modela sa slike 3. [26]. Drugim riječima NH_2 i OH skupina sudjeluju u povezivanju s bakrom što je dodatno potvrđeno pomicanjem signala koji pripadaju amid I i amid II vezama. Prema Wang i sur. [26], dodatkom metalnih iona, bilo da se radi o bakru, cinku ili željezu, te stvaranjem kompleksa s kitozansom, vrpce u području amida I i amida II nestaju. Na njihovom mjestu pojavljuje se signal koji opisuju kao signal asocijacije. Unutar ovog rada takva promjena nije primijećena, a u sličnom istraživanju nisu ju zapazili niti Lončarević i suradnici [3].

Slikom 13. prikazani su spektri i karakteristične vrpce kompozitnih mikrosfera CHT-BG. Za usporedbu ovoga puta dodatno su iskazani čisto bioaktivno staklo i uzorak CHT-5Cu kojemu se dodaju različiti udjeli BG.



Slika 13. FTIR spektar bioaktivnog stakla i mikrosfera kojima je dodan različiti udio BG.

Analizom praha samog BG uočeno je nekoliko karakterističnih vrpca, signal na 1450 cm^{-1} jedini je koji ne odgovara uzorku već se prema literaturi [27] pripisuje vibracijama O-H veze vode i C-O veze CO_3^{2-} skupine, adsorbiranih iz atmosfere. Valni brojevi na 1009, 917 i 737 cm^{-1} odgovaraju rasteznim vibracijama Si-O veze u svakom od SiO_4 tetraedra. Dok 486 cm^{-1} odgovara premosnom kisiku u silikatnoj mreži, odnosno deformaciji Si-O-Si veze između SiO_4 tetraedara. Posljednja vrpca koja se očitava pod valnim brojem 589 cm^{-1} malog je intenziteta, ali se pripisuje vibracijama savijanja P-O veze iz PO_4^{3-} . Što je dokaz postojanja male količine fosfata povezanih u silikatnu mrežu bioaktivnog stakla [28].

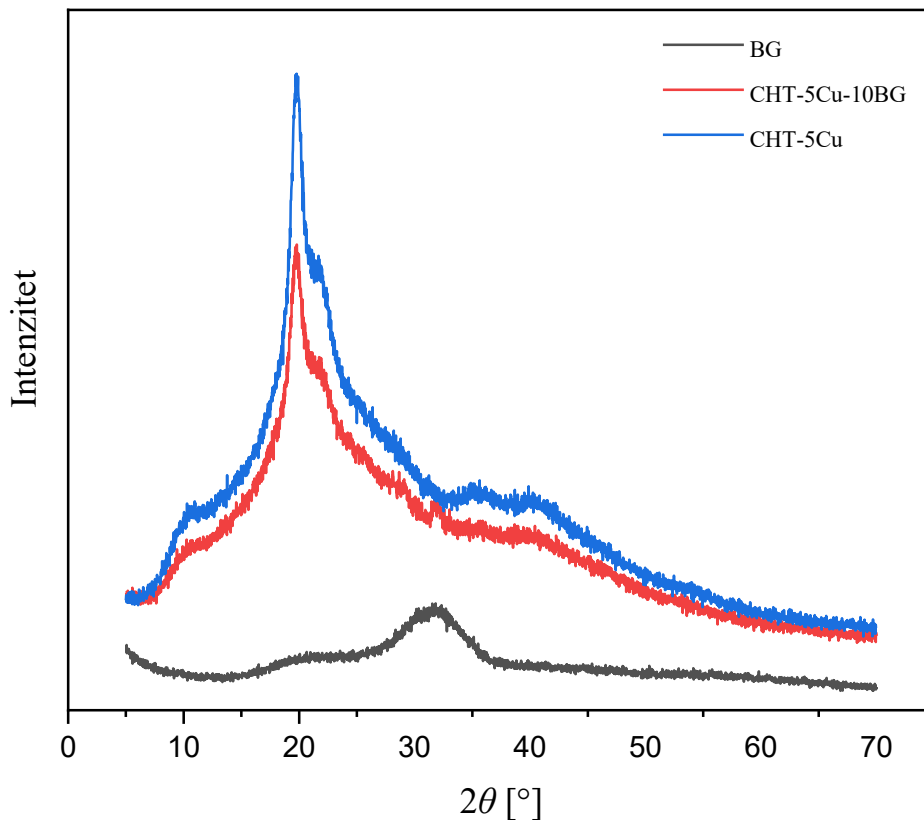
Generalno, kompozitne mikrosfere trebale bi rezultirati spektrom koji sadržava karakteristične vrpce kitozana i bioaktivnog stakla čiji se pojedini signali takvim miješanjem deformiraju, pomiču, nestaju ili nastaju. Navedeno je posljedica povezivanja komponenti uzorka odnosno njihovih kemijskih interakcija. Prema literaturi [29] vibracije veza amida II pomaknute su na manje valne brojeve dok su vibracije C-O i Si-O-Si veza deformirane. Što autorima daje naznaku za vezivanje upravo na tim skupinama.

Međutim, promatranjem mikrosfera sa slike 13. nisu uočene značajne razlike u spektru dodatkom sve veće količine bioaktivnog stakla. Jedina manja promjena u izgledu signala primjetna je u rasponu vibracija C-O veza kitozana od 1174 do 966 cm^{-1} čije se područje preklapa s vibracijama Si-O veza bioaktivnog stakla.

Temeljem navedenog pretpostavlja se kako među materijalima nema interakcija koje bi uzrokovale pomak vrpce kao i njihovo povećanje odnosno smanjenje u intenzitetu. A količina bioaktivnog stakla u ovom radu malena je za očitu izmjenu signala praćenu s njegovim udjelom.

4.4. XRD analiza

Difrakcijom rendgenskog zračenja dobiveni su difraktogrami čistog bioaktivnog stakla te uzoraka CHT-5Cu i CHT-5Cu-10BG prikazanih na slici 14.



Slika 14. XRD difraktogram BG, CHT-5Cu i CHT-5Cu-10BG uzoraka.

Difraktogram praha bioaktivnog stakla ukazuje na amorfnu strukturu materijala s maksimalnim pikom na $2\theta = 31,8^\circ$. Obzirom da bi kristalna priroda smanjivala njegovu bioaktivnost i dovela do inertnosti, upravo mu amorfni karakter omogućuje upotrebu u inženjerstvu koštanog tkiva [30]. Ustanovljeno literaturom [26, 30], difraktogram čistog kitozana pokazuje kristaličan difrakcijski maksimum na $2\theta = 19,8^\circ$, a kristalni karakter javlja se uslijed djelovanja intramolekularnih vodikovih veza.

Ukoliko se kitozanu pridoda metalni ion, kao u primjeru CHT-5Cu, Nie i sur. [31] navode kako ne dolazi do promjene difrakcijske slike. Naime, u njihovu istraživanju XRD analizom smjesa CHT i $\text{Cu}(\text{OH})_2$ dobiven je difraktogram na kojemu se mogao uočiti dodatan vrh pripisan upravo bakrovu (II) hidroksidu. Dok smjesa CHT i Cu^{2+} iona ne rezultira jednakom promjenom zbog čega se zaključuje kako dolazi do stvaranja njihova kompleksa. Drugim riječima difrakcijska slika kitozana ne mijenja se dodatkom bakrovih iona.

Obzirom na navedeno, u ovom radu rendgenskom analizom ispituje se utjecaj bioaktivnog stakla. Tako se na difraktogramu uzorka CHT-5Cu-10BG uočava široki difrakcijski maksimum na $2\theta = 19,7^\circ$ koji odgovara kitozanu bez dodatnih maksimuma koji bi odgovarali bakru. U konačnici, utjecaj BG vidljiv je pojavom novog vrha na $2\theta = 31,8^\circ$, dok je manji amorfni pik bioaktivnog stakla oko $2\theta = 20^\circ$ prikriven utjecajem kitozana.

5. ZAKLJUČAK

Mikrosfere su čestice koje zahvaljujući maloj veličini, a velikoj specifičnoj površini pobuđuju interes u brojnim znanstvenim područjima. Posebice ukoliko su izrađene od biokompatibilnog, netoksičnog i biorazgradljivog polimernog materijala kao što je kitozan. Njegove amino i hidroksilne skupine omogućuju povezivanje s bakrovim (II) ionima što dovodi do poboljšanja svojstava, isto kao i kada se stvara kompozit s bioaktivnim staklom. Zbog jednostavnosti i ponovljivosti za pripremu uzoraka koristi se metoda elektroštrecanja. Namještanjem napona na vrijednost koja rezultira stabilnim Taylorovim konusom dobivaju se ujednačenije mikrosfere.

Uspješno su pripremljeni uzorci, a SEM mikrografije pokazuju kako od sferičnog oblika odstupaju samo CHT-2,5Cu te CHT-2,5Cu-10BG. Sljedeća promjena uočava se kod svih uzoraka s BG na čijoj se površini pojavljuju izbočine zbog dodatka čestica bioaktivnog stakla. Najzastupljeniji promjeri mikročestica određeni su pretražnim optičkim fluorescentnim mikroskopom te se kreću od 38 μm pa sve do 60 μm . Povećanjem udjela Cu^{2+} iona i povećanjem udjela bioaktivnog stakla interval raspodjele veličina čestica se sužava.

FTIR spektri uzoraka bez bioaktivnog stakla pokazuju neznatne promjene u vrpcama karakterističnih za vibracije N-H i O-H veza što upućuje na nastanak kompleksa odnosno povezivanje bakrovih (II) iona s tim skupinama kitozana. Dodatak BG rezultira spektrima bez vidljivih promjena u položaju vrpce jer između materijala ne postoje interakcije koje bi uzrokovale njihov pomak, nastajanje ili nestajanje. Rendgenska difrakcijska analiza ne ukazuje na pojavu novih difrakcijskih pikova s dodatkom iona bakra, dok se na difraktogramu uzoraka s BG pojavljuje dodatni difrakcijski maksimum amorfnog bioaktivnog stakla.

Zaključno, na temelju rezultata ukazuje se kako postoji mogućnost korištenja tehnike elektroštrecanja čak i za proizvodnju veće količine mikročestica. Naime, kompozitne mikrosfere na temelju korištenog medicinskog kitozana, Cu^{2+} iona (5Cu i 10Cu) i bioaktivnog stakla posjeduju potencijal za primjene u tkivnom inženjerstvu. Za određivanje njihovog ponašanja u ciljanim biološkim primjenama potrebna su dugotrajna i složena *in vitro* i *in vivo* istraživanja.

6. POPIS SIMBOLA

DD	stupanj deacetilacije (engl. <i>degree of deacetylation</i>)
EHDA	elektrohidrodinamička atomizacija (engl. <i>electrohydrodynamic atomization</i>)
CHT	kitozan (engl. <i>chitosan</i>)
BG	bioaktivno staklo (engl. <i>bioactive glass</i>)
HAc	octena kiselina
SOFM	pretražni optički fluorescentni mikroskop (engl. <i>scanning optical fluorescence microscope</i>)
SEM	elektronska pretražna mikroskopija (engl. <i>scanning electron microscope</i>)
FTIR	Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
ATR	prigušena totalna refleksija (engl. <i>Attenuated Total Reflectance</i>)
EDS	energetski disperzivna spektroskopija (engl. <i>Energy-Dispersive Spectrometry</i>)
XRD	difrakcija rendgenskog zračenja (engl. <i>X-Ray diffraction</i>)
θ	<i>theta</i> , ° ; difrakcijski kut

7. LITERATURA

- [1] Kawaguchi, H., Functional polymer microspheres. *Prog. Polym. Sci.*, **25** (2000) 1171–1210.
- [2] Varshosaz, J., The promise of chitosan microspheres in drug delivery systems, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **4** (2007) 263–273.
- [3] Lončarević, A., Ivanković, M., Rogina, A., Electrosprayed Chitosan–Copper Complex Microspheres with Uniform Size, *Materials*, **14** (2021) 5630.
- [4] JR, J., Bioactive glass, u JR, J., Bioceramics and their clinical applications, UK, 266-279.
- [5] Campos, E., Branquinho, J., Carreira, A. S., Carvalho, A., Coimbra, P., Ferreira, P., Gil, M. H., Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications, *Eur. Polym. J.*, **49** (2013) 2005–2021.
- [6] Lengyel, M., Kállai-Szabó, N., Antal, V., Laki, A. J., Antal, I., Microparticles, Microspheres, and Microcapsules for Advanced Drug Delivery. *Sci. Pharm.*, **87** (2019), 20.
- [7] Sahil, K., Akanksha, M., Premjeet, S., Bilandi, A., Kapoor, B., Microsphere:review, *Int. J. Res. Pharm. Chem.*, **1** (2011) 2231–2781.
- [8] Yadav, V., Galande, P., Borkar, S., A Review on Microspheres: Preparation, Characterization and Applications, *Asian J. Pharm. Res. Dev.*, **10** (2022) 128-133.
- [9] Gurung, B. D., Kakar, S., An overview on microspheres. *International Journal of Health and Clinical Research*, **3** (2020) 11–24.
- [10] Rogina, A., Vidović, D., Antunović, M., Ivanković, M., Ivanković, H., Metal ion-assisted formation of porous chitosan-based microspheres for biomedical applications, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, **70** (2021) 1027–1035.
- [11] Ramakrishna, S., Zamani, M., Prabhakaran, M. P., Advances in drug delivery via electrospun and electrosprayed nanomaterials. *Int. J. Nanomed.*, **8** (2013) 2997–3017.
- [12] Tapia-Hernández, J. A., Torres-Chávez, P. I., Ramírez-Wong, B., Rascón-Chu, A., Plascencia-Jatomea, M., Barreras-Urbina, C. G., Rangel-Vazquez, N. A., Rodríguez-Félix, F.,

Micro- and Nanoparticles by Electrospray: Advances and Applications in Foods, *J. Agric. Food Chem.*, **63** (2015) 4699–4707.

[13] Xu, Q., Qin, H., Yin, Z., Hua, J., Pack, D. W., Wang, C.-H., Coaxial electrohydrodynamic atomization process for production of polymeric composite microspheres. *Chem. Eng. Sci.*, **104** (2013) 330–346.

[14] Ruiz, G. A. M., Corrales, H. F. Z., Chitosan, Chitosan Derivatives and their Biomedical Applications. *Biol. Act. Appl. Mar. Polysaccharides*, (2017)

[15] Sinha, V. R., Singla, A. K., Wadhawan, S., Kaushik, R., Kumria, R., Bansal, K., Dhawan, S., Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs, *Int. J. Pharm.*, **274** (2004) 1–33.

[16] Mekahlia, S., Bouzid, B., Chitosan-Copper (II) complex as antibacterial agent: synthesis, characterization and coordinating bond- activity correlation study. *Phys. Procedia*, **2** (2009) 1045–1053.

[17] Van Vugt, T. A., Geurts, J. A. P., Arts, J. J., Lindfors, N. C., Biomaterials in treatment of orthopedic infections. *Management of Periprosthetic Joint Infections (PJIs)*, (2017) 41–68.

[18] Palmero, P., Ceramic–polymer nanocomposites for bone-tissue regeneration, *Nanocomposites for Musculoskeletal Tissue Regeneration*, (2016) 331–367.

[19] Hum, J., Boccaccini, A. R., Bioactive glasses as carriers for bioactive molecules and therapeutic drugs: a review, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **23** (2012) 2317–2333.

[20] Vukajlovic, D., Parker, J., Bretcanu, O., Novakovic, K., Chitosan based polymer/bioglass composites for tissue engineering applications. *Mater. Sci. Eng. C*, (2018)

[21] Jayanudin, Lestari, R. S. D., Kustiningsih, I., Irawanto, D., Bahaudin, R., Wardana, R. L. A., Luthfi, M. Preparation of chitosan microspheres as carrier material to controlled release of urea fertilizer. *S. Afr. J. Chem. Eng.*, **38** (2021), 70–77.

[22] Peng, Z., Li, Z., Shen, Y., Zhang, F., & Peng, X. Fabrication of Gelatin/Chitosan Microspheres with Different Morphologies and Study on Biological Properties. *Polym.-Plast. Technol. Eng.*, **51** (2012), 739–743.

- [23] Hilal, A. A., Thom, N. H., & Dawson, A. R. On entrained pore size distribution of foamed concrete. *Constr. Build. Mater.* **75** (2015), 227–233.
- [24] Sohrabi, M., Eftekhari Yekta, B., Rezaie, H., Naimi-Jamal, M.R., Kumar, A., Cochis, A., Miola, M., Rimondini, L. Enhancing Mechanical Properties and Biological Performances of Injectable Bioactive Glass by Gelatin and Chitosan for Bone Small Defect Repair. *Biomedicines* **8** (2020), 616.
- [25] Parker, F. S., Amides and Amines. *Applications of Infrared Spectroscopy in Biochemistry, Biology, and Medicine*, (1971), 165–172.
- [26] Wang, X., Du, Y., Fan, L., Liu, H., & Hu, Y. Chitosan- metal complexes as antimicrobial agent: Synthesis, characterization and Structure-activity study. *Polym. Bull.*, **55** (2005), 105–113.
- [27] Pishbin, F., Mouriño, V., Flor, S., Kreppel, S., Salih, V., Ryan, M. P., & Boccaccini, A. R. Electrophoretic Deposition of Gentamicin-Loaded Bioactive Glass/Chitosan Composite Coatings for Orthopaedic Implants. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **6** (2014), 8796–8806.
- [28] Vafa, E., Bazargan-Lari, R., Bahrololoom, M. E. Synthesis of 45S5 bioactive glass-ceramic using the sol-gel method, catalyzed by low concentration acetic acid extracted from homemade vinegar. *J. Mater. Res. Technol.*, **10** (2021), 1427–1436.
- [29] Oudadesse, H., Mostafa, A., Cathelineau, G. Chitosan Effects on Bioactive Glass for Application as Biocomposite Biomaterial. *Int. J. Biol. Biomed. Eng.* **5** (2011), 558.
- [30] Pourhaghgouy, M., Zamanian, A., Shahrezaee, M., & Masouleh, M. P. Physicochemical properties and bioactivity of freeze-cast chitosan nanocomposite scaffolds reinforced with bioactive glass. *Mater. Sci. Eng.* **58** (2016), 180–186.
- [31] Nie, J., Wang, Z., & Hu, Q. Chitosan Hydrogel Structure Modulated by Metal Ions. *Sci. Rep.*, **6** (2016).