

# Priprava biorazgradljivih polimernih mikrosfera

---

**Vidović, Dorina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:380915>

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

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



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Dorina Vidović

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

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

Dorina Vidović

PRIPRAVA BIORAZGRADLJIVIH POLIMERNIH MIKROSFERA

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada:

Doc. dr. sc. Anamarija Rogina

Članovi ispitnog povjerenstva:

Doc. dr. sc. Anamarija Rogina

Prof. dr. sc. Marica Ivanković

Prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

Zagreb, rujan 2019.

## SAŽETAK

Kitozan je biorazgradljiv, netoksičan i biokompatibilan materijal koji se često koristi u inženjerstvu tkiva i biomedicini. Do danas, mali se broj radova usredotočio na istraživanje mikrosfera kompleksa kitozana i metalnih iona. S toga je cilj ovog rada proizvesti mikrosfere kompleksa metalnih iona i kitozana različitih stupnjeva deacetilacije metodom elektroštrcanja te ispitati utjecaj jakosti električnog polja na veličinu, oblik i mikrostrukturu mikrosfera.

Za proizvodnju mikrosfera korištene su dvije vrste kitozana: kitozan nižeg stupnja deacetilacije (MC75) i kitozan visokog stupnja deacetilacije (MC95). Bakrovi (II) i cinkovi (II) ioni korišteni su za pripremu kompleksa, dok je otopina amonijaka služila kao neutralizirajući agens. Mikrosfere su proizvedene pri dvije vrijednosti napona: 20 kV i 25 kV. Za karakterizaciju otopina kitozana i otopina kompleksa metalnih iona i kitozana, izmjerene su gustoća (pomoću aerometra), napetost površine (metodom stalagmometra) i dinamička viskoznost (Höpplerovim viskozimetrom). Sastav ispitivanih kompleksa utvrđen je rendgenskom difrakcijskom analizom. Veličina, oblik i raspodjela veličina mikrosfera određena je uz pomoć optičkog mikroskopa i svjetlosnog stereomikroskopa, dok je mikrostruktura snimljena pretražnim elektronskim mikroskopom. Biološka karakterizacija mikrosfera provedena je testom citotoksičnosti na ljudskim embrionalnim stanicama tijekom tri dana stanične kulture.

Mjerenjem napetosti površine i dinamičke viskoznosti utvrđeno je da se iz otopina kompleksa MC75–metalni ion lakše proizvode pravilne mikrosfere. Identifikacija kompleksa ukazala je na interakcije između  $\text{Cu}^{2+}$ , odnosno,  $\text{Zn}^{2+}$  iona i kitozana bez nastanka anorganskih kristalnih faza. Analiza mikrosfera pomoću optičkog mikroskopa i svjetlosnog stereomikroskopa ukazala je na užu raspodjelu veličina mikrosfera proizvedenih pri 25 kV. Također, utvrđen je pravilniji oblik mikrosfera kompleksa s kitozansom MC75 u odnosu na mikrosfere kompleksa s MC95. Ispitivanje mikrostrukture potvrdilo je visoku poroznost mikrosfera proizvedenih pri obje vrijednosti napona. Test citotoksičnosti ukazao je na necitotoksičnost mikrosfera kompleksa MC75– $\text{Zn}^{2+}$ , te je utvrdio da su mikrosfere kompleksa MC75– $\text{Cu}^{2+}$  veće koncentracije citotoksične za ljudske embrionalne stanice Hek293.

**Ključne riječi:** kitozan, mikrosfere, metalni ioni, mikrostruktura, citotoksičnost.

## SUMMARY

### **Preparation of biodegradable polymer microspheres**

Chitosan is biodegradable, non-toxic and biocompatible material commonly used in tissue engineering and biomedicine. Up to date, few papers have been focused on the investigation of the chitosan–metal ion complex microspheres. Therefore, the aim of this work was to produce chitosan–metal ion microspheres via electrospray method by using chitosans of different deacetylation degrees, and to determine the influence of electric field on the size, shape and microstructure of produced microspheres.

Two types of chitosan were used to produce microspheres: chitosan with lower deacetylation degree (MC75) and chitosan with high deacetylation degree (MC95). Copper (II) and zinc (II) ions as divalent metal ions were used to prepare complexes, while ammonia solution served as neutralizing agent. The microspheres were produced at two different voltages: 20 kV and 25 kV. The density (using an aerometer), surface tension (stalagmometer method) and dynamic viscosity (Höppler viscometer) of chitosan and chitosan–metal ion complex solutions were measured. The composition of investigated complexes was determined by X-ray diffraction analysis. The size, shape and size distribution of microspheres were determined using an optical microscope and a light stereomicroscope, while the microstructure was analysed by a scanning electron microscope. Biological characterization of microspheres was performed by cytotoxicity assay on human embryonic cells during three days of culture.

The surface tension and dynamic viscosity results indicated easier electrospraying production of regular microspheres from MC75–metal ion complexes. The identification of chitosan-ion complexes indicated interactions between  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  ions and chitosan, respectively, without the formation of inorganic crystalline phases. The microscopic analyses of produced microspheres showed a narrow size distribution for microspheres produced at 25 kV. Additionally, the more spherically shaped microspheres were detected for complexes with chitosan MC75 with respect to the complexes obtained from MC95. Scanning electron microscopy showed highly porous structure of microspheres produced at both voltages. The cytotoxicity test showed no toxicity of microspheres of MC75– $\text{Zn}^{2+}$  complexes, while microspheres MC75– $\text{Cu}^{2+}$  higher concentrations were cytotoxic for human embryonic kidney cells Hek293.

**Keywords:** chitosan, microspheres, metal ions, microstructure, cytotoxicity.

## SADRŽAJ:

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO .....	3
2.1. BIORAZGRADLJIVI POLIMERI .....	3
2.1.1. KITOZAN .....	4
2.1.1.1. STUPANJ DEACETILACIJE.....	5
2.1.1.2. SVOJSTVA I PRIMJENA KITOZANA.....	6
2.1.1.3. KOMPLEKSI KITOZANA S METALNIM IONIMA .....	8
2.1.1.3.1. Kompleksi kitozana i bakra .....	9
2.1.1.3.2. Kompleksi kitozana i cinka .....	11
2.2. MIKROSFERE.....	13
2.2.1. PROIZVODNJA MIKROSFERA.....	15
2.2.2. MIKROSFERE KITOZANA .....	18
2.2.3. BIOLOŠKA SVOJSTVA MIKROSFERA .....	20
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	22
3.1. Materijali .....	22
3.2. Priprema istraživanih materijala.....	22
3.2.1. Priprema polimernih otopina.....	23
3.2.2. Priprema otopina kompleksa kitozana i metalnih iona.....	24
3.2.3. Priprema tankih filmova .....	24
3.2.4. Proizvodnja mikrosfera kompleksa kitozana i metalnog iona .....	24
3.3. Metode karakterizacije .....	26
3.3.1. Karakterizacija otopina kompleksa kitozana i metalnog iona .....	26
3.3.1.1. Gustoća.....	26
3.3.1.2. Napetost površine .....	26
3.3.1.3. Viskoznost .....	26
3.3.2. Identifikacija i karakterizacija tankih filmova.....	27
3.3.2.1. Rendgenska difrakcijska analiza .....	27
3.3.2.2. Bubrenje .....	27

3.3.3. Karakterizacija mikrosfera kompleksa kitozana i metalnih iona.....	27
3.3.3.1. Pretražna elektronska mikroskopija.....	27
3.3.3.2. Određivanje veličine i raspodjele veličina mikrosfera .....	28
3.3.4. Citotoksičnost mikrosfera.....	28
3.3.5. Statistička obrada podataka .....	29
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	30
4.1. Gustoća i viskoznost otopina.....	30
4.2. Napetost površine otopina .....	33
4.3. XRD analiza filmova .....	35
4.4. Bubrenje filmova.....	36
4.5. Veličina i raspodjela veličina mikrosfera .....	39
4.6. Mikrostruktura mikrosfera.....	43
4.7. Citotoksičnost mikrosfera.....	48
5. ZAKLJUČCI .....	50
6. POPIS SIMBOLA .....	52
7. LITERATURA.....	54
8. PRILOZI.....	60
ŽIVOTOPIS .....	63



## 1. UVOD

U 21. stoljeću znanost i tehnologija usredotočili su se na proučavanje biorazgradljivih materijala i sirovina dobivenih iz obnovljivih izvora energije te na njihovu potencijalnu primjenu u medicini i farmaceutskoj industriji. Kitozan je jedan od biorazgradljivih materijala koji se široko koristi u biomedicini. To je prirodna makromolekula proizvedena deacetilacijom hitina koji potječe iz kutikula rakova, školjki i škampi. Zbog sličnosti strukture kitozana s polisaharidnim lancima u ljudskom tijelu, izaziva minimalni imunološki odgovor unosom u ljudsko tijelo. Stoga je kitozan kao netoksična, biorazgradljiva i biokompatibilna makromolekula pobudio veliki interes u inženjerstvu tkiva [1, 2].

Još jedna od pozitivnih karakteristika kitozana je sposobnost stvaranja veza s metalnim ionima, što se pripisuje procesu keliranja. Moguća primjena kompleksa kitozana i metalnih iona je u adsorpciji (uklanjanju) metalnih iona, u bojenju, u katalizi ili u obradi otpadnih voda, no malo se radova usredotočilo na biološke aktivnosti ovih kompleksa. Danas je dobro poznato da metalni ioni, kao što su  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$ , čine važnu skupinu antimikrobnih sredstava. Pošto je kitozan jaki kelatni agens i ima dobra svojstva biokompatibilnosti, moguće je dobiti antimikrobna svojstva kompleksa kitozan–metalni ion koja će biti od velike važnosti u medicini i farmaceutskoj industriji [3].

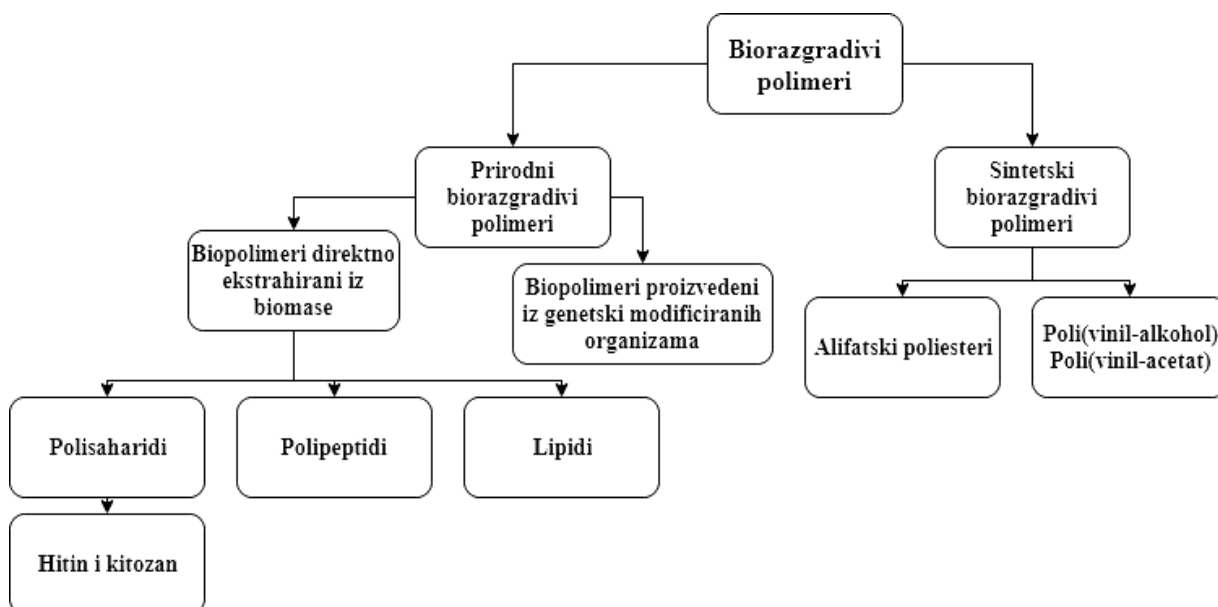
Dosada, provedena su brojna istraživanja primjene kitozana kao nosača i dostavljača lijekova ili cjepiva. Kitozan se danas već koristi za produženu dostavu lijeka i makromolekula. Međutim, proizvodnja mikrosfera kitozana predstavlja bolju opciju zbog njihove sposobnosti neprekidnog oslobađanja lijeka i poboljšane biorasploživosti ciljanih molekula. Još jedna od prednosti primjene mikrosfera je ta da se vežu na ciljane tkiva i s njima tvore jake interakcije [4, 5]. Općenito, mikrosfere su male sferične čestice čiji se promjer kreće od 1  $\mu\text{m}$  do 1000  $\mu\text{m}$ . Danas postoji veliki broj metoda pripreme mikrosfera, a najčešće korištene su: polimerizacija, sušenje raspršivanjem, isparavanje otapala i elektroštrcanje [6, 7]. Važnost mikrosfera je u njihovoj maloj veličini koja im omogućuje otpornost na sile kompresije i smicanja što dovodi do njihove dulje trajnosti, a samim time i dulje trajnosti tkiva u koje se mikrosfere ugrađuju. Također, zbog njihove male veličine moguće ih je unijeti u organizam injektiranjem što uvelike olakšava njihovu primjenu u biomedicini [8].

S obzirom da danas postoji mali broj radova koji su usmjereni na istraživanje mikrosfera kompleksa kitozana i metalnih iona, u ovom radu ispitivat će se utjecaj dvovalentnih metalnih iona na strukturu i oblik mikrosfera. Cilj ovog rada je proizvesti mikrosfere kompleksa s kitozonom različitog stupnja deacetilacije metodom elektroštrcanja. Također će se pratiti utjecaj jakosti električnog polja na oblik i veličinu proizvedenih mikrosfera kompleksa.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. BIORAZGRADLJIVI POLIMERI

Biorazgradljivi polimer najčešće se definira kao polimer koji se razgrađuje, primarno s pomoću prirodnih mikroorganizama. Biorazgradljivi polimeri mogu se klasificirati prema kemijskom sastavu, podrijetlu, postupku sinteze, načinu obrade i primjeni. Najčešće se dijele u dvije skupine, prirodni polimeri dobiveni iz obnovljivih izvora i sintetski polimeri dobiveni iz ulja. Na slici 1 prikazana je podjela polimera s obzirom na podrijetlo i postupak sinteze [9, 10].

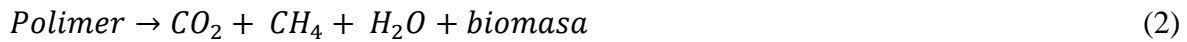


Slika 1. Podjela biorazgradljivih polimera s obzirom na podrijetlo i postupak sinteze [11].

Biolška razgradnja (biorazgradnja) je kemijska razgradnja materijala izazvana djelovanjem mikroorganizama kao što su bakterije, gljivice i alge. Smatra se vrstom degradacije koja uključuje biološku aktivnost. Prirodni polimeri razgrađuju se u biološkim sustavima oksidacijom i hidrolizom. Biorazgradljivi materijali razgrađuju se u biomasu, ugljikov dioksid i metan. Proces biorazgradnje može se podijeliti na aerobni i anaerobni. Aerobna razgradnja prikazuje se jednadžbom [9, 10]:



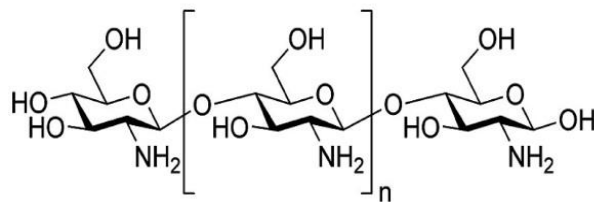
dok se anaerobna može prikazati:



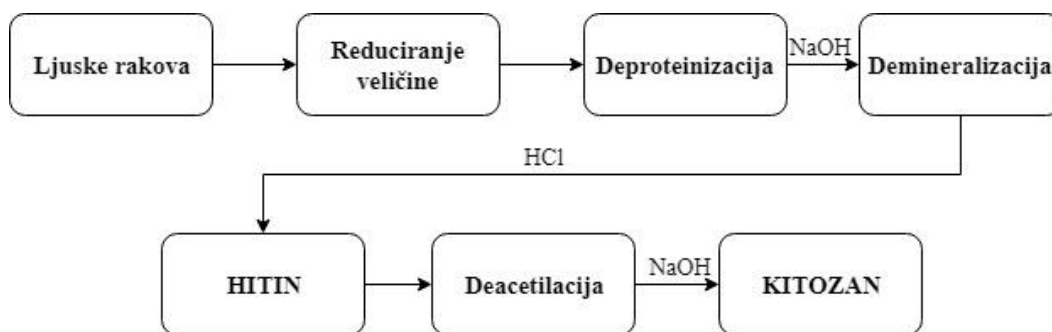
Glavna prednost prirodnih biorazgradljivih polimera, za razliku od sintetskih, je ta što se dobivaju isključivo iz obnovljivih izvora energije. Iz tog razloga je u zadnjih nekoliko godina interes za ovakvom vrstom polimera naglo porastao.

### 2.1.1. KITOZAN

Kitozan je prirodni linearni poliaminosaharid. Dobiva se alkalnom deacetilacijom hitina, polisaharida, kojeg ima u izobilju. Hitin je glavni sastojak zaštitne kutikule rakova, škampi, kozica, jastoga te se također nalazi u staničnim stjenkama nekih gljiva kao što su *aspergillus* i *mukar*. Hitin je linearni homopolimer sastavljen od  $\beta$ -(1,4)-*N*-acetilglukozaminske jedinice, dok se kitozan sastoji od kopolimera D-glukozamina i *N*-acetilglukozamina. Kitozan ima jednu primarnu amino skupinu i dvije slobodne hidroksilne skupine za svaku C<sub>6</sub> građevnu jedinicu (slika 2). Zbog lake dostupnosti slobodnih amino skupina u kitozanu, one nose pozitivni naboj i tako reagiraju s mnogim negativno nabijenim česticama ili polimerima. Iz istog razloga jednostavno se podvrgavaju kelaciji s metalnim ionima. Na slici 3 prikazan je pojednostavljeni dijagram toka proizvodnje hitina i kitozana iz ljuski rakova [1, 2].



Slika 2. Struktura kitozana [2].



Slika 3. Pojednostavljeni dijagram toka proizvodnje hitina i kitozana iz ljuski rakova [12].

Kitozan je slaba baza netopljiva u vodi i organskim otapalima, međutim topljiv je u razrijeđenoj kiseloj otopini ( $\text{pH} < 6,5$ ), koja može pretvoriti jedinice glukozamina u topljivi oblik  $\text{R-NH}_3^+$ . Na komercijalnom tržištu kitozan je dostupan u obliku suhih ljuskica, otopine i finog praha. Prosječna molekulska masa kitozana je između 3 800 i 2 000 000, a stupanj deacetilacije od 66 % do 95 % [1, 12].

#### 2.1.1.1. STUPANJ DEACETILACIJE

Kitozan se najčešće dobiva djelomičnom deacetilacijom hitina. Molarni udio *N*-acetilglukozaminskih jedinica u lancu, izražen kao:

$$DD = 100 * \frac{n_{\text{GlcN}}}{n_{\text{GlcN}} + n_{\text{GlcNAc}}} \quad (3)$$

naziva se stupanj deacetilacije (*DD*), gdje je  $n_{\text{GlcN}}$  prosječan broj D-glukozamidnih jedinica, a  $n_{\text{GlcNAc}}$  prosječan broj *N*-acetilglukozamidnih jedinica. Stupanj deacetilacije predstavlja sadržaj slobodnih amino skupina u polisaharidu. Proces deacetilacije uključuje uklanjanje acetilne skupine iz lanca hitina, ostavljajući za sobom potpunu amino skupinu ( $-\text{NH}_2$ ). Reaktivnost kitozana ovisi uglavnom o visokom stupnju kemijski reaktivnih amino skupina. U nekim radovima koristi se izraz stupanj acetilacije (*DA*) koji se može izračunati jednadžbom:

$$DA = 100 - DD \quad (4)$$

Razne metode upotrebljavaju se kako bi se smanjio ili povećao stupanj deacetilacije. Povećanje temperature ili koncentracije otopine natrijevog hidroksida može povećati uklanjanje acetilnih skupina iz hitina, što rezultira nizom molekula kitozana različitih svojstava i primjene [13].

Stupanj deacetilacije omogućuje definiranje pojmova hitin i kitozan. Najniža *DD* vrijednost koja odgovara kitozanu varira u literaturi od 40 do 60 %. Većina komercijalnih uzoraka kitozana ima prosječnu vrijednost *DD* od 70 % do 90 %. Za specifične biološke primjene kitozan višeg stupnja deacetilacije (> 95 %) može se pripremiti daljnjim postupkom deacetilacije, koji ne samo da povećava troškove pripreme, nego također često rezultira djelomičnom depolimerizacijom kitozana.

Postoji nekoliko metoda za određivanje stupnja deacetilacije, od jednostavnih kao što su pH-metrijska titracija, UV-Vis spektroskopija, infracrvena spektroskopija, do složenih koje zahtijevaju kompliciranu i skupu opremu, kao što su  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopija. NMR metoda je najpreciznija, no nije prikladna za rutinska mjerenja *DD* vrijednosti zbog visokih troškova i dugotrajnog postupka pripreme uzorka. Izbor metode ovisi o njezinoj jednostavnosti, brzini, isplativosti, pouzdanosti, ali i o toleranciji na nečistoće [14].

#### 2.1.1.2. SVOJSTVA I PRIMJENA KITOZANA

Osnovna svojstva kitozana su veličina čestica, gustoća, viskoznost, stupanj deacetilacije i molekulska masa. Ove karakteristike utječu na svojstva farmaceutskih proizvoda na temelju kitozana. Molekulska masa kitozana može varirati između 3 800 i 2 000 000. Određuje se metodama kao što su kromatografija, raspršivanje svjetlosti i mjerenje viskoznosti. Na samu viskoznost kitozana u otopini utječu mnogi čimbenici, kao što su stupanj deacetilacije, molekulska masa, ionska jakost, koncentracija, pH vrijednost i temperatura. Općenito je poznato da se viskoznost smanjuje s porastom temperature, međutim promjena pH u polimernoj otopini daje različite promjene viskoznosti ovisno o tipu kiseline koja se upotrebljava [1].

Svojstva kitozana kao što su biorazgradljivost, niska toksičnost i dobra biokompatibilnost čine ga pogodnim za primjenu u biomedicini i farmaceutskoj industriji. Budući da kitozan ima sposobnost oblikovanja tankih filmova, koristi se za proizvodnju kontaktnih leća. Također se pokazalo kako su membrane kitozana korisne kao umjetne

membrane bubrega zbog njihove odgovarajuće propusnosti i visoke vlačne čvrstoće. U farmaceutskoj primjeni koristi se kao prijenosnik za izravno komprimirane tablete, kao dezintegrant, vezivo, granulirajuće sredstvo te ponajviše kao nosač lijekova za pripravke s produljenim otpuštanjem [15].

Pokazano je da kitozan posjeduje i mukoadhezivna svojstva na privlačne sile nastale elektrostatskim interakcijama između pozitivno nabijenih molekula kitozana i negativno nabijenih mukoznih (sluzavih) površina. Ova svojstva mogu se pripisati:

- Skupinama s jakim vodikovim vezama kao što su  $-OH$ ,  $-COOH$ ;
- jakom naboju;
- velikoj molekulskoj masi;
- velikoj fleksibilnosti lanca;
- svojstvima površinske energije [1].

U novijim radovima najviše se istražuju antimikrobna svojstva kitozana. Kitozan je antimikrobni materijal koji je otporan na niz ciljanih mikroorganizama kao što su alge, bakterije, kvasci, gljivice. Predložena su tri modela koja prikazuju antimikrobno djelovanje kitozana. Najprihvatljiviji model govori o interakcijama između pozitivnih molekula kitozana i negativno nabijenih molekula mikrobnih stanica. U ovom modelu interakcije su uzrokovane elektrostatičkim silama između protoniranih  $-NH_3^+$  skupina i negativno nabijenih skupina mikrobnih stanica. Budući da se ovaj mehanizam temelji na elektrostatskim interakcijama, ukazuje na to da što je veći broj protoniranih amino skupina, to će biti veća antimikrobna aktivnost kitozana. To sugerira da kitozan ima veću aktivnost od hitina, što je i eksperimentalno potvrđeno [11, 16]. Hosseinnejad i Jafari [17, 18] utvrdili su kako je antimikrobna aktivnost kitozana viša kod niskih pH, zbog činjenice da se amino skupine kitozana protoniraju pri pH vrijednostima nižim od 6. Isto tako smanjenje pH utječe na veću adsorpciju kitozana na bakterijskim stanicama, također zbog povećanja pozitivnog naboja kitozana. U slučaju kada je pH veći od 6, kitozan nastoji izgubiti svoj naboj i može se istaložiti iz otopine zbog deprotoniranja amino skupina. Li i sur. [19, 20] ispitivali su utjecaj molekulske mase kitozana na antimikrobna svojstva i došli su do nekoliko zaključaka. Kitozan visoke molekulske mase zbog svoje veličine ne može proći kroz mikrobne membrane i stoga se nakuplja na površini stanice, što sprječava prijenos hranjivih tvari u stanične

membrane mikroba i uzrokuje njihovo razlaganje. S druge strane molekule kitozana niske molekulske mase mogu se vezati s DNK i inhibirati sintezu mRNK prodiranjem prema jezgrama mikroorganizama. Kako bi se poboljšala antimikrobna aktivnost kitozana pripremaju se kompleksi kitozana s određenim materijalima. Kitozan ima tendenciju stvaranja kompleksa s metalnim ionima, što omogućuje povezivanje kitozana i određenih metala koji imaju veliku antimikrobnu aktivnost [17, 18, 19, 20].

Jedno od važnih svojstava kitozana je njegova tendencija prema keliranju. Kitozan može selektivno vezati željene materijale kao što su kolesterol, masti, proteini, tumorske stanice i metalni ioni i s njima tvoriti komplekse visoke stabilnosti [21].

### *2.1.1.3. KOMPLEKSI KITOZANA S METALNIM IONIMA*

Funkcionalne skupine u kitozanu, hidroksilne i amino, imaju sposobnost stvaranja interakcija s drugim molekulama. Amino skupine vrlo su osjetljive na protoniranje, što omogućuje vezanje s anionskim derivatima. Protonirane amino skupine mogu vezati anionske vrste elektrostatskim privlačenjem ili ionskom izmjenom. Nadalje, kada su u deprotoniranom stanju, amino skupine posjeduju slobodan elektronski par na dušikovom atomu što omogućuje interakcije s tvarima koje su siromašne elektronima, kao što su kationi [22].

Kitozan ima sposobnost stvaranja čvrstih veza s metalnim ionima, što se pripisuje svojstvu keliranja. Prednost kitozana nad hitinom, koji ima slična svojstva keliranja, je taj što ga je puno jednostavnije otopiti. Hitin je topljiv samo u nekolicini organskih otapala, dok je kitozan topljiv već i u blago kiselim vodenim otopinama. Još jedna od prednosti u odnosu na hitin su lakše interakcije s metalnim ionima [23].

Istraživanja kompleksa kitozana s metalima utvrdila su njihovu moguću primjenu u uklanjanju metalnih iona, u bojenju, u katalizi ili u obradi otpadnih voda, no malo se radova usredotočilo na biološke aktivnosti ovih kompleksa. Dobro je poznato da metalni ioni, kao što su  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , čine važnu skupinu antimikrobnih sredstava. Pošto je kitozan jaki kelatni agens i ima dobra svojstva biokompatibilnosti, moguća su antimikrobna svojstva kompleksa koja će biti od velike važnosti u medicini i farmaceutskoj industriji [3].

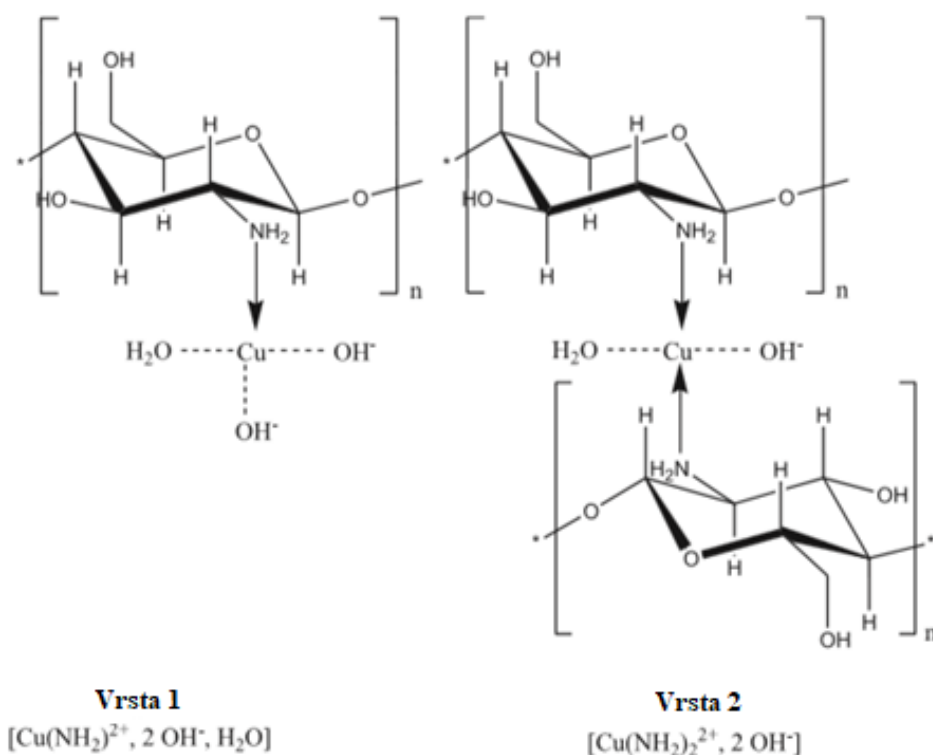
Veliki broj metoda koristi se kako bi se mogle utvrditi interakcije između metalnih iona i kitozana. Najčešće korištena metoda je nuklearna magnetska rezonancija (NMR), a



koriste se i infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR), diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC), potenciometrijska i titrimetrijska određivanja [24, 25].

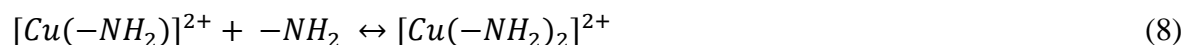
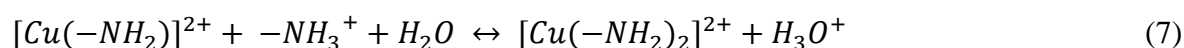
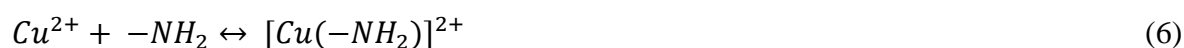
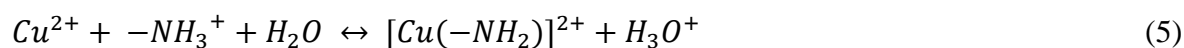
### 2.1.1.3.1. Kompleksi kitozana i bakra

Postoji mnogo predloženih različitih modela koji opisuju mehanizam stvaranja kompleksa kitozana. Prvi se naziva model mosta, koji govori da se metalni ion veže za nekoliko atoma dušika iz istog ili različitih lanaca. Drugi model, model privjeska, pretpostavlja da je metalni ion vezan za amino skupinu i to kao privjesak. Promjenom pH opaža se da je vezanje bakrenih iona na kitozanu zanemariv kada su amino skupine u protoniranom obliku. Postoje dva tipa kompleksa,  $[\text{Cu}(-\text{NH}_2)]^{2+}$  čije stvaranje počinje pri vrijednosti pH od 5,3 i  $[\text{Cu}(-\text{NH}_2)_2]^{2+}$  koji nastaje čim je pH veći od 5,8 (slika 4). Doprinos hidroksilnih skupina iz glukozamina na vezivanje metalnih iona ostaje upitan. Pretpostavlja se da u slučaju nastajanja kompleksa s jednom amino grupom, molekule vode mogu zamijeniti hidroksilnim skupinama iz prstena glukozamina [26, 27].

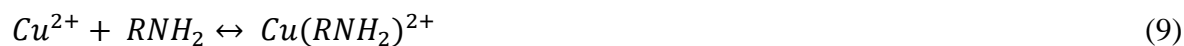


Slika 4. Strukture kompleksa bakar – kitozan [27].

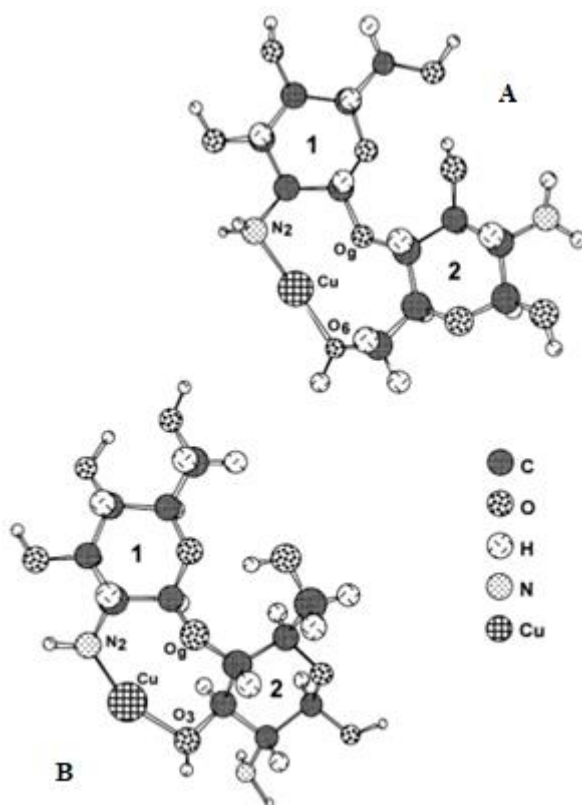
Montenero i Airoldi [23], u svom su radu objavili da kompleks koji posjeduje samo jednu amino skupinu ima veću konstantu stvaranja, time i veću stabilnost. Interakcije između kitozana i bakrenih iona prema njihovom mišljenju mogu se promatrati kroz sljedeće jednadžbe:



Wu, Tseng i Juang [28, 29], objašnjavaju kako do unosa prijelaznih metala dolazi preko koordinacije s amino skupinama kitozana. Dvije hidroksilne skupine i jedna amino skupina vežu se na bakar, a četvrto mjesto vjerojatno zauzima molekula vode ili –OH skupina na trećem ugljikovom atomu, što se može prikazati reakcijom:



Braier i Jishi [30], objavili su kako se koordinacija bakra i kitozana odvija u blizini glikozidne veze i uključuje glikozidni kisik ( $O_g$ ). Iz njihovih proračuna proizlaze dvije moguće koordinacijske strukture (slika 5).



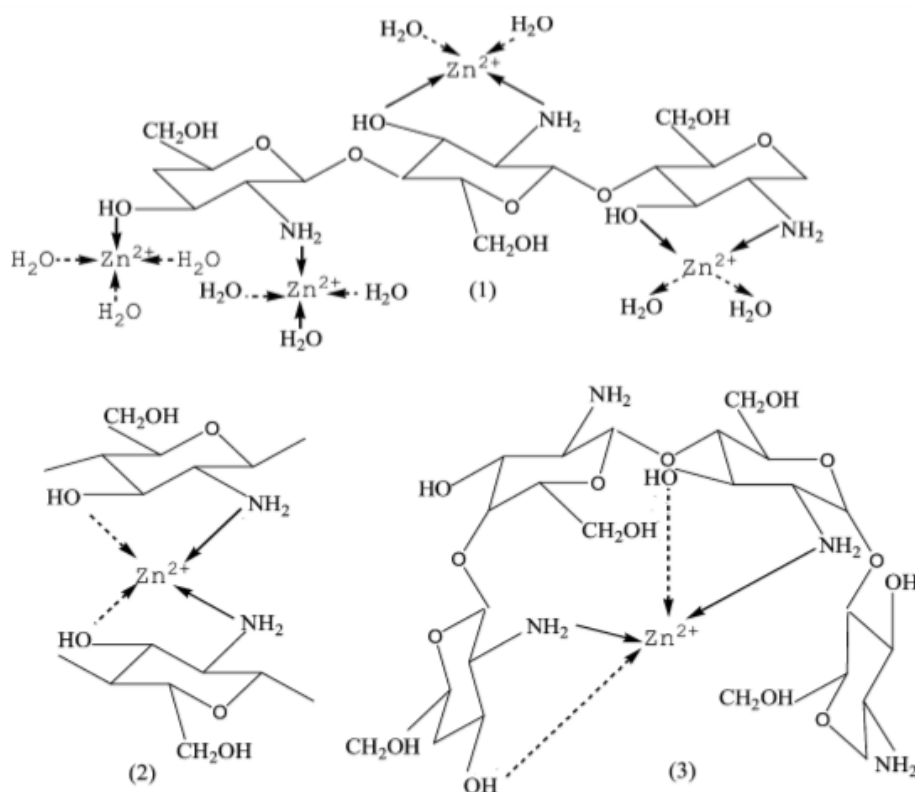
Slika 5. Koordinacije bakra ( $\text{Cu}^{2+}$ ) i kitozana: a)  $\text{Cu}^{2+}$  interakcije s  $\text{O}_6$ ,  $\text{N}_2$  i  $\text{O}_g$ ; b)  $\text{Cu}^{2+}$  interakcije s  $\text{O}_3$ ,  $\text{N}_2$  i  $\text{O}_g$ .

Struktura A, koja ima najnižu relativnu energiju, prikazuje bakar koji reagira s  $\text{N}_2$  iz prstena 1, s  $\text{O}_6$  iz prstena 2. Prema izmjenjenim duljinama veze između bakra i dušikovog atoma  $\text{N}_2$  i kisikovog atoma  $\text{O}_6$  došli su do zaključaka da se u ovoj strukturi bakar ne veže za  $\text{O}_g$ , ali postoje međusobne interakcije. Sljedeća u relativnoj energiji je struktura B, u kojoj bakar reagira s  $\text{O}_3$  iz prstena 2, s  $\text{N}_2$  iz prstena 1 te s  $\text{O}_g$ , ali bez stvaranja veze. Sterički efekt čini koordinacijsku strukturu bakra B energijski višom nego u koordinaciji A. Ova sterička prepreka proizlazi iz blizine između atoma  $\text{O}_3$  i  $\text{N}_2$  u strukturi B. Iako kompleks B ima iste vrste interakcija kao i kompleks A, rezultirajuća geometrija, izobličena tetragonska, i slabija glikozidna interakcija kisik-bakar objašnjavaju energijsku razliku [30].

#### 2.1.1.3.2. Kompleksi kitozana i cinka

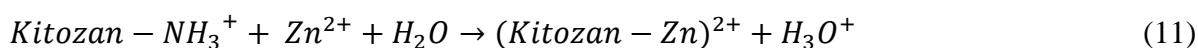
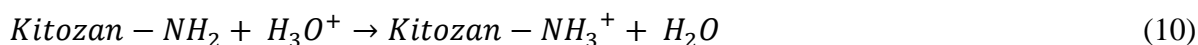
Ion cinka u interakciji s ligandima uobičajeno stvara tetraedarsku strukturu. U znanstvenim radovima predloženi su različiti modeli koji pokušavaju objasniti strukturu kompleksa kitozana i cinka [31].

Wang, Du i Liu [31], objavili su kako kompleksi između kitozana i cinka, s različitim omjerima kelata, keliraju različitu količinu cinka i isto tako pokazuju različita svojstva. Struktura molekula kompleksa kitozana i cinka prikazana je na slici 6. Slika 6.1) odgovara kompleksima koji nastaju s molarnim omjerom cinka i kitozana većim od 1:1, dok slike 6.2) i 6.3) prikazuju komplekse s molarnim omjerom jednakim ili manjim od 1:1.



Slika 6. Strukture kompleksa kitozana i cinka.

U istom radu utvrđeno je kako se pH vrijednost sustava s procesom kompleksiranja smanjuje i brže opada s većim sadržajem cinka u kompleksima. Stvaranje kompleksa moglo bi se opisati na temelju Lewisove teorije kiselina i baza. Zn<sup>2+</sup> ioni djeluju kao kiseline i akceptori elektronskog para, dok je kitozan baza koja daje elektronski par. Reakcije se mogu opisati na sljedeći način:



Karthikeyan i sur. [32], ispitivali su utjecaj veličine čestica kitozana, trajanja miješanja i utjecaj pH vrijednosti na stvaranje kompleksa između kitozana i cinka. Došli su do zaključka da smanjenjem veličine čestica kitozana raste koncentracija adsorbiranog cinka zbog veće specifične površine koja sudjeluje u reakciji. Sljedeći zaključak je bio da se adsorpcija cinka naglo povećava do šeste minute nakon čega dolazi do postizanja ravnoteže. Na kraju su zaključili kako je sam sustav pH ovisan zbog svojstva površine kitozana i sastava otopine. Broj aktivnih mjesta na površini kitozana mijenja se s promjenom pH. Najveća brzina adsorpcije cinka na kitozan je pri pH 7. Niska pH vrijednost dovodi do protoniranja amino skupina na površini kitozana što rezultira promjenom naboja i smanjenom kelatnom sposobnosti kitozana.

## 2.2. MIKROSFERE

Mikrosfere se definiraju kao male sferične čestice čiji se promjer kreće od 1  $\mu\text{m}$  do 1000  $\mu\text{m}$ . U nekim radovima nazivaju se i mikročestice. Mogu se proizvesti iz različitih prirodnih i sintetskih materijala. Trenutno su na tržištu komercijalno dostupne staklene, polimerne i keramičke mikrosfere. Postoje čvrste i šuplje mikrosfere, koje značajno variraju u gustoći i stoga se koriste u različitim primjenama. Šuplje mikrosfere obično se koriste kao aditivi za sniženje gustoće materijala, a primjena čvrstih mikrosfera ovisi o materijalu od kojeg su sačinjene. U tablici 1 prikazana su najvažnija svojstva mikrosfera [33]. Ovaj rad usmjerit će se na polimerne mikrosfere.

Tablica 1. Svojstva mikrosfera [33].

SVOJSTVO	OPIS
Veličina	Promjer Jednoličnost Raspodjela
Sastav	Gustoća Indeks refrakcije Hidrofobnost/hidrofilnost Nesferično vezanje

Površina	Reaktivne grupe Stupanj funkcionalizacije Naboj
Posebna svojstva	Vidljiva boja

Najčešće korištene polimerne mikrosfere su polietilenske i polistirenske. Polistirenske mikrosfere koriste se u biomedicinskim primjenama zbog njihove sposobnosti olakšavanja taloženja stanica. Proteini i ligandi se brzo i trajno adsorbiraju na polistiren, što čini polistirenske mikrosfere prikladnim za medicinska istraživanja [33].

Također, mikrosfere se mogu proizvesti iz proteina ili polimera koji su biorazgradljivi u prirodi. Važnost mikrosfera je u njihovoj maloj veličini koja im omogućuje da su otpornije na sile kompresije i smicanja što dovodi do njihove dulje trajnosti, a samim time i dulje trajnosti tkiva u koje se mikrosfere ugrađuju [8]. Sve je veća primjena biorazgradljivih polimernih mikrosfera u farmaceutskoj industriji i biomedicini. Mogu se koristiti za:

- dostavu cjepiva i antitijela;
- ciljanu dostavu lijeka;
- kao potpore za stanice i tkiva;
- presađivanje kostiju;
- kao nosači lijekova s produljenim djelovanjem [6].

Primjena terapije lijekom inkapsuliranim u mikrosferama omogućuje pažljivije otpuštanje lijeka na oboljela mjesta, što ovisi o izboru i kombinacije lijeka i nosača (polimera). Ukupno oslobođena doza lijeka i polimera može se prilagođavati radi postizanja željenog rezultata. Mikrosfere se također mogu razviti u optimalni sustav za dostavu lijeka kako bi se osigurao željeni profil otpuštanja. Sustavi na temelju mikrosfera mogu povećati životni vijek aktivnih sastojaka i kontrolirano otpuštanje bioaktivne supstance. Budući da su malih veličina, mikrosfere imaju veliki omjer površine prema volumenu te se mogu primijeniti za kontrolirano otpuštanje netopljivih lijekova [1].

Neke od prednosti i nedostataka upotrebe mikrosfera u biomedicini prikazane su u tablici 2.

Tablica 2. Prednosti i nedostaci upotrebe mikrosfera u biomedicini [33].

PREDNOSTI	NEDOSTACI
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Konstantan i produljen terapijski učinak.</li> <li>2. Smanjena učestalost administracije lijeka.</li> <li>3. Injekcijska administracija u tijelo zbog sfernog oblika i male veličine.</li> <li>4. Bolja iskoristivost lijeka i time poboljšavaju bioraspoloživost.</li> <li>5. Kontrolirana razgradnja i otpuštanje lijeka.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Modificirano otpuštanje mikrosfera iz formulacija.</li> <li>2. Brzina otpuštanja lijeka ovisi o različitim faktorima.</li> <li>3. Formulacije s kontroliranim otpuštanjem sadrže veće količine lijeka i svaki gubitak karakteristika mikrosfera može dovesti do toksičnosti.</li> <li>4. Ovakvi oblici administracije ne smiju se zgnječiti ili žvakati.</li> </ol>

### 2.2.1. PROIZVODNJA MIKROSFERA

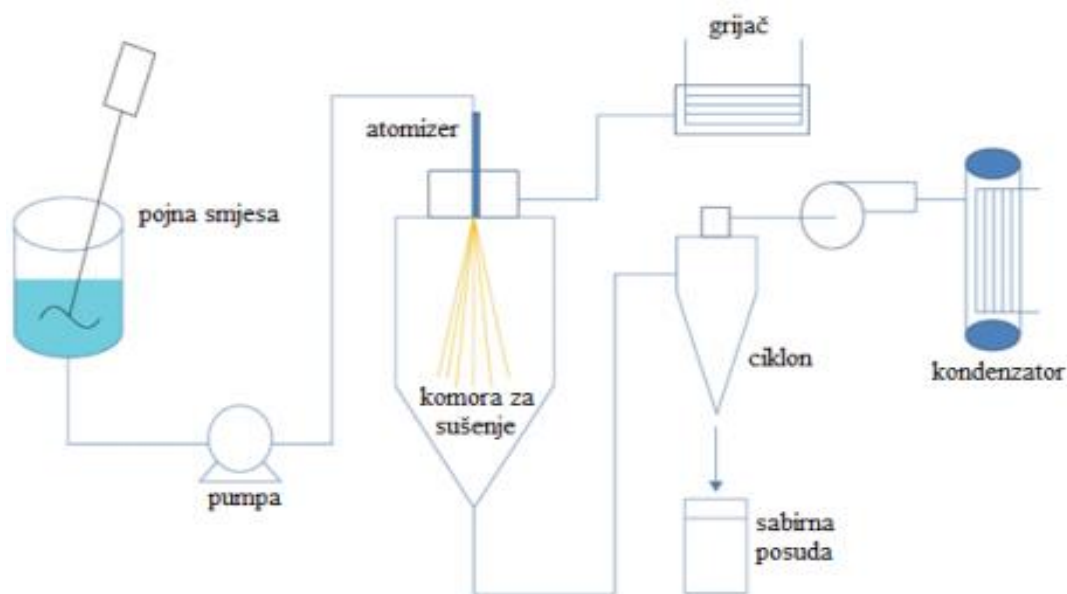
Izbor tehnike za proizvodnju mikrosfera najviše ovisi o samom materijalu od kojeg će se mikrosfere proizvesti. Postoje mnogi fizikalno-kemijski čimbenici koji se mogu kontrolirati u proizvodnji mikrosfera, među kojima su veličina čestica, molekulska masa polimera, omjer polimera i lijeka, ponovljivost, raspršenost u vodenim sredstvima za injektiranje u organizam itd. [6].

Najvažnije tehnike proizvodnje mikrosfera su:

- tehnike jednostruke emulzije
- tehnike dvostruke emulzije
- polimerizacija (suspencijska, emulzijska)
- tehnika mikroemulzije
- sušenje raspršivanjem
- isparavanje otapala
- kemijsko poprečno povezivanje
- toplinsko poprečno povezivanje
- korištenje visokog napona (elektroštrcanje) [6, 7].

Najčešće korišteni postupci za proizvodnju mikrosfera su suspenzijska i emulzijska polimerizacija. Metode su vrlo jednostavne, no negativna strana ovih postupaka je primjena toksičnih organskih otapala kao sredstva za umreživanje i jačanje mikrosfera. Time se narušava biokompatibilnost samih mikrosfera i ograničava njihova primjena u biomedicinskom području [6].

Nadalje, sušenje raspršivanjem, prikazano na slici 7, vrlo je česta i korisna tehnika za proizvodnju mikrosfera koje se koriste za lijekove za oralnu i nazalnu primjenu [6].



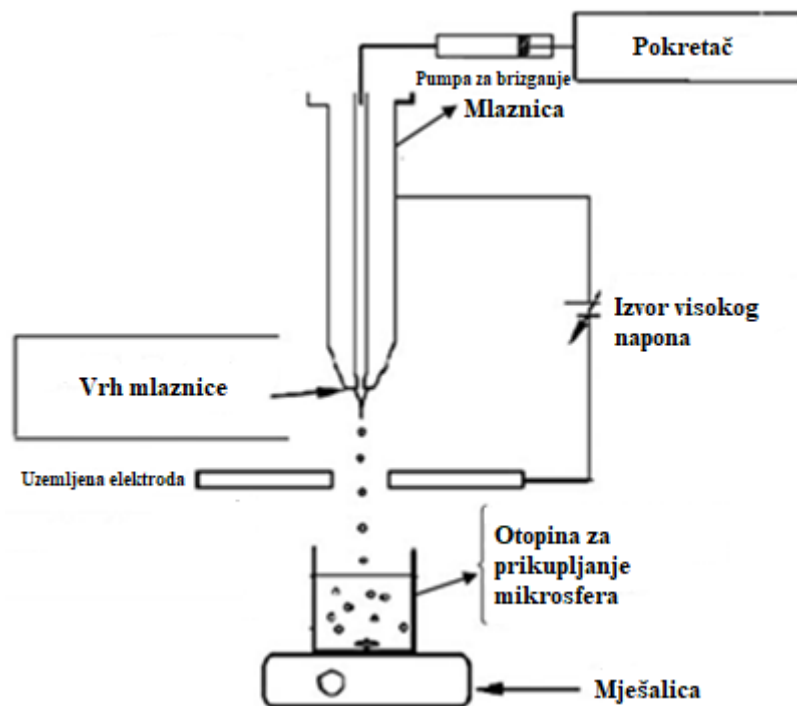
Slika 7. Proizvodnja mikrosfera metodom sušenja raspršivanjem.

U ovoj metodi polimer se prvo mora otopiti u prikladnom hlapivom organskom otapalu kao što su diklormetan ili aceton. Zatim se lijek u krutom obliku dispergira u otopini polimera pod velikom brzinom homogenizacije. Ova se disperzija zatim atomizira u struji vrućeg zraka. Raspršivanje dovodi do stvaranja malih kapljica iz kojih otapalo trenutno isparava dovodeći do stvaranja mikrosfera. Čestice se odvoje od vrućeg zraka pomoću ciklonskog separatora, dok se otapalo uklanja vakuumskim sušenjem. Metoda je vrlo fleksibilna i ponovljiva te kvaliteta nastalih prašaka ostaje konstantna tijekom cijelog sušenja. Moguće je dobiti porozne čestice što može smanjiti nasipnu gustoću samog proizvoda [7]. Veliki nedostatak ove tehnike je skupa i glomazna oprema. Također je ukupna toplinska učinkovitost veoma niska, jer velike količine zagrijanog zraka prolaze kroz komoru bez



kontakta s česticama. Mikrosfere pripremljene ovom metodom različitih su veličina, u rasponu od nekoliko mikrometara do nekoliko desetaka mikrometara, i imaju relativno velike varijacije u sferičnosti. Za proizvodnju manjih mikrosfera potrebna je suha okolina, što umanjuje primjenjivost ove metode [6].

Elektroštrcanje (engl. *electro-spraying*) je tehnika u kojoj se iz viskoznih tekućina mogu proizvesti male kapljice. Aparatura potrebna za ovu tehniku prikazana je na slici 8 [34].



Slika 8. Proizvodnja mikrosfera pomoću visokog napona [34].

Ideja o primjeni električnog polja između kapilarnog vrha, kao što je igla, i ravne elektrode iskorištena je za smanjenje promjera samih kapljica. Dodatna sila (električno polje) u smjeru gravitacije može nadvladati kapilarnu silu na vrhu igle, tj. površinsku napetost polimerne otopine koja se dozira na vrhu igle. Primjena električnog polja tijekom štrcanja tekućine omogućuje manipulaciju veličine i oblika kapljica. Kombiniranjem metoda elektroštrcanja i metoda neutralizacije kapljica moguće je dobiti sferne čestice s ravnomjernom raspodjelom veličina. Naime, veličina čestica može se lako kontrolirati intenzitetom električnog polja (naponom). Mnogo je parametara koji su ključni u proizvodnji mikrosfera ovom metodom, a neki od njih su radno područje, promjer igle, brzina protoka,

vrijednost napona, viskoznost otopine, izolacija aparature i mnogi drugi. Prednosti ove metode nad ostalim metodama su proizvodnja čestica jednolične veličine, uske raspodjele, brzina same metode i jednostavnost tehnike koja omogućuje proizvodnju mikrosfera u jednom koraku [8, 7, 35].

U današnje vrijeme glavna upotreba mikrosfera je u biomedicini i farmaceutskoj industriji i to najčešće u svrhu inkapsulacije i dostave lijeka. Kao što je već spomenuto, mikrosfere mogu poslužiti kao nosači lijekova za kontrolirano otpuštanje. Stoga je i razvoj mikrosfera usmjeren prema biorazgradljivim i biokompatibilnim polimerima. U ovom radu, naglasak je stavljen na proizvodnju i svojstva mikrosfera na temelju kitozana.

### **2.2.2. MIKROSFERE KITOZANA**

Dosada su provedena brojna istraživanja primjene kitozana kao nosača i dostavljača lijekova ili cjepiva. Kitozan se danas već koristi za produženu dostavu lijeka i makromolekula. Međutim, mikrosfere kitozana predstavljaju bolju opciju zbog njihove sposobnosti neprekidnog oslobađanja lijeka i poboljšane biorasploživosti ciljanih molekula. Također, mikrosfere kitozana omogućuju unos hidrofilnih tvari preko epitelnih stanica. Jake interakcije između mikrosfera kitozana i tkiva mogu zadržati mikrosfere na ciljanom mjestu [4, 5].

Biorazgradljivost i biokompatibilnost mikrosfera kitozana igraju važnu ulogu u metaboličkom procesu čovjeka. Otkriveno je kako je za adsorpciju polimera u tijelu veoma važna molekulska masa (30 – 40 kDa) koja ovisi o tipu polimera. Kada je molekulska masa veća od granične, tada je razgradnja polimera neophodna za njegovo uklanjanje iz tijela. Lizozomi i nekoliko bakterijskih enzima pokazuju razgradnju mikrosfera kitozana kod kralježnjaka. Također je utvrđeno da biorazgradnja mikrosfera kitozana ovisi o njegovom stupnju deacetilacije. Brzina razgradnje se smanjuje povećanjem stupnja deacetilacije. Dokazano je kako se mikrosfere kitozana dovoljno razgrađuju i ispravno uklanjaju iz organizma kada se primjenjuju u adekvatnim uvjetima [5].

Važno je spomenuti kako svojstvo mukoadhezije predstavlja još jednu moguću primjenu mikrosfera kitozana za poboljšanje adsorpcije lijeka, jer pozitivno nabijeni kitozan reagira s anionskim slojem sluznice. Ta adhezija nudi razne prednosti za pojačano unošenje terapijskih cjepiva na mjesto indukcije:

- mukoadhezivne mikrosfere kitozana mogu značajno smanjiti brzinu razgradnje cjepiva na apsorpcijskoj membrani osiguravajući veću interakciju s crijevnom sluznicom;
- adhezija mikrosfera kitozana s inkapsuliranim cjepivom osigurava dodatnu pogonsku silu na sloj sluznice zbog visokog gradijenta koncentracije prema adsorpcijskoj membrani;
- mukoadhezijska svojstva mikrosfera kitozana omogućuju produženo vrijeme djelovanja na mukoznom tkivu, što dovodi do apsorpcije lijeka kroz duži vremenski period i tako poboljšava njegovu biodostupnost [36, 37].

Bodmeire i Paeratakul [38] već su 1989. g. pripremili mikrosfere kitozana u koje su ugradili *Indometacin*, slabo topljivi lijek. Prikazali su kako ionski karakter kitozana omogućuje bolju topljivost samog lijeka te su utvrdili produljeno otpuštanje lijeka u usporedbi s neinkapsuliranim lijekom.

Nishioka i sur. [39], istraživali su utjecaj mikrosfera kitozana na profil otpuštanja *Cisplatina*, lijeka protiv karcinoma. Rezultati istraživanja pokazali su kako je otpuštanje lijeka iz mikrosfera kontinuirano i produženo u odnosu na čisti lijek. Također su utvrdili razgradnju mikrosfera kitozana pod djelovanjem enzima lizozoma.

Li i sur. [40], pripremili su mikrosfere kitozana kao nosače lijekova za lijek protiv karcinoma *5-fluorouracil* (5-FU). Rezultati su pokazali da je kitozan prikladan polimer kao nosač ovog lijeka te da je moguće usporiti brzinu otpuštanja lijeka. Ouchi i sur. [40], sintetizirali su jednake mikrosfere kako bi pratili njihov utjecaj na smanjenje nuspojava uzrokovanih antitumorskim lijekom. Rezultati su pokazali kako mikrosfere djeluju na smanjenje toksičnosti samog lijeka u visokom rasponu koncentracija.

Suheyly Kas [41], pripremio je mikrosfere kitozana različitim tehnikama kao što su umreživanje suspenzije, tehnike koacervacije i mehaničkim metodama. Zaključio je kako izbor tehnike najviše ovisi o primjeni mikrosfera. Na primjer, tehnike koacervacije vrlo su blagi procesi koji su prikladni za inkapsulaciju stanica. Takve kapsule na bazi kitozana koriste se za uzgajanje bacila i biljnih stanica. Osim inkapsulacije, stanice su se adsorbirale na površinu mikrosfera te su preživjele i nastavile proliferirati.

Ahmed i Aljaeid [42], usredotočili su se na ispitivanje mikrosfera i nanosfera pripremljenih od kompleksa kitozana i metalnih iona. Mikrosfere kitozana i srebra pokazale su biorazgradljivi karakter, dobru antimikrobnu aktivnost i produljeno djelovanje na ciljanim

stanicama. Veća antibakterijska aktivnost postignuta je već pri manjoj količini čestica zbog povećanja specifične površine. Također su zabilježili da mikrosfere kitozan-srebro pokazuju veliku stabilnost u odnosu na čiste mikrosfere kitozana, kada se koriste u svrhu nosača lijekova. Takve mikrosfere nisu agregirale tijekom šest mjeseci te su pokazale smanjenje razine glukoze u krvi kod dijabetičkih organizama. U istom istraživanju pripremljene su mikrosfere kitozan-bakar, koje su pokazale značajnu inhibiciju rasta mikroorganizama kao što su *S. aureus*, *Salmonella choleraesuis* i *E. coli*. Nadalje, zaključili su kako mikrosfere kitozana i metala općenito pokazuju poboljšane antimikrobne i farmakodinamičke aktivnosti te da su u usporedbi s čistim mikrosferama kitozana vremenski stabilnije.

Varshosaz [43], pak navodi kako je primjena mikrosfera kitozana neograničena te se njegova svojstva mogu iskoristiti u terapiji liječenja karcinoma, tkivnom inženjerstvu, ciljanoj dostavi lijekova, antivirusnim i antibiotskim lijekovima, implantaciji, cijepljenju, inkapsulaciji nutrijenata, dostavi gena, peptida i proteina te u nazalnoj, parenteralnoj, gastričnoj, plućnoj i kolonskoj administraciji lijekova.

Primjena mikrosfera kitozana u biomedicinskom području kao nosača za dostavu lijekova uključuje neophodnu validaciju na specifičnim staničnim fenotipovima. Osnovna klasifikacija biomedicinskih materijala temelji se na jednostavnim testovima toksičnosti, citotoksičnosti i biokompatibilnosti prije detaljnih i kompleksnih *in vitro* staničnih kultura.

### **2.2.3. BIOLOŠKA SVOJSTVA MIKROSFERA**

Biološka svojstva materijala općenito obuhvaćaju toksičnost, bioinerciju, biokompatibilnost, biorazgradnju i antimikrobna svojstva.

Toksičnost materijala se definira kao stupanj uništenja bilo kojeg dijela biološkog organizma. Taj pojam može se odnositi na cijeli organizam, poput čovjeka, životinje ili biljke, a također i na podstrukture, npr. stanice (citotoksičnost). Prilikom ispitivanja mikrosfera najčešće se određuje njihova citotoksičnost. Općenito, citotoksičnost materijala može se definirati kao mogućnost neke tvari da inducira staničnu smrt. Mjeri se preko životne aktivnosti stanica na dva moguća načina:

- mikroskopskim metodama u kojima se broje žive stanice (izravno testiranje)

- spektrofotometrijskim metodama u kojima se procjenjuje broj stanica pomoću mjerenja metaboličke aktivnosti (neizravno testiranje) [44].

Jedna od metoda određivanja citotoksičnosti je „Live/dead“ metoda koja omogućuje fluorescentno određivanje živih i mrtvih stanica metodom obojenja. Rezultati obojenja analiziraju se fluorescentnim mikroskopom. Preživjele stanice boje se zelenom bojom, dok mrtve stanice crvenom bojom. Boje koje se koriste za određivanje životne aktivnosti stanica ovom metodom su acetometoksi kalcein i etidijev homodimer [45].

Pogodna kvantitativna metoda za procjenu vijabilnosti stanica u doticaju s materijalom je *in vitro* MTT test citotoksičnosti. To je kolorimetrijska metoda za ispitivanje stanične metaboličke aktivnosti uz pomoć bojanja (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol bromid)-om. MTT test daje kvantitativnu procjenu proliferacije i citotoksičnosti mjerenjem aktivnosti mitohondrijskih enzima koji reduciraju tetrazonijeve soli (MTT) u kristale formazana koji se otapaju zakiseljenim izopropil alkoholom. Otopina koja nastaje ljubičaste je boje i spektrofotometrijski se kvantificira pomoću čitača za mikrotitanske pločice pri valnoj duljini od 570 nm.

MTT test se može provesti na dva načina, ekstrakcijskom metodom i izravnom metodom. Razlika u načinu provođenja je ta da se u ekstrakcijskoj metodi analizira ekstrakt ispitivanog materijala dobiven inkubacijom materijala u hranjivom biološkom mediju koji se koristi za uzgajanje stanica. U izravnoj metodi stanice se nasađuju direktno na materijal te se uzgajaju određeni period u doticaju s istraživanim materijalom. Prednosti MTT testa su njegova točnost, jednostavnost, brzina i niska cijena [46].

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

U ovom radu korištene su dvije vrste kitozana:

- Kitozan nižeg stupnja deacetilacije (MC75;  $M = 190\ 000 - 210\ 000\ \text{g mol}^{-1}$ ,  $DD > 75\%$ ; Sigma). Eksperimentalno određeni  $DD = 73,1 \pm 4,4\%$  [47]
- Kitozan visokog stupnja deacetilacije (MC95;  $M = 100\ 000 - 300\ 000\ \text{g mol}^{-1}$ ,  $DD = 95\%$ ; Across Organics). Izmjereni maseni prosjek molekulskih masa  $\overline{M}_w \approx 222,000$  [48].

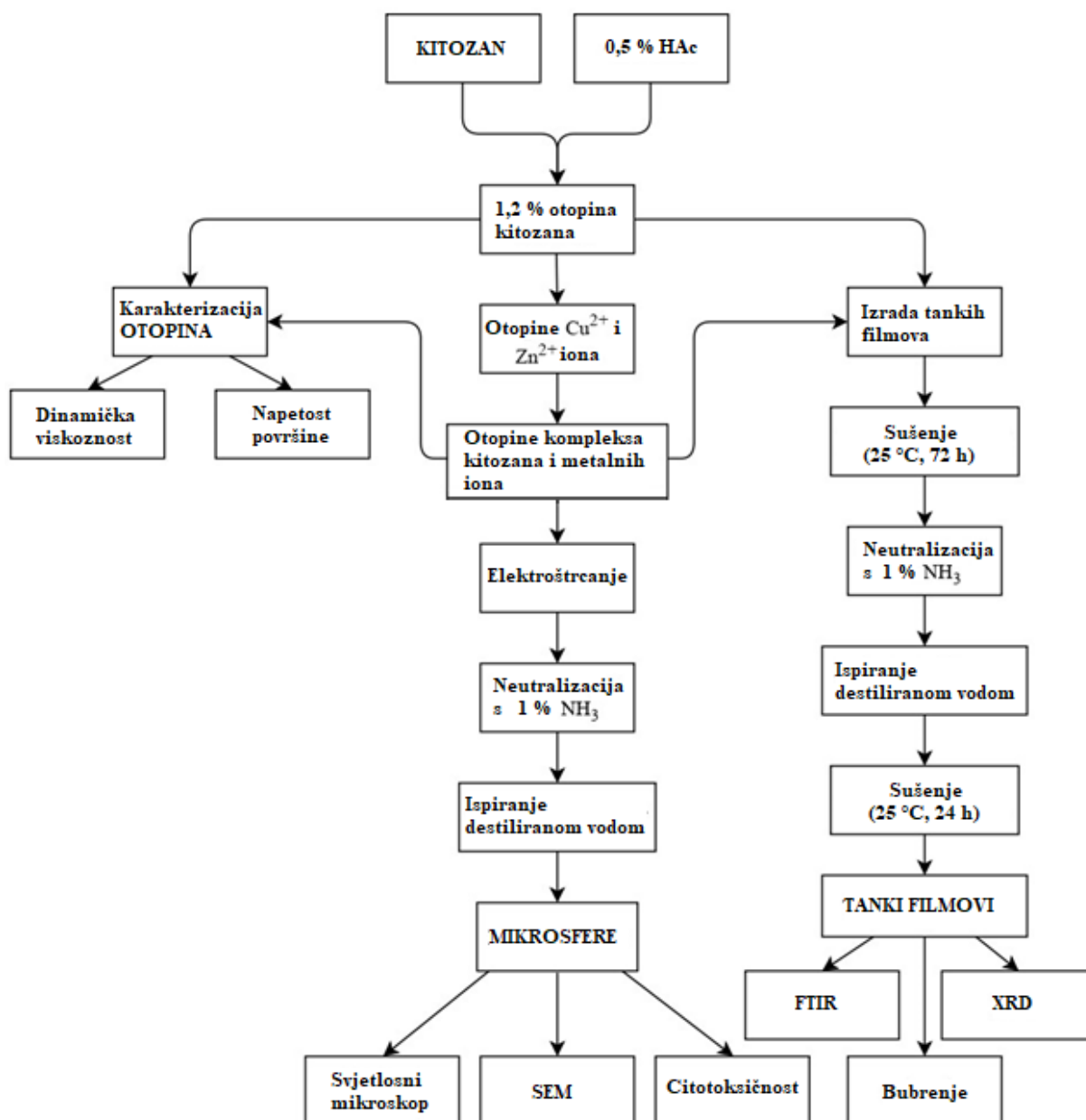
Ostale kemikalije korištene u ovom radu su:

- Octena kiselina,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (HAc,  $\geq 99,8\%$ ; Sigma-Aldrich)
- Bakrov acetat monohidrat,  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times \text{H}_2\text{O}$  ( $\text{Cu}^{2+}$ ; Carlo Erba Reagents)
- Cinkov acetat dihidrat,  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\ \text{H}_2\text{O}$  ( $\text{Zn}^{2+}$ ; Honeywell)
- Amonijak,  $\text{NH}_3$  (28 %; BDH Prolabo)
- Natrijev hidroksid, NaOH (Gram-Mol d.o.o.)
- Natrijev fosfat monobazični,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (Kemika, Zagreb)
- Kalijev klorid, KCl (Gram-Mol d.o.o.)
- Bezvodni dinatrijev hidrogen ortofosfat (Fisher Chemical)
- Kalijev fosfat,  $\text{K}_3\text{PO}_4$  (Acros Organics)
- Natrijev klorid, NaCl (Carlo Erba Reagents)

Svi korišteni reagensi su analitičkog stupnja čistoće.

#### 3.2. Priprema istraživanih materijala

Shematski prikaz tijeka pripreme i provedenih analiza na pripremljenim materijalima prikazan je na slici 9. Istraživani kompleksi kitozana i metalnih iona, kao i čiste polimerne otopine, pripremljeni su u obliku tankih filmova radi jednostavnije karakterizacije te u obliku mikrosfera.



Slika 9. Shematski prikaz tijeka pripreme uzoraka i provedenih analiza.

### 3.2.1. Priprema polimernih otopina

Prašak kitozana (MC75, MC95) otopljen je u 0,5 %-tnoj ( $w/w$ ) otopini octene kiseline čime je dobivena 1,2 %-tna ( $w/w$ ) otopina polimera. Otopinu MC75 bilo je potrebno profiltrirati pomoću Büchnerovog lijevka kako bi se uklonio netopljivi ostatak.

### 3.2.2. Priprema otopina kompleksa kitozana i metalnih iona

Za pripremu otopina kompleksa kitozana i metalnih iona dodane su različite koncentracije  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  iona u prethodno pripremljenu MC75, odnosno MC95 otopinu uz snažno miješanje preko noći. Kompleksi s MC75 i MC95 pripremljeni su s jednakim molarnim omjerom amino skupina i metalnog iona.

Količina metalnih iona dodana je kako bi molarni omjer glukozaminskih jedinica kitozana : metalni ion ( $n(\text{NH}_2) : n(\text{Me}^{2+})$ ) iznosio kako slijedi: za komplekse s bakrom  $n(\text{NH}_2) : n(\text{Cu}^{2+}) = 1 : 0,009$  i  $1 : 0,018$  (u nastavku rada Cu 0,009 i Cu 0,018) te za cink  $n(\text{NH}_2) : n(\text{Zn}^{2+}) = 1 : 0,09$  i  $1 : 0,18$  (u nastavku rada Zn 0,09 i Zn 0,18).

Volumni omjer otopine kitozana i metalnog iona iznosio je 7,33 kako bi maseni udio kitozana u konačnom kompleksu iznosio oko 1%.

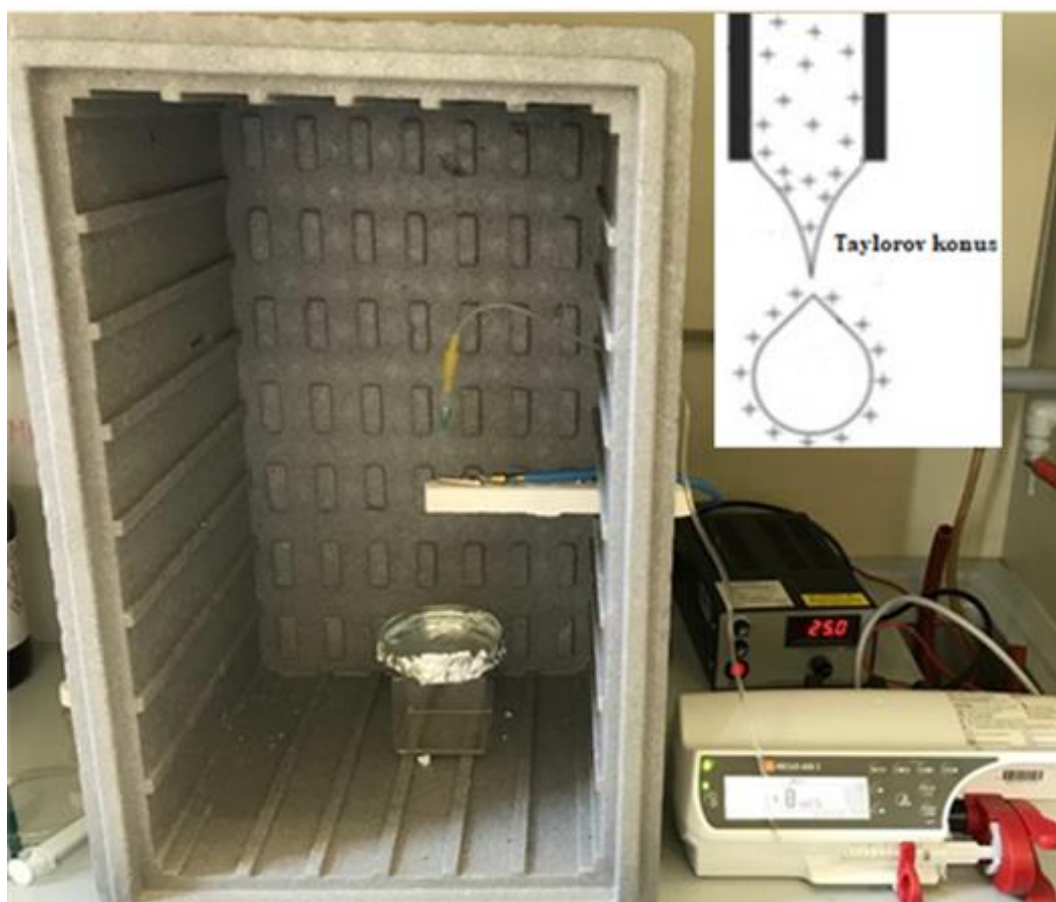
### 3.2.3. Priprema tankih filmova

Tanki filmovi pripremljeni su metodom izlivanja uz naknadno sušenje (engl. *solvent casting*). 40 mL čistih otopina kitozana, odnosno kompleksa, izliveno je u posudice te sušeno pri sobnoj temperaturi ( $\pm 25$  °C) 72 sata. Potom, osušeni filmovi su neutralizirani s 1 %-tnom otopinom  $\text{NH}_3$  tijekom 24 sata. Nakon neutralizacije, filmovi su višestruko ispirani destiliranom vodom te osušeni pri sobnoj temperaturi.

### 3.2.4. Proizvodnja mikrosfera kompleksa kitozana i metalnog iona

Za proizvodnju mikrosfera korištena je aparatura za elektroštrcanje kućne radinosti prikazana na slici 10. Aparatura se sastoji od generatora visokog napona, pumpe za injektiranje (Argus), šprice s iglom promjera 0,8 mm, izolacijske kutije i Petrijeve zdjelice za skupljanje proizvedenih mikrosfera (kolektor) obložene aluminijskom folijom. Šprica za doziranje otopine služila je kao jedan pol, dok Petrijeva zdjelica s aluminijskom folijom kao drugi pol između kojih je narinut visoki napon.





Slika 10. Aparatura korištena za proizvodnju mikrosfera.

Nepromjenjivi parametri korišteni za elektroštrcanje su: protok otopine od  $5 \text{ mL h}^{-1}$ , udaljenost između vrha igle i kolektora 10 cm te 30 mL 1 %-tne otopine  $\text{NH}_3$  kao sredstvo za neutralizaciju mikrosfera (kolektor). Utjecaj električnog polja na proizvodnju mikrosfera pratio se pri različitom iznosu napona: 20 i 25 kV. Nakon proizvodnje, suspenzija mikrosfera prebačena je u bočice s poklopcem te ostavljena još 24 sata pri sobnoj temperaturi radi završetka procesa neutralizacije. Konačno, mikrosfere su višestruko ispirane destiliranom vodom.

### 3.3. Metode karakterizacije

#### 3.3.1. Karakterizacija otopina kompleksa kitozana i metalnog iona

Za karakterizaciju čistih otopina kitozana te kompleksa kitozana i metalnih iona, izmjerene su gustoća, napetost površine i dinamička viskoznost.

##### 3.3.1.1. Gustoća

Gustoća ( $\rho$ , g cm<sup>-3</sup>) pripremljenih otopina izmjerena je pomoću aerometra pri 20 °C.

##### 3.3.1.2. Napetost površine

Napetost površine ( $\sigma$ , N m<sup>-1</sup>) određena je metodom stalagmometra. Ova metoda se zasniva na mjerenju veličine kapi koja se otkida s vrha kapilare. Pošto je ova metoda usporedna (indirektna), bilo je potrebno izmjeriti i napetost površine vode. Mjerenja svih otopina provedena su u triplikatima pri 20 °C.

##### 3.3.1.3. Viskoznost

Dinamička viskoznost ( $\eta$ , mPa s) određena je pomoću Höpplerovog viskozimetra gdje se mjeri vrijeme prolaska kuglice između definiranih oznaka. Karakteristike kuglica korištenih za mjerenje vremena prolaska dane su u tablici 3.

Tablica 3. Karakteristike kuglica za mjerenje viskoznosti pomoću Höpplerovog viskozimetra.

Kuglica	m (g)	Gustoća pri 20 °C (g cm <sup>-3</sup> )	Konstanta kuglice K (mPa cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )
1.	15,9900	8,109	0,12797
2.	14,3780	8,143	1,21580

Viskoznost otopina izračunata je prema jednadžbi (12):

$$\eta = t \times (\rho_1 - \rho_2) \times K \quad (12)$$

gdje  $\eta$  predstavlja dinamičku viskoznost,  $t$  vrijeme prolaska kuglice,  $\rho_1$  gustoću kuglice,  $\rho_2$  gustoću ispitivane otopine i  $K$  konstantu kuglice. Mjerenja su provedena u triplikatima pri 20 °C.

### 3.3.2. Identifikacija i karakterizacija tankih filmova

Tanki filmovi kitozana te kompleksa kitozana i metalnih iona identificirani su pomoću rendgenske difrakcijske analize (XRD) te okarakterizirani metodom bubrenja.

#### 3.3.2.1. Rendgenska difrakcijska analiza

Rendgenska difrakcijska analiza (XRD) provedena je pomoću instrumenta Shimadzu XRD-6000 uz  $\text{CuK}_\alpha$  zračenje. Mjerni raspon difrakcijskih kutova,  $2\theta$ , iznosio je od 10 do 70°, a brzina snimanja 0,02 ° s<sup>-1</sup>.

#### 3.3.2.2. Bubrenje

Bubrenje uzoraka istraženo je u tri različita medija: destilirana voda, fosfatni pufer (PBS) pH = 7,4 i fosfatni pufer (PBS) pH = 6,0. Ispitivani uzorci vagani su neposredno prije bubrenja ( $m_{\text{poč}}$ ) te potom inkubirani u medije na 24 sata pri 37 °C. Nakon bubrenja, uzorci su isprani destiliranom vodom te vagani ( $m_{\text{kon}}$ ). Mjerenja su provedena u kvadriplikatima. Kapacitet bubrenja materijala izračunat je prema jednadžbi (13):

$$\text{Kapacitet bubrenja} = \frac{m_{\text{kon}} - m_{\text{poč}}}{m_{\text{poč}}} \quad (13)$$

### 3.3.3. Karakterizacija mikrosfera kompleksa kitozana i metalnih iona

#### 3.3.3.1. Pretražna elektronska mikroskopija

Mikrostruktura proizvedenih mikrosfera istražena je pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM), TESCAN Vega3SEM Easyprobe pri energiji elektronskog snopa od 10 keV. Prije snimanja, uzorci su izloženi plazmi paladija i zlata u trajanju od 90 sekundi.

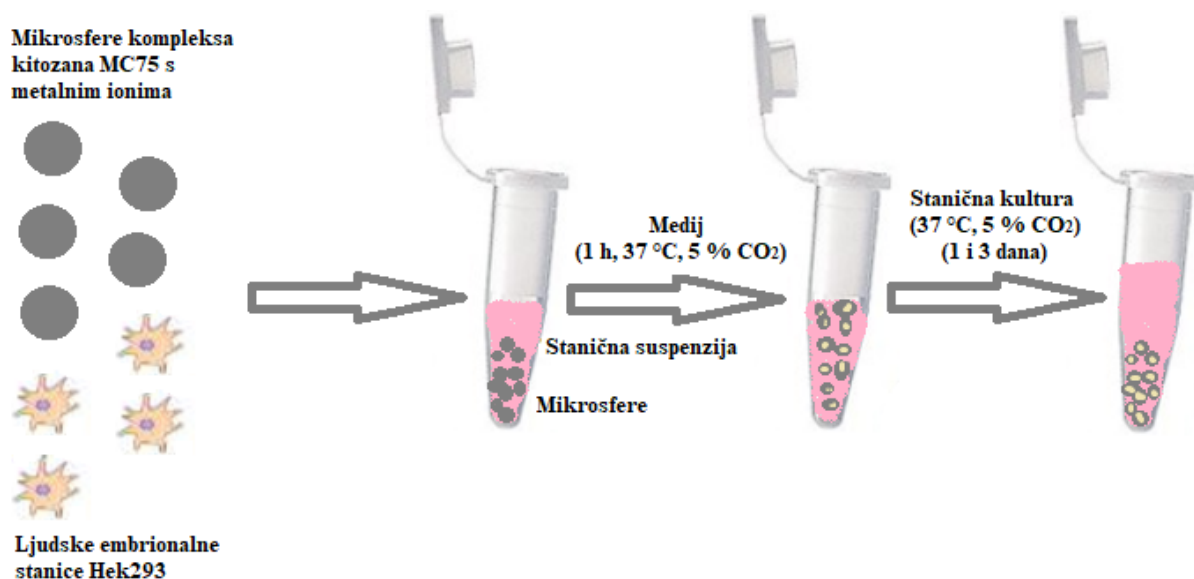
### 3.3.3.2. Određivanje veličine i raspodjele veličina mikrosfera

Veličina (promjer,  $\mu\text{m}$ ) i raspodjela veličina mikrosfera određena je uz pomoć svjetlosnog stereomikroskopa Olympus SZX16 pri uvećanju od  $1\times$  i optičkog mikroskopa BA200 Binocular Microscope pri uvećanju od  $10\times$ . Raspodjela veličina mikrosfera određena je na populaciji od 50 uzoraka.

### 3.3.4. Citotoksičnost mikrosfera

Test citotoksičnosti proveden je na ljudskim embrionalnim stanicama Hek293 uzgojenima u direktnom kontaktu s materijalom (direktni test). Neposredno prije stanične kulture, isprane sfere su dezinficirane u otopini penicilina/streptomicina i fungicida (3%) na 2 h pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nakon toga uslijedilo je ispiranje u PBS otopini tri puta te kondicioniranje mikrosfera u biološkom mediju (DMEM, engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) 24 sata pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Potom,  $20\text{ }\mu\text{L}$  suspenzije sfera je prebačeno u sterilne Eppendorf kivete na koje su nasadene Hek293 stanice u gustoći od  $3 \times 10^4$  stanica u  $20\text{ }\mu\text{L}$  DMEM medija dopunjenog s 10% goveđeg seruma i 1% penicilina/streptomicina. Kao takve, stanice su inkubirane 1 h u atmosferi zraka s 5%  $\text{CO}_2$  pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  radi prijanjanja na mikrosfere. Nakon jednog sata, stanicama je dodano po 1 mL medija te su inkubirane pri istim uvjetima sljedeća tri dana.



Slika 11. Shematski prikaz nasadivanja ljudskih embrionalnih stanica Hek293 na mikrosfere kompleksa.

Nakon određenog vremena kulture (1 i 3 dana), uklonjeno je 800  $\mu\text{L}$  medija te je dodano 20  $\mu\text{L}$  MTT boje (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol bromid) (Sigma-Aldrich, SAD) u svaku Eppendorf kivetu s koncentracijom od 0,5 mg  $\text{mL}^{-1}$ . Nakon 4 sata inkubacije pri 37 °C, MTT je uklonjen te su kristali nastalog formazana otopljeni dodatkom 400  $\mu\text{L}$  DMSO po kiveti. Nakon jednog sata pri sobnoj temperaturi, 100  $\mu\text{L}$  otopine prebačeno je u čistu mikrotitarsku pločicu s 96 bunarčića (engl. *96-well plate*) te je mjerenje provedeno na čitaču mikrotitarskih pločica ThermoLabSystems MultiskanEX Microplate Reader pri valnoj duljini od 570 nm. Kao negativna kontrola citotoksičnosti uzete su stanice uzgojene pri jednakim uvjetima bez prisutnosti materijala. Vijabilnost stanica izračunata je u odnosu na stanice uzgojene bez mikrosfera. Analiza je provedena u duplikatima.

### **3.3.5. Statistička obrada podataka**

Rezultati kvantitativnih analiza izraženi su kao srednja vrijednost uz standardnu devijaciju. Značajna razlika između svih grupa utvrđena je nakon statističke obrade podataka pomoću ANOVA *Single factor* analize uz značajnu razliku  $p < 0,05$ . Utvrđivanje značajne razlike između dvije grupe podataka provedeno je pomoću Scheffe testa uz značajnu razliku  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu pripremljene su otopine kitozana i kompleksa kitozana i metalnih iona, tanki filmovi kitozana i kompleksa te mikrosfere kompleksa. Za karakterizaciju polimernih otopina i kompleksa određene su gustoća, dinamička viskoznost te napetost površine. Filmovi kompleksa i čistih polimera identificirani su rendgenskom difrakcijskom analizom (XRD), dok je svojstvo bubrenja istraženo u vodi te fosfatnim puferima s različitim pH vrijednosti. Optičkom i elektronskom mikroskopijom određene su veličina i raspodjela veličina mikrosfera te je istražena njihova mikrostruktura.

### 4.1. Gustoća i viskoznost otopina

Gustoće polimernih otopina i otopina kompleksa (tablica 4) izmjerene su uz pomoć aerometra s ciljem dobivanja vrijednosti potrebnih za proračun daljnjih svojstava, dinamičke viskoznosti i napetosti površine.

Tablica 4. Vrijednosti gustoća otopina kitozana (MC75 i MC95) te kompleksa kitozan–metalni ion izmjerene pri 20 °C.

Uzorak	$\rho / \text{g cm}^{-3}$	Uzorak	$\rho / \text{g cm}^{-3}$
MC75	1,006	MC95	1,005
MC75 Cu 0,009	1,006	MC95 Cu 0,009	1,006
MC75 Cu 0,018	1,005	MC95 Cu 0,018	1,005
MC75 Zn 0,09	1,005	MC95 Zn 0,09	1,007
MC75 Zn 0,18	1,007	MC95 Zn 0,18	1,006

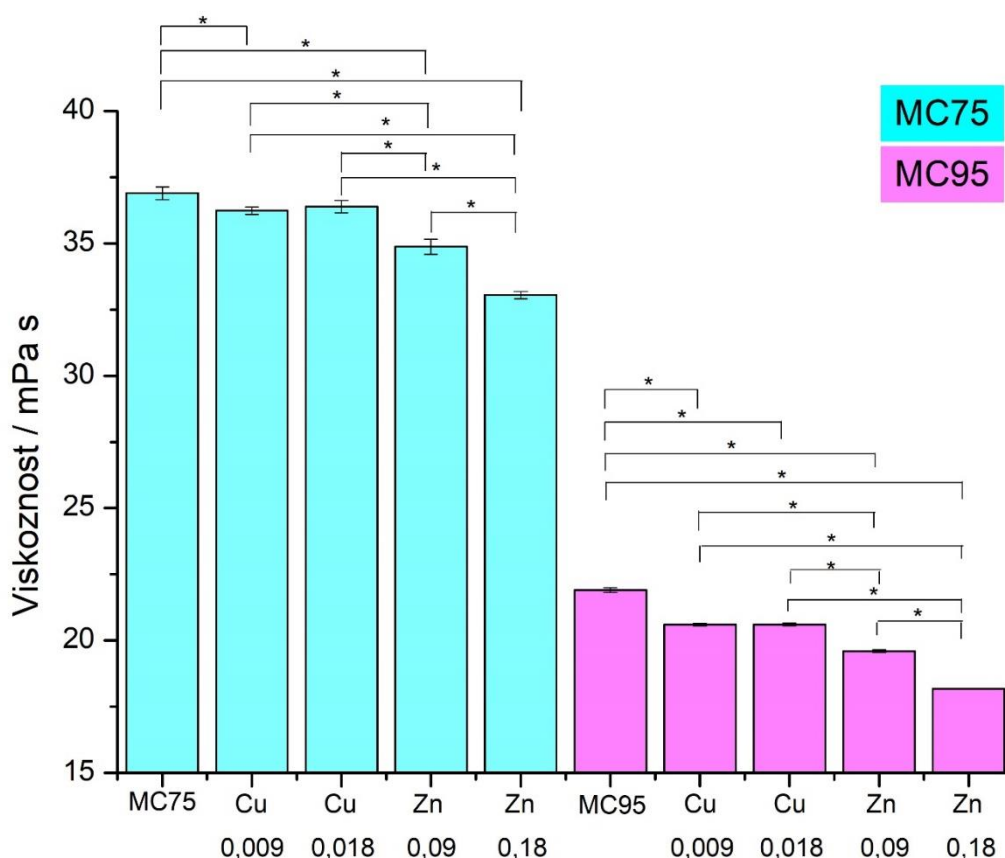
Vidljivo je kako se vrijednosti gustoća otopina kitozana, MC75 i MC95, te kompleksa neznatno razlikuju.

Na slici 12 prikazane su vrijednosti dinamičke viskoznosti otopina kitozana MC75 i MC95 te kompleksa. Viskoznost polimerne otopine je reološko svojstvo koje ovisi o hidrodinamičkom volumenu polimernog klupka u otopini, koje je pak ovisan o strukturi

makromolekule (duljina lanca i razgranatost), interakcijama između i unutar polimernih lanaca te interakcijama polimernih lanaca s molekulama otapala. Dodatno, na vrstu navedenih interakcija utječe temperatura, koncentracija polimera te sama struktura makromolekula [49]. Mark-Houwinkova jednadžba ( $[\eta] = KM_v^\alpha$ ) povezuje intrinzičnu viskoznost s viskozimetrijskim prosjekom molekulskih masa i interakcije polimer–otapalo izražene preko konstanti  $K$  i  $\alpha$  specifične za pojedini polimer–otapalo sustav pri određenoj temperaturi [50]. Iz toga je vidljivo da povećanje molekulske mase istog sustava pri istoj temperaturi dovodi do povećanja intrinzične viskoznosti. Prosjek molekulskih masa kitozana MC75 i MC95 su približno sličnih vrijednosti, stoga se pretpostavlja da molekulska masa polimera pri jednakoj koncentraciji otopine i jednakim otapalom neće imati značajan utjecaj na dinamičku viskoznost. Nasuprot tome, konstante  $K$  i  $\alpha$  ovise o temperaturi i stupnju deacetilacije te su eksperimentalno dobivene za određene sustave kitozan–otapalo [50]. Kitozan se ubraja u polimere krute strukture lanca neovisno o djelomičnoj neutralizaciji naboja lanca protuionom otapala. Dodatno, protonirani polisaharidi imaju tendenciju agregiranja u otopini što dodatno utječe na hidrodinamička svojstva.

Otopina kitozana MC75 kao i kompleksi MC75– $M^{2+}$  posjeduju veću viskoznost u odnosu na iste sustave pripravljene s kitozanom MC95. Ovakvo ponašanje se može pripisati utjecaju stupnja deacetilacije, tj. udjelu aaminskih skupina u lancu polisaharida. Prema literaturi [51], stupanj deacetilacije značajno utječe na viskoznost otopine kitozana. Što je veći stupanj deacetilacije kitozana, veći je i udio aaminskih skupina u odnosu na acetilamidne. Samim time se mijenjaju interakcije između polimernog lanca i iona otapala kao i međumolekulske interakcije polimernih lanaca, odnosno konformacija makromolekula. Prethodno istraživanje intrinzične viskoznosti različitih tipova kitozana [52], ukazalo je na različite vrijednosti Hugginsove konstante kao indikatora dobrote otapala (HAc/NaAc) za kitozane različitog  $DD$  (85 i 93%), pri čemu su definirali da kitozan s većim stupnjem deacetilacije ima jače polimer–polimer interakcije u odnosu na međudjelovanja polimer–otapalo. S obzirom na krutost lanaca polisaharida, za očekivati su općenito veće vrijednosti Hugginsove konstante. U kiselim otopinama, lanci kitozana se protoniraju pri čemu dolazi do porasta gustoće naboja uzduž lanca i time do izduženije konformacije lanca s manjim udjelom ispreplitanja. Na taj način, povećava se krutost lanca. Rezultat ovakvog ponašanja trebala bi biti veća viskoznost kitozana MC95 u odnosu na MC75. Nasuprot spomenutom istraživanju, u ovom radu je korišteno drugo otapalo te značajno veća koncentracija polimerne otopine što u konačnici utječe na viskoznost otopine. Dodatno, zaostatak netopljivog dijela kitozana MC75

nakon filtriranja otopine kao i sam izvor hitina te postupak deacetilacije hitina također može biti uzrok različitim reološkim svojstvima otopina kitozana karakteriziranih u ovom istraživanju. Također, potrebno je naglasiti da postoji veliki broj kontradiktornih rezultata istraživanja utjecaja stupnja deacetilacije na reološka svojstva otopina kitozana.



Slika 12. Vrijednosti dinamičke viskoznosti otopina kitozana (MC75 i MC95) te kompleksa određenih pri 20 °C. Značajna razlika između dvije grupe podataka definira se s vrijednosti  $p < 0,05$  (\*).

Najveću vrijednost viskoznosti, od 36 mPa s, ima otopina kitozana MC75. Nešto manje vrijednosti viskoznosti pokazuju kompleksi MC75 i metalnih iona. Dodavanjem  $\text{Cu}^{2+}$ , odnosno,  $\text{Zn}^{2+}$  iona u otopine kitozana dolazi do smještanja metalnih iona između lanaca kitozana, kao što je pokazano u prethodnim istraživanjima konformacije makromolekula u kompleksima [26, 27]. Primjenom ANOVA testa utvrđeno je kako ne postoji značajna razlika između viskoznosti kompleksa MC75 Cu 0,009 i MC75 Cu 0,018. Isto ponašanje vidljivo je i kod kompleksa MC95– $\text{Cu}^{2+}$ . Nadalje, kompleksi kitozan– $\text{Zn}^{2+}$  pri najvećoj koncentraciji



cinka pokazuju najniže vrijednost dinamičke viskoznosti. Smanjenje viskoznosti otopina kitozana pri većim koncentracijama metalnog iona može biti posljedica smanjenja elektrostatskog odbijanja između protoniranih lanaca kitozana [53].

## 4.2. Napetost površine otopina

Na slici 13 prikazane su vrijednosti napetosti površine otopina kitozana MC75 i MC95 te kompleksa.

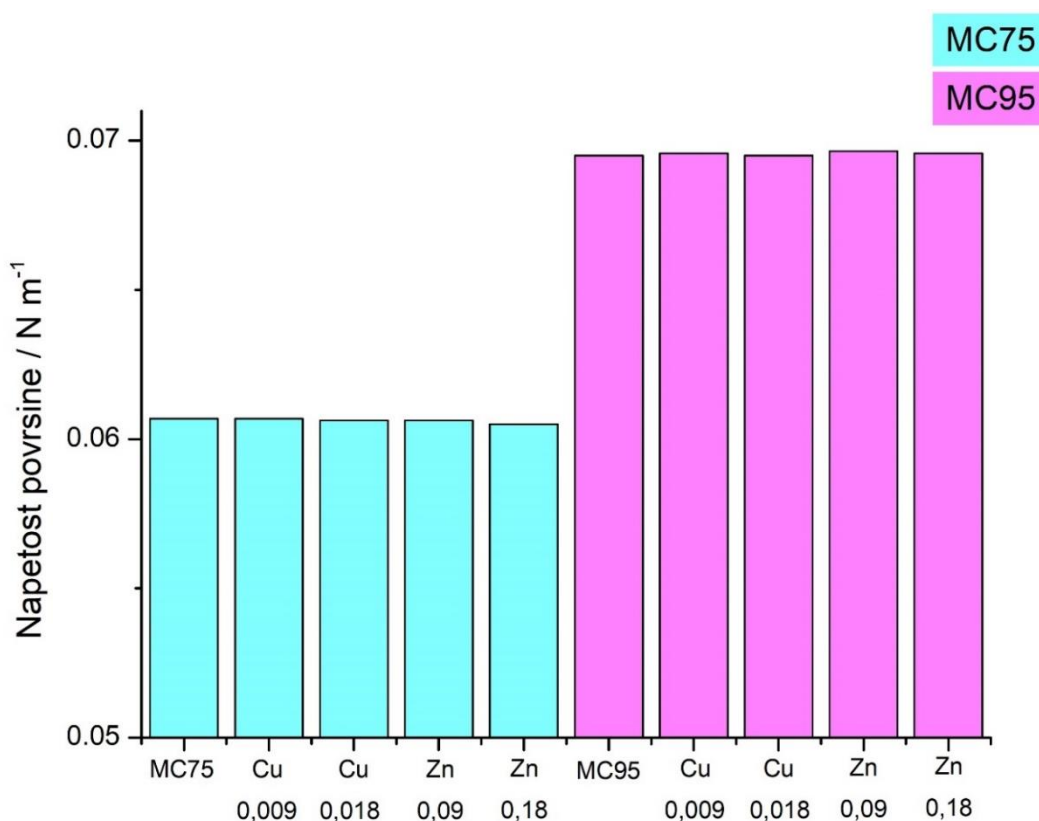
Površinska napetost definira se kao mjera za silu kojom je potrebno djelovati na molekule na površini tekućine da one pokazuju jednaku silu međudjelovanja kao i molekule u njenoj unutrašnjosti. Uslijed napetosti površine tekućina se skuplja u kapljice koje najčešće imaju oblik kugle [54]. Prema literaturi [55], napetost površine, gravitacijska sila i jakost električnog polja tri su značajne karakteristike koje utječu na izvlačenje pravilnih kapljica manjih dimenzija uz djelovanje električnog polja. Batein i suradnici [55], istraživali su ovisnost napetosti površine na proizvodnju kapljica uz pomoć djelovanja električnog polja te su došli do zaključka da je prilikom povećanja napetosti površine potrebno povećati jakost električnog polja kako bi se proizvele kapljice pravilnog oblika.

Površinska napetost kitozana i njegovih derivata već je istraživana, međutim Qun i Ajun [56], nadodaju kako nedostaju sistematizirana istraživanja utjecaja molekulske mase, stupnja deacetilacije i svojstva otopine na površinsku napetost otopina kitozana. Također, utjecaj stupnja deacetilacije na konformaciju lanca jest istražena, međutim i dalje ne postoji poveznica između njih te su rezultati istraživanja kontradiktorni.

Iz rezultata je vidljivo da napetost površine kitozana MC95 je veća od MC75 kao i kompleksa MC95–metalni ion u odnosu na komplekse s MC75, te se kreće oko vrijednosti napetosti površine čiste vode ( $\sigma = 7,28 \text{ Nm}^{-1}$ ). Napetost površine razrijeđene otopine kitozana je većinski određena vodikovim vezama, hidrofobnim i elektrostatskim interakcijama [56]. Kao što je već spomenuto, protonirane aminske skupine kitozana uzrokuju elektrostatske interakcije između i unutar lanaca te ovise o pH vrijednosti i ionskoj jakosti otopine. Povećanjem ionske jakosti dolazi i do zasjenjenja pozitivnog naboja lanca protuionom pri čemu dolazi do kontrakcije molekula [57]. Uslijed velikog broja hidroksilnih i acetilamidnih grupa stvaraju se jake vodikove veze. Osim toga, hidrofobni segmenti kitozana (acetilamidne

skupine i glikozidni prsten) igraju značajnu ulogu u hidrofobnim interakcijama. To znači da bi promjena stupnja deacetilacije trebala promijeniti elektrostatske i hidrofobne interakcije te vodikove veze [58]. Veći udio acetilamidnih skupina bi mogao stvoriti jače hidrofobne interakcije i vodikove veze, dok bi veći udio aaminskih skupina značio prirodu polielektrolita, odnosno širenje konformacije nabijenih lanaca pri nižoj ionskoj jakosti. Qun i Ajun [56], predložili su da pri koncentraciji većoj od  $6 \times 10^{-3} \text{ kg L}^{-1}$  napetost površine otopine kitozana raste s porastom *DD*-a kao posljedica stvaranja većeg broja međumolekulskih vodikovih veza („zapatljanja“).

Ukoliko usporedimo vrijednost napetosti površine otopine kitozana MC75 i kompleksa MC75–metalni ion, uočljivo je kako vrijednosti blago opadaju povećanjem koncentracije metalnog iona u otopini. Međutim, značajni pad napetosti površine nije vidljiv kod oba kitozana. Može se zaključiti da dodatak metalnih iona pri istraživanim koncentracijama ne utječe na napetost površine otopine kitozana.



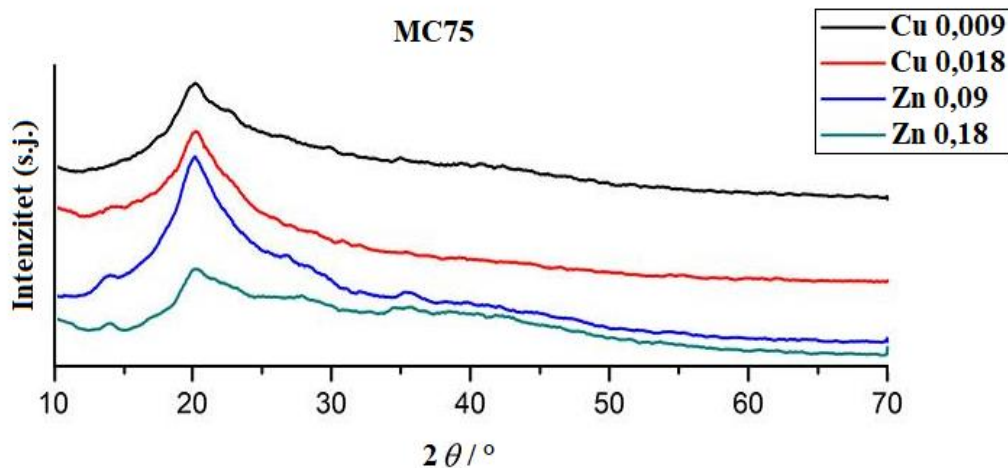
Slika 13. Napetost površine otopina kitozana MC75 i MC95 te kompleksa određenih pri 20 °C.

### 4.3. XRD analiza filmova

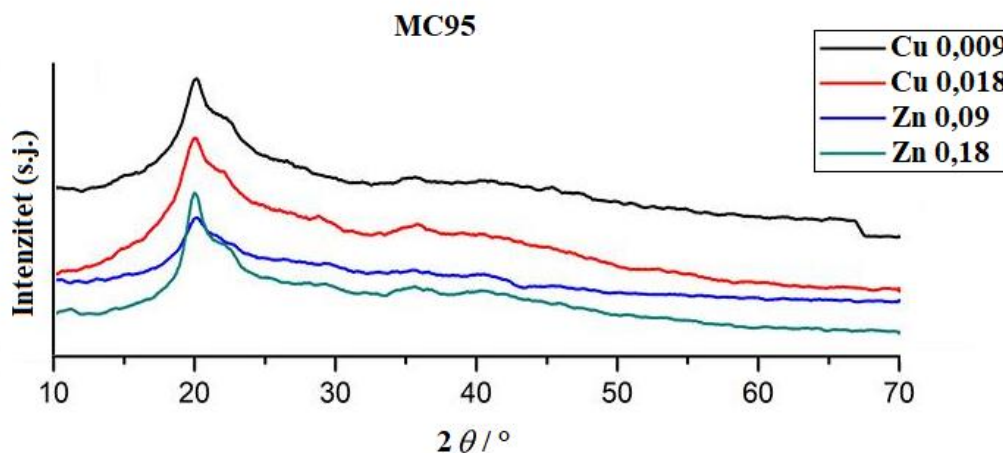
Difraktogrami filmova kompleksa kitozana (MC75 i MC95) i metalnih iona prikazani su na slikama 14 i 15.

Prema literaturi [59], difraktogram kitozana pokazuje karakterističan široki difrakcijski maksimum pri otprilike  $2\theta = 20^\circ$ . Nie i suradnici [60], istraživali su utjecaj koncentracije bakrovih (II) iona na strukturu i sastav hidrogelova kitozana pripremljenih u lužnatom mediju (NaOH). Rezultati XRD analize pokazali su da u slučaju dodatka  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  otopini kitozana, kao kontrolnog uzorka, dolazi do pojave novih maksimuma koji odgovaraju bakrovom (II) hidroksidu. Međutim, dodatkom  $\text{Cu}^{2+}$  iona iz prekursorskih otopina ne dolazi do stvaranja kristalnih faza bakrovih spojeva nakon tretmana u NaOH, iz čega su zaključili o nastajanju kompleksa kitozana i bakrovih (II) iona.

Na difraktogramima kompleksa kitozana MC75/MC95 i bakrovih (II), odnosno cinkovih (II) iona uočava se široki difrakcijski maksimum koji odgovara kitozanu te izostanak pojave novih jasno izraženih difrakcijskih maksimuma koji bi odgovarali nastanku kristalnih faza bakra, odnosno cinka. Ovakav rezultat može biti indicacija izostanka kristalnih anorganskih faza, tj. da je došlo do stvaranja kompleksa između kitozana i  $\text{Cu}^{2+}$ , odnosno,  $\text{Zn}^{2+}$  iona.



Slika 14. Difraktogram filmova kompleksa MC75 i metalnih iona.



Slika 15. Difraktogram filmova kompleksa MC95 i metalnih iona.

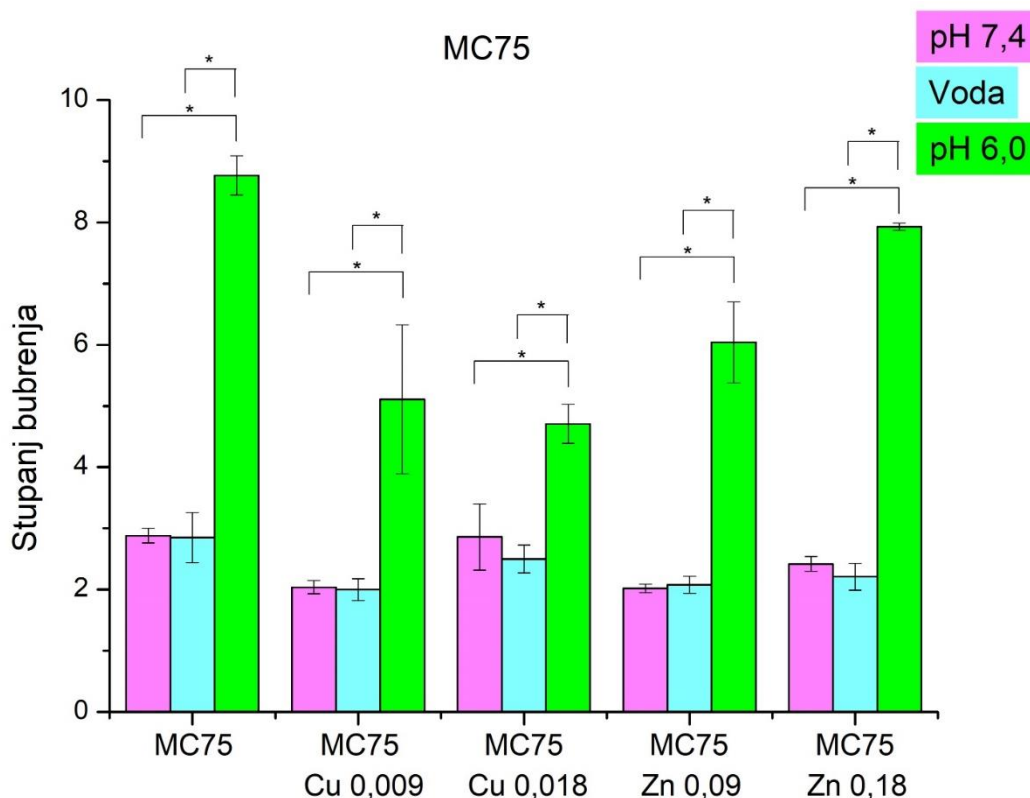
#### 4.4. Bubrenje filmova

Na slikama 16 i 17 prikazano je bubrenje filmova kitozana MC75 i MC95 te kompleksa s metalnim ionima u različitim medijima pri 37 °C. Bubrenje kitozana ovisi o nekoliko ključnih faktora kao što su molekulska masa, stupanj deacetilacije, poroznost, mikrostruktura, pH vrijednost medija, ionska jakost itd. [61]. U ovom radu, pripremljeni su filmovi kitozana približnih molekulskih masa kako bi se dobio uvid utjecaja pH vrijednosti medija i koncentracije metalnih iona na sposobnost apsorpcije kitozana različitih stupnjeva deacetilacije.

Usporedbom stupnja bubrenja kitozana MC75 i MC95 može se vidjeti kako kitozan MC75 pokazuje značajno veću sposobnost bubrenja u odnosu MC95 i to: 7 puta veće bubrenje u fosfatnom puferu pH 6,0 te 1,5 puta veće bubrenje u vodi. Najmanja razlika u stupnju bubrenja ova dva tipa kitozana uočava se u slučaju pufera pH 7,4. Wenling i suradnici [62], ispitali su utjecaj stupnja deacetilacije na svojstva bubrenja filmova kitozana sličnih molekulskih masa. Došli su do zaključka da su udio hidrofilnih skupina i međumolekulske interakcije dva glavna faktora koja utječu na bubrenje filmova kitozana. Stoga je za očekivati da porastom *DD*-a, odnosno, broja aaminskih skupina bi u konačnici povećalo kapacitet bubrenja. Međutim, njihovi rezultati pokazali su da porastom *DD*-a dolazi do smanjenja stupnja bubrenja uslijed jačih međumolekulskih sila u suhim filmovima kitozana koje sprečavaju ulazak medija u materijal. Dodatno, veći stupanj deacetilacije povezan je i s većim

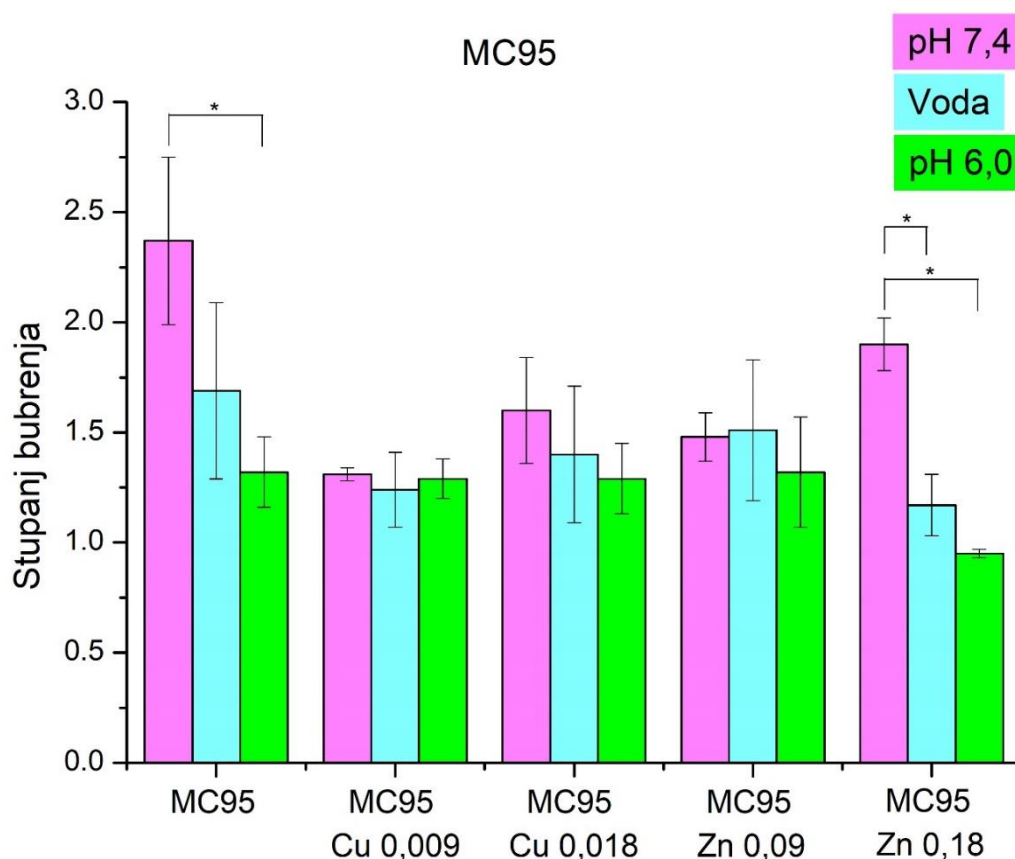
stupnjem kristalnosti kitozana [63] koje je moguće naslutiti iz užih difrakcijskih maksimuma MC95 na slici 15. Sukladno tome, kompleksi kitozana MC75 i metalnih iona pokazuju značajno veće stupnjeve bubrenja od kompleksa MC95–M<sup>2+</sup>.

Bubrenje kitozana MC75 i kompleksa MC75–M<sup>2+</sup> najveće je u fosfatnom puferu pH 6,0, dok je bubrenje u ostala dva ispitivana medija slično (slika 16). Razlog ovakvog ponašanja leži u prirodi kitozana kao poliaminosaharida. pH vrijednost pri kojoj dolazi do protoniranja kitozana je u rasponu između 6,3 i 6,5. To bi značilo da se javlja i jače elektrostatsko odbijanje između protoniranih lanaca i time omogućuje ulaz molekula vode, te u konačnici i djelomično otapanje materijala. Ovakvo ponašanje bi imalo dobru primjenu kao nosač lijeka za liječenje tumorskih stanica koje stvaraju blago kiselu okolinu. Veće bubrenje i djelomično otapanje ovakvog kitozana bi osiguralo ciljanu dostavu lijeka. Stupanj bubrenja kompleksa MC75 i metalnog iona pri pH 6,0 ukazuje na nižu sposobnost apsorpcije medija u odnosu na čisti MC75 što bi moglo ukazati na interakcije kitozana i metalnih iona, odnosno da je elektrostatsko odbijanje protoniranih lanaca smanjeno uslijed fizikalnog umreženja s metalnim ionima. Pri tome, kompleksi bakrovih (II) iona pokazuju najniže bubrenje kao posljedicu jačeg kompleksiranja u odnosu na cinkove (II) ione.



Slika 16. Bubrenje filmova kitozana MC75 i kompleksa u fosfatnom puferu pH = 7,4, vodi i fosfatnom puferu pH = 6,0. Značajna razlika između dvije grupe podataka definira se s vrijednosti  $p < 0,05$  (\*).

Na slici 17 koja prikazuje bubrenje kitozana MC95 i kompleksa  $MC95-M^{2+}$  može se vidjeti izostanak drastičnih razlika u bubrenju u različitim medijima. Ukoliko usporedimo bubrenje svih uzoraka u vodi i fosfatnom mediju pH 6,0 vidljivo je kako ne postoji značajna razlika u tim vrijednostima. Puno manji stupanj bubrenja MC95 uzoraka pri pH 6,0 u odnosu na MC75 može biti posljedica otežanog protoniranja aaminskih skupina uslijed veće kristalnosti. Bubrenje čistog kitozana u vodi ne razlikuje se od bubrenja bilo kojeg kompleksa MC95 i metalnih iona. U fosfatnom puferu pH 6,0 svi uzorci imaju sličan stupanj bubrenja, a primjenom ANOVA testa utvrđeno je da značajna razlika u bubrenju postoji samo kod kompleksa MC95 Zn 0,18 koji pokazuje najmanji stupanj bubrenja. Nasuprot tome, isti kompleks pokazuje najveći stupanj bubrenja u fosfatnom puferu pH 7,4 u odnosu na ostale što bi moglo ukazati na fizikalno-umreženu strukturu. Ovakvo ponašanje također ukazuje na važnost utjecaja ionske jakosti medija na međumolekulske interakcije lanaca kitozana kao i kitozana s metalnim ionima.



Slika 17. Bubrenje filmova kitozana MC95 i kompleksa u fosfatnom puferu pH = 7,4, vodi i fosfatnom puferu pH = 6,0. Značajna razlika između dvije grupe podataka definira se s vrijednosti  $p < 0,05$  (\*).

#### 4.5. Veličina i raspodjela veličina mikrosfera

Veličina i raspodjela veličina mikrosfera proizvedenih metodom elektroštrcanja prikazane su na slikama 18 i 19.

Elektroštrcanje je jedna od metoda proizvodnje mikrosfera, koja se temelji na primjeni električnog polja koje djeluje na otkidanje kapi polimerne otopine. Primjenom električnog polja dolazi do bržeg izvlačenja kapljica otopine s vrha igle, što u teoriji omogućuje proizvodnju mikrosfera manjeg promjera. Kako bi se ispitaio utjecaj električnog polja na promjer mikrosfera, provedena su mjerenja pri dvije vrijednosti napona: 20 kV i 25 kV.

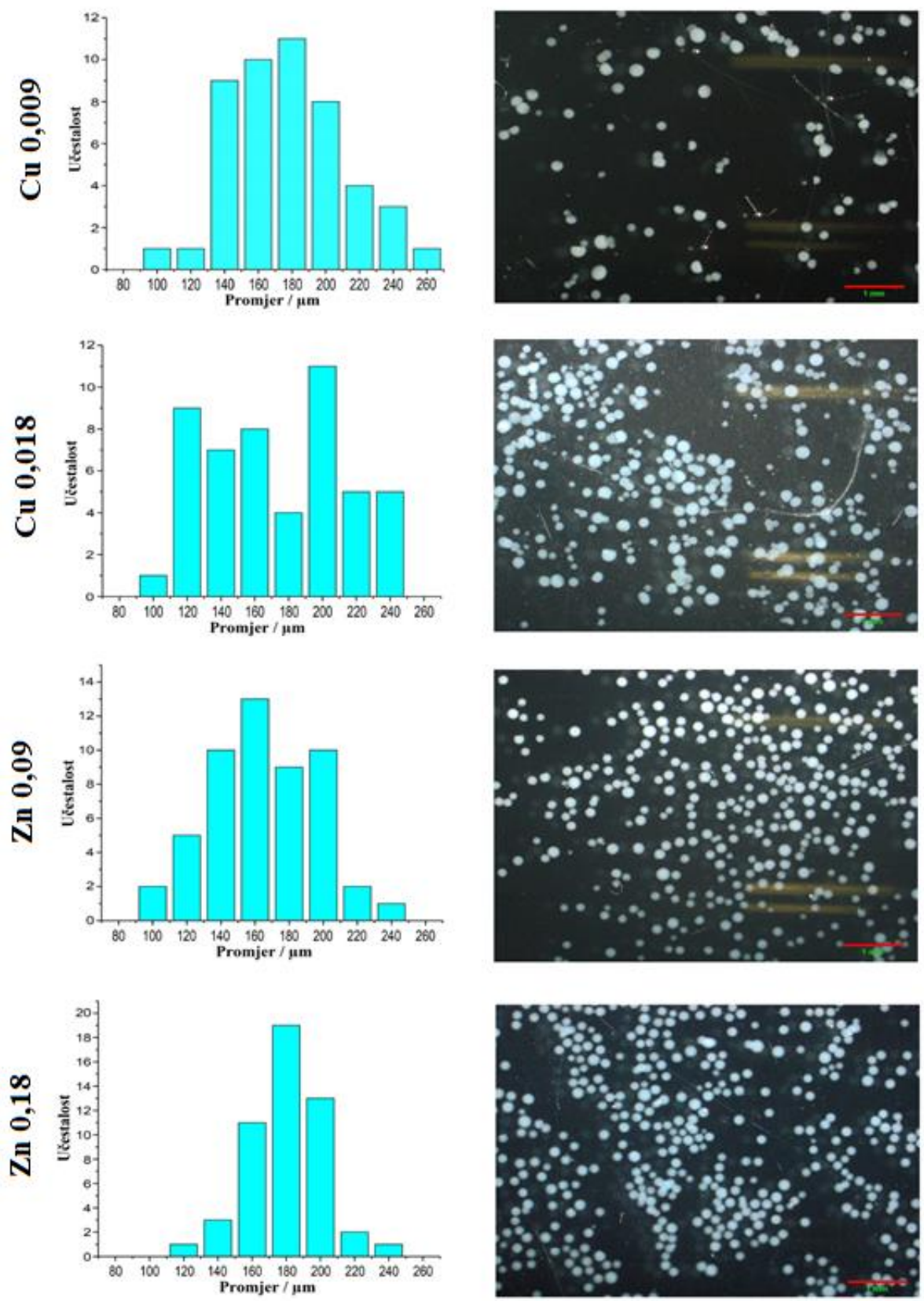
Otopina koja je korištena za neutralizaciju proizvedenih mikrosfera je 1 %-tna otopina  $\text{NH}_3$ , koja se nalazila 10 cm ispod vrha igle.

Prilikom proizvodnje mikrosfera kompleksa MC75 i bakrovih (II), odnosno, cinkovih (II) iona bilo je moguće dobiti mikrosfere pravilnog (sferičnog) oblika pri 25 kV i svim ispitivanim koncentracijama metalnog iona. Kada bi se napon smanjio na 20 kV, električno polje je slabije djelovalo na polimernu otopinu te su neke mikrosfere sporije otkidale s vrha igle. Pošto je vrijeme otkidanja kapi dulje, isparavanje otopine  $\text{NH}_3$  je dovelo do djelomične neutralizacije mikrosfera prije njihovog otkidanja što je rezultiralo nepotpuno sferičnim oblicima.

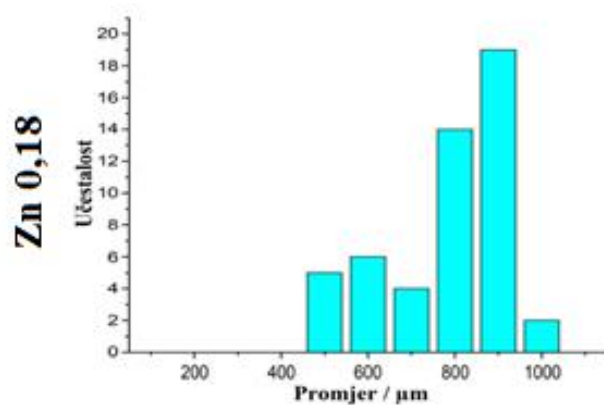
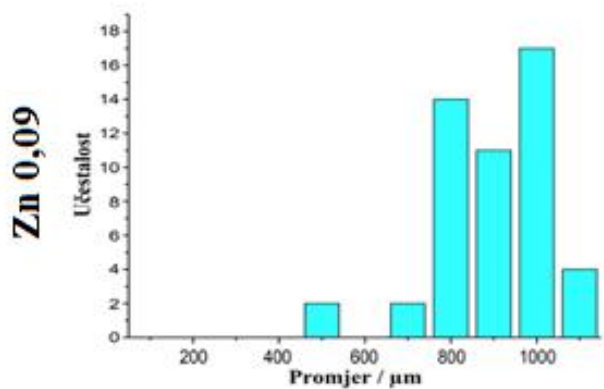
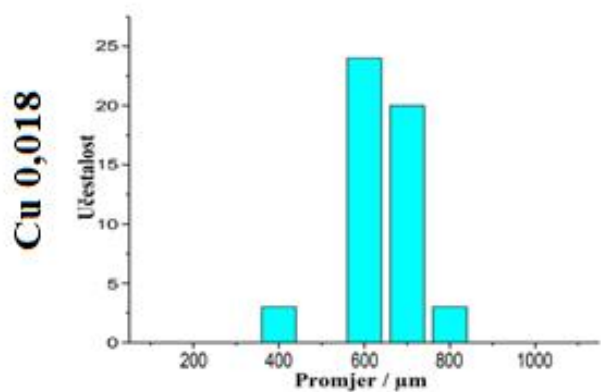
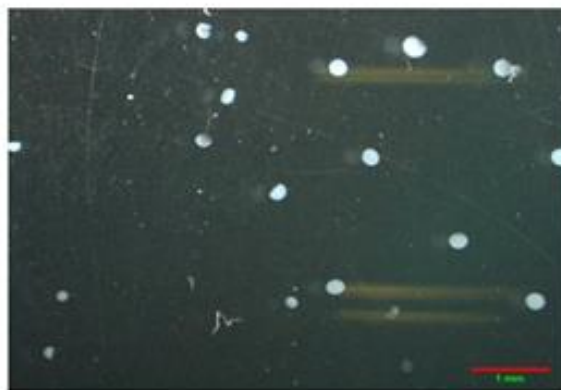
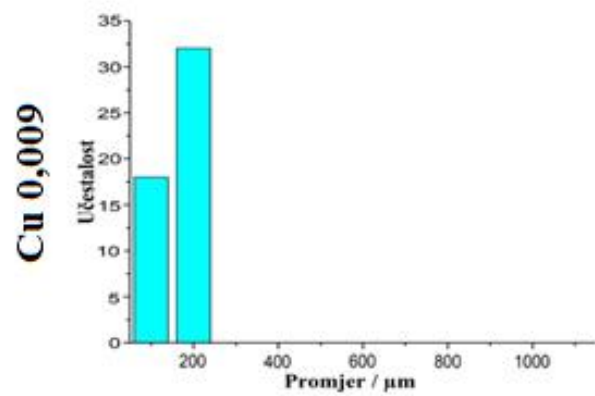
Na slici 18 prikazana je veličina i raspodjela veličina mikrosfera kompleksa MC75 i metalnih iona proizvedenih pri 25 kV. Sve proizvedene mikrosfere su pravilnog (sferičnog) oblika, njihova je raspodjela prilično uska, a promjer u rasponu od 100  $\mu\text{m}$  do 260  $\mu\text{m}$ . Mikrosfere kompleksa MC75 Zn 0,18 pokazuju najužu raspodjelu veličina s promjerom između 140 i 200  $\mu\text{m}$ .

Slika 19 prikazuje veličinu i raspodjelu veličina (mikro)sfera kompleksa MC75 i metalnih iona proizvedenih pri 20 kV. Već na prvi pogled moguće je uočiti kako raspodjela veličina je puno šira u odnosu na proizvodnju pri 25 kV. Iznimno, kompleks MC75 Cu 0,009 tvori mikrosfere manjeg promjera (100 – 200  $\mu\text{m}$ ) nepravilnih oblika, dok kompleks MC75 Cu 0,018 tvori mikrosfere promjera 400 – 800  $\mu\text{m}$ . Nasuprot kompleksima s bakrovim (II) ionima, cinkovi kompleksi dali su sferične oblike od kojih neki prelaze mikrometerske veličine (1100  $\mu\text{m}$ ). Na temelju ovih rezultata može se zaključiti kako jakost električnog polja pri 20 kV nije dovoljna za savladavanje površinske napetosti otopina kompleksa pri čemu je došlo do težeg otkidanja kapi većih dimenzije i nepravilnog oblika.





Slika 18. Raspodjela veličina i mikrografije mikrosfera kompleksa MC75 i metalnih iona proizvedenih pri 25 kV.



Slika 19. Raspodjela veličina i mikrografije (mikro)sfera kompleksa MC75 i metalnih iona proizvedenih pri 20 kV.

Proizvodnja mikrosfera kompleksa MC95 i metalnih iona nije bila moguća pri svim ispitivanim koncentracijama  $\text{Cu}^{2+}$ , odnosno,  $\text{Zn}^{2+}$  iona. Pri 20 kV bilo je moguće proizvesti mikrosfere samo s kompleksom MC95 Zn 0,18, no mikrosfere nisu bile pravilnog oblika već su imale „rep“ (Prilog 1). Mikrosfere proizvedene od kompleksa MC95 Cu 0,018, MC95 Zn 0,09 i MC95 Zn 0,18 pri naponu od 25 kV također nisu bile pravilnog oblika. Mikrosfere proizvedene od kompleksa MC95 Cu 0,018 su manjih dimenzija te im je jedan dio otkinut, a one od kompleksa MC95 Zn 0,09 i MC95 Zn 0,18 sferičnog su oblika no oko sebe imaju ovojnici (Prilozi 2-4).

Ispitan je i utjecaj većeg napona na oblik i veličinu mikrosfera od kompleksa MC95 i metalnog iona. Napon je povećan na 30 kV, no rezultati su bili isti. Mikrosfere kompleksa MC95 Cu 0,018 i dalje su imale otkinuti dio, a one od MC95 Zn 0,18 su i dalje imale ovojnici (Prilozi 5 i 6). Može se primijetiti da povećanjem napona pored mikrosfera dolazi i do stvaranja vlakana, što upućuje na činjenicu da je napon od 30 kV preveliki za proizvodnju mikrosfera. Mogući razlog ovakvog ponašanje kitozana MC95, u usporedbi s kitozonom MC75, je u njegovoj većoj površinskoj napetosti. Prilikom proizvodnje mikrosfera, kapljica koja izlazi iz igle trebala bi u što kraćem vremenu doći u otopinu za neutralizaciju. Zbog veće površinske napetosti kitozana MC95, kapljici je potrebno dulje vrijeme kako bi se oblikovala na vrhu igle. Brzo isparavanje otopine amonijaka utječe na djelomičnu neutralizaciju mikrosfera prije dolaska u samu otopinu što je jedan od mogućih razloga nepravilnog oblika mikrosfera od kitozana MC95.

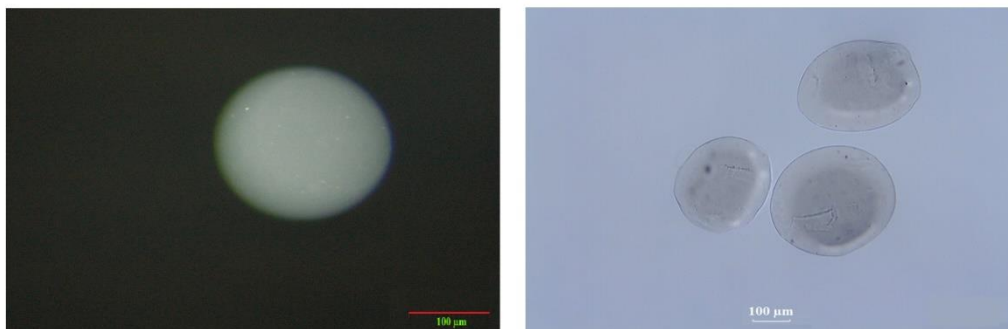
#### **4.6. Mikrostruktura mikrosfera**

Prilikom otapanja kitozana u octenoj kiselini dolazi do protoniranja  $-\text{NH}_2$  skupina u lancu kitozana. Kako bi došlo do stvaranja stabilne fizikalno umrežene strukture kitozana, potrebno je koristiti neutralizirajući agens. U većini radova za deprotoniranje  $-\text{NH}_3^+$  skupina korištena je otopina NaOH. Pang i suradnici [64], istraživali su utjecaj neutralizirajućeg agensa na stabilnost i mehanička svojstva kitozana. Došli su do zaključka da prilikom neutralizacije kitozana s NaOH dolazi do stvaranja strukture koja ima slabija mehanička svojstva i lošiju stabilnost u usporedbi s kitozonom neutraliziranim amonijakom. U nekim radovima ispitan je utjecaj neutralizirajućeg medija (NaOH i  $\text{NH}_3$ ) na stvaranje kompleksa kitozana s bakrom i cinkom. Prilikom neutralizacije kompleksa kitozana i metalnog iona s

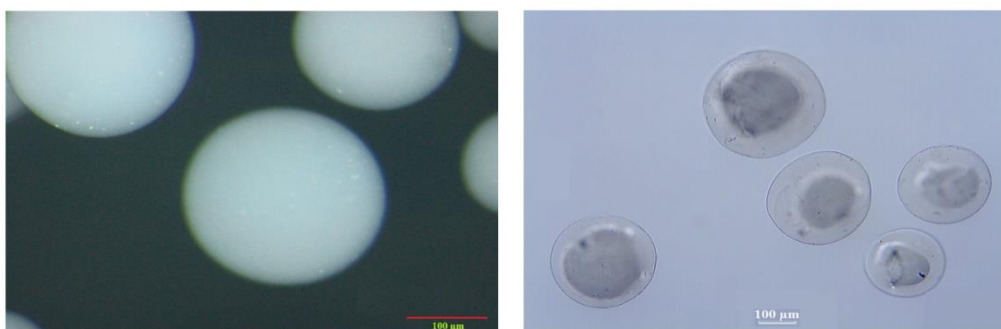
amonijakom došlo je do stvaranja stabilnije i bolje definirane strukture. Ova pojava može biti posljedica stabilizacije kompleksne strukture kitozana s  $\text{NH}_4^+$  ionima koji nastaju prilikom neutralizacije. S obzirom da  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  ioni imaju veliki afinitet prema aminskim skupinama, može se zaključiti da  $\text{NH}_4^+$  ioni potpomažu reakcijama kompleksiranja [61]. Stoga je u ovom radu za neutralizaciju mikrosfera korištena otopina amonijaka.

Na slikama 20 – 23 prikazana je mikrostruktura mikrosfera proizvedenih metodom elektroštrecanja pri naponu od 25 kV. Sve mikrosfere kompleksa MC75 i metalnog iona proizvedene pri 25 kV su pravilnog (sferičnog) oblika (slika 20). Mikrosfere s cinkovim (II) ionima pokazuju slojevitú strukturu, takozvanu „strukturu luka“ (slika 20 i 21). Ta pojava nije vidljiva na mikrosferama s bakrovim (II) ionima, što znači da vrsta metalnog iona uvelike utječe na mehanizam keliranja, a samim time i na mikrostrukturu mikrosfera. Peng i Zhang [65], u svom su radu objavili da je proučavanje „strukture luka“ u današnje vrijeme usmjereno na diblok, triblok kopolimere i na cijepljene kopolimere iz razloga jer se lako sintetiziraju. Međutim, morfologija prirodnih polimera i njihovih derivata zbog njihove složene strukture omogućuje stvaranje „strukture luka“. Prilikom istraživanja zaključili su da se pri višim koncentracijama polimera i dodataka, kao što su metalni ioni, povećava vjerojatnost da se lanci molekula udruže i stvore „strukturu luka“. Jedna od mogućnosti zbog koje kitozan MC75 s  $\text{Zn}^{2+}$  ionima, za razliku od kitozana s  $\text{Cu}^{2+}$  ionima, tvori „strukturu luka“ je njegova viša koncentracija. Za proizvodnju kompleksa MC75– $\text{M}^{2+}$ , ioni cinka dodani su u deset puta većoj koncentraciji u odnosu na bakrove (II) ione. Iako ovakvo ponašanje kompleksa kitozana i metalnih iona nije još dovoljno istraženo, može se reći da je ovaj rezultat u skladu s konstatacijom navedenih autora.

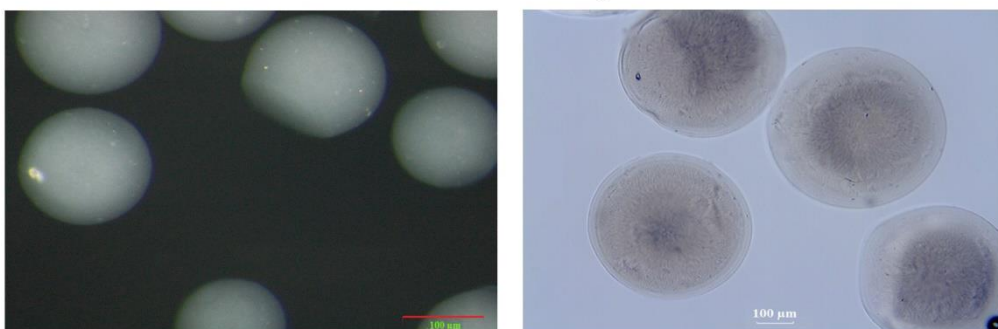
### MC75 Cu0,009



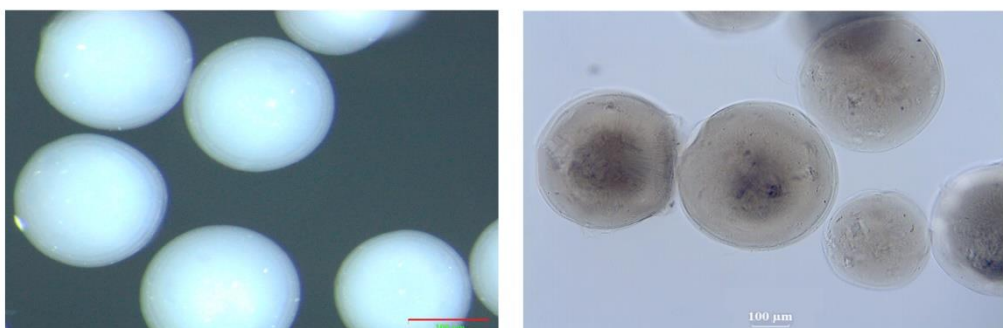
### MC75 Cu0,018



### MC75 Zn0,09

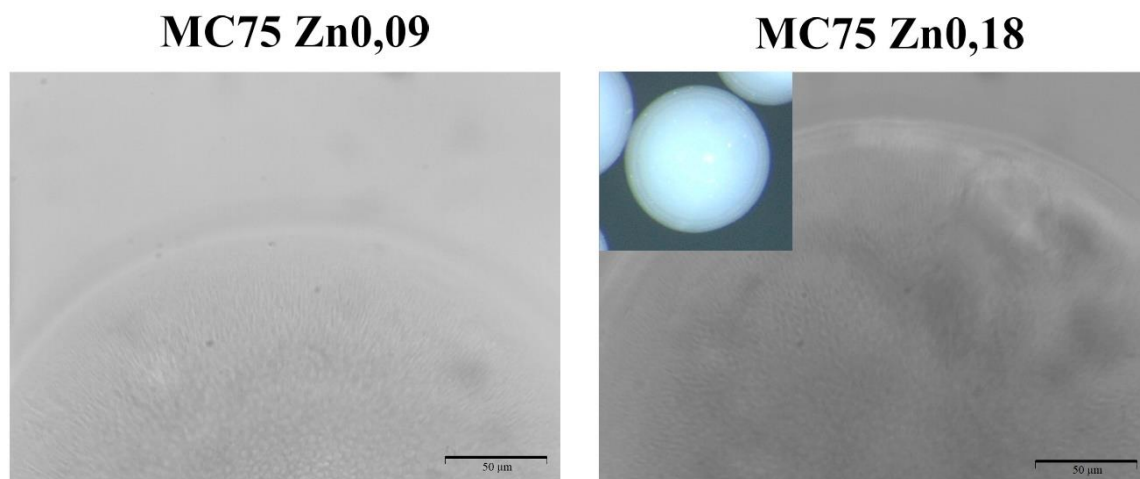


### MC75 Zn0,18



Slika 20. Mikrografije mikrosfera kompleksa MC75–M<sup>2+</sup> proizvedenih pri 25 kV.

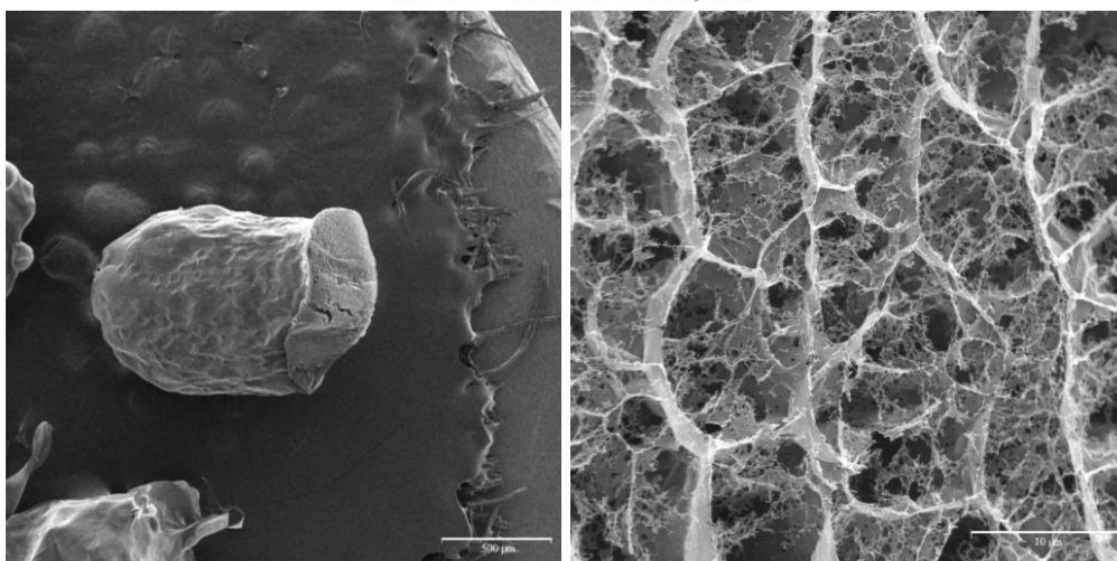
Na slici 21 koja prikazuje mikrosfere kompleksa MC75 i  $Zn^{2+}$  iona vidljivo je postojanje tunelića, koji ukazuju na poroznu strukturu mikrosfera. Tunelići su približno istih veličina te su homogeno raspoređeni po cijeloj mikrosferi, u obliku „saća“. Također se može primijetiti kako mikrosfere pokazuju poroznu strukturu od površine prema unutrašnjosti.



Slika 21. Mikrografija mikrosfera kompleksa MC75 Zn 0,09 i MC75 Zn0,18.

Kod mikrosfera kompleksa MC75 i  $Cu^{2+}$  iona primjenom optičkog mikroskopa nije moguće vidjeti poroznu strukturu. Stoga su mikrosfere kompleksa MC75 Cu 0,018 podvrgnute postupku liofilizacije i snimljene pretražnim elektronskim mikroskopom. Na slici 22 prikazana je mikrostruktura mikrosfera kompleksa MC75 Cu 0,018 proizvedenih pri 20 kV. Postupak liofilizacije uključuje sublimaciju otapala pri vrlo niskoj temperaturi ( $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) pod vakuumom. Uslijed ovakvih uvjeta pripreve uzorka za analizu dolazi do promjene oblika mikrosfere, odnosno, blagog skupljanja materijala. Mikrosfere više nemaju pravilni (sferični) oblik, već su blago izdužene, a površina im nije glatka već valovita. Također se sa slike može uočiti visokoporozna struktura mikrosfera s porama nedefiniranog oblika i promjera oko  $10\text{ }\mu\text{m}$ . Cijela površina mikrosfere, osim na mjestu gdje je mikrosfera otkinuta, pokazuje neporoznu strukturu.

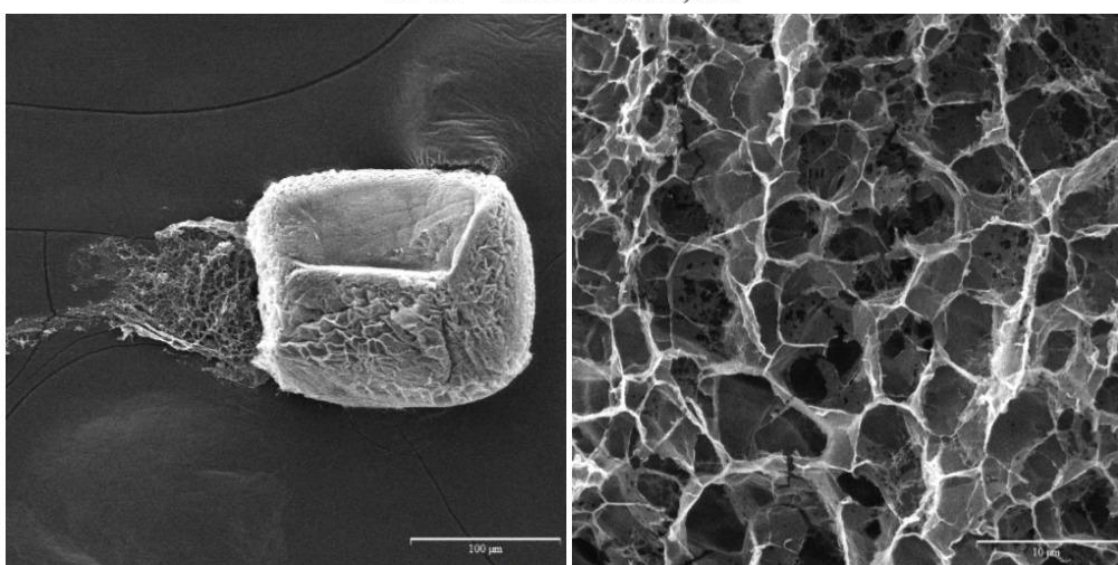
### 20 kV - MC75 Cu 0,018



Slika 22. SEM mikrografija mikrosfera kompleksa MC75 Cu 0,018 proizvedenih pri 20 kV.

Na slici 23 prikazana je mikrostruktura mikrosfera kompleksa MC75 Cu 0,018 proizvedenih pri 25 kV. Također je uočljivo da je došlo do promjene oblika mikrosfere uslijed liofilizacije. Mikrosfere pokazuju visokoporoznu strukturu s porama sačastog oblika promjera od oko 5 µm. Za razliku od mikrosfera proizvedenih pri 20 kV, ove mikrosfere imaju djelomično poroznu površinu.

### 25 kV - MC75 Cu 0,018



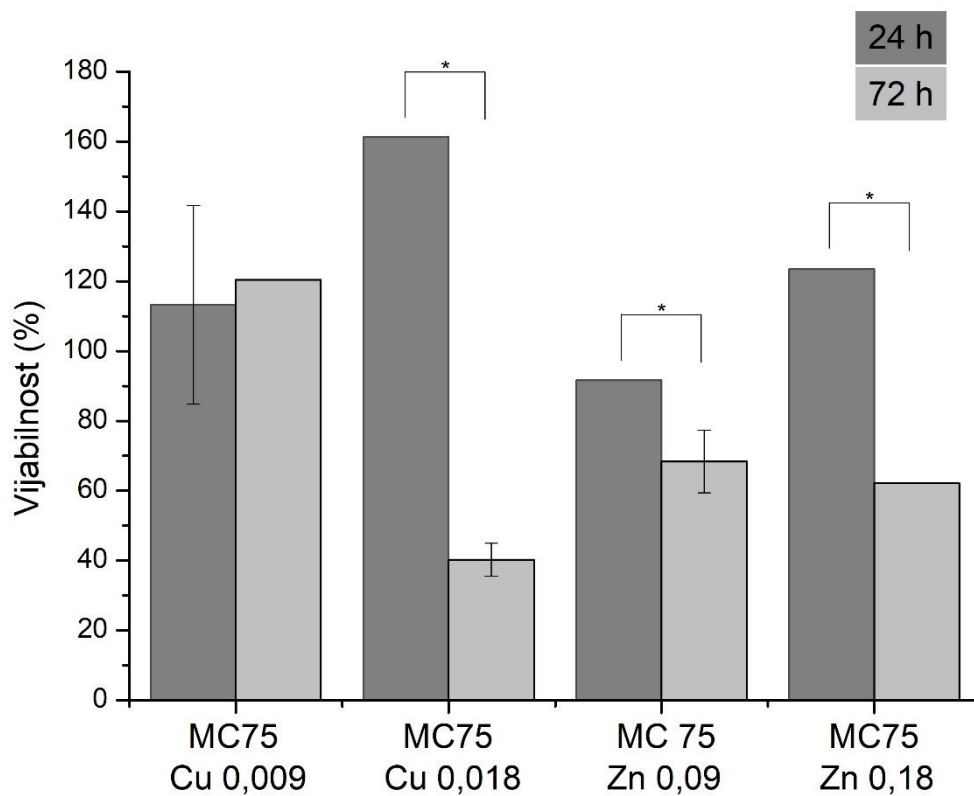
Slika 23. SEM mikrografija mikrosfera kompleksa MC75 Cu 0,018 proizvedenih pri 25 kV.

## 4.7. Citotoksičnost mikrosfera

Rezultati MTT testa na uzorcima mikrosfera kompleksa MC75 i metalnih iona prikazani su na slici 24. Vijabilnost stanica prikazana je u odnosu na negativnu kontrolu citotoksičnosti (netretirane stanice) te vijabilnost iznad 50 % ukazuje na necitotoksičnost materijala.

*In vitro* test citotoksičnosti pokazuje da su mikrosfere kompleksa MC75 Cu 0,018 toksične za ljudske embrionalne stanice Hek293. Budući da je bakar toksičan materijal uslijed svojeg oksidacijskog djelovanja na živi organizam, dodatak bakrovih (II) iona u ovoj količini nije adekvatan za proizvodnju netoksičnih mikrosfera. Mikrosfere kompleksa MC75 Cu 0,009 nakon 72 h jedine pokazuju vijabilnost veću od 100 % što ukazuje na to da je ovaj kompleks pogodan za uzgoj stanica Hek293. Vijabilnost stanica u kontanktu s mikrosferama kompleksa MC75–Zn<sup>2+</sup> nakon 72 h veća je od 50 % što ukazuje na necitotoksičnost, no može se primijetiti trend opadanja vijabilnosti s 24 h na 72 h. Cink je važan element u ljudskom tijelu i postoji veliki interes za njegovu primjenu u inženjerstvu tkiva i biomedicini. Značaj ovog elementa je u njegovoj sposobnosti da potiče proliferaciju stanica. Dodatak Zn<sup>2+</sup> iona u deset puta većoj količini od Cu<sup>2+</sup> iona i dalje pokazuje izostanak toksičnosti mikrosfera na ispitivanu staničnu liniju.





Slika 24. MTT test vijabilnosti stanica uzgojenih na mikrosferama kompleksa MC75–M<sup>2+</sup> tijekom 72 sata pri 37 °C. Značajna razlika između dvije grupe podataka definira se s vrijednosti  $p < 0,05$  (\*).

## 5. ZAKLJUČCI

U ovom radu pripremljeni su kompleksi metalnih iona ( $\text{Cu}^{2+}$ , odnosno,  $\text{Zn}^{2+}$ ) i kitozana različitih stupnjeva deacetilacije (MC75 i MC95) s ciljem proizvodnje stabilnih mikrosfera.

Izabrana metoda pripreme mikrosfera je metoda elektroštrcanja. Kako bi se pratio utjecaj električnog polja, mikrosfere su proizvedene pri dvije vrijednosti napona: 20 kV i 25 kV.

Gustoće svih istraživanih otopina značajno se ne razlikuju. Otopine kitozana MC75 te  $\text{MC75-M}^{2+}$  pokazuju više vrijednosti viskoznosti od otopine kitozana MC95 i kompleksa  $\text{MC95-M}^{2+}$ . Dodatkom sve veće koncentracije metalnih iona dolazi do smanjenja viskoznosti u slučaju oba kitozana.

Otopine kitozana MC95 i kompleksa pokazuju veće vrijednosti napetosti površine od kitozana MC75. Također je vidljivo, u slučaju oba kitozana, da se dodatkom metalnih iona napetost površine značajno ne mijenja.

XRD analiza utvrdila je da ne dolazi do nastanka kristalnih anorganskih faza u strukturi kitozana, što ukazuje na nastajanje kompleksa kitozana i metalnih iona.

Rezultati bubrenja kompleksa  $\text{MC75-M}^{2+}$  i  $\text{MC95-M}^{2+}$  ukazuju na stabilnost strukture pri većim koncentracijama metalnih iona. Također, uzorci pripremljeni od kitozana MC75 pokazuju veće bubrenje u odnosu na uzorke od kitozan MC95 u sva tri ispitna medija.

Jakost električnog polja utječe na veličinu, oblik i mogućnost elektroštrcanja mikrosfera. Mikrosfere kompleksa  $\text{MC75-M}^{2+}$  proizvedene pri 25 kV pokazuju pravilan oblik i usku raspodjelu veličina u rasponu od 100 do 260  $\mu\text{m}$ , dok sfere proizvedene pri 20 kV pokazuju nepravilan oblik i raspodjelu veličina u rasponu od 400 do 1100  $\mu\text{m}$  pri čemu već prelaze naziv „mikrosfere“. Mikrosfere pravilnog oblika od kompleksa  $\text{MC95-M}^{2+}$  nije bilo moguće proizvesti pri obje vrijednosti napona uslijed veće napetosti površine.

Mikrosfere kompleksa kitozana i cinkovih (II) iona pokazuju postojanje tunelića, pravilno raspoređenih kroz cijeli volumen, što ukazuje na visoku poroznost mikrosfere. Također se na mikrosferama uočava slojevita struktura, takozvana „struktura luka“. Primjenom pretražnog elektronskog mikroskopa utvrđena je visokoporozna struktura mikrosfera kitozana MC75 Cu 0,018 proizvedenih pri obje vrijednosti napona. Mikrosfere

proizvedene pri 20 kV imaju neporoznu površinu, dok ove proizvedene pri 25 kV pokazuju djelomično poroznu površinu.

Ispitivanje citotoksičnosti mikrosfera kompleksa provedeno je na Hek293 stanicama u direktnom kontaktu s materijalom. Analiza je pokazala kako su mikrosfere kompleksa s većom količinom bakrovih (II) iona toksične za ispitivanu staničnu liniju.

Zaključno, elektroštrcanje kao metoda za pripravu mikrosfera kompleksa kitozana i metalnih iona ima potencijala za kontinuiranu proizvodnju veće količine materijala. Pri tome, potrebno je osigurati kontrolirane atmosferske uvjete (temperatura, vlažnost) kao i nepromjenjivost jakosti električnog polja. S obzirom na veliki broj parametara koji utječu na strukturu, oblik i veličinu mikrosfera, potrebna su daljnja sistematična istraživanja kako bi se moglo predvidjeti ponašanje otopine za elektroštrcanje i tako odabrati najpogodniji uvjeti pripreve.

## 6. POPIS SIMBOLA

MC75	kitozan stupnja deacetilacije 75 %
MC95	kitozan stupnja deacetilacije 95 %
CO <sub>2</sub>	ugljikov (II) oksid
H <sub>2</sub> O	voda
CH <sub>4</sub>	metan
NaOH	natrijev hidroksid
DD	stupanj deacetilacije
DA	stupanj acetilacije
UV-Vis	ultraljubičasta-vidljiva spektrofotometrija
NMR	nuklearna magnetna rezonancija
DNK	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , <i>DNA</i> )
mRNK	glasnička ribonukleinska kiselina (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> , <i>mRNA</i> )
FTIR	infracrvena spektroskopska analiza s Fourierovim transformacijama (engl. <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> )
DSC	diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. <i>differential scanning calorimetry</i> )
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid
$M_w$	molekulska masa
CH <sub>3</sub> COOH, HAc	octena kiselina
Cu(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> × H <sub>2</sub> O	bakrov acetat monohidrat
Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	cinkov acetat dihidrat
NH <sub>3</sub>	amonijak
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	natrijev fosfat monobazični
KCl	kalijev klorid
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	kalijev fosfat
NaCl	natrijev klorid
$\rho$	gustoća
$\sigma$	napetost površine

$\eta$	viskoznost
$t$	vrijeme
XRD	kvalitativna rendgenska difrakcijska analiza (engl. <i>X-ray diffraction</i> )
PBS	otopina fosfatnog pufera
SEM	pretražna elektronska mikroskopija (engl. <i>scanning electron microscopy</i> )
DMEM	biološki medij (engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )
DMSO	dimetil-sulfoksid
Hek293	ljudske embrionalne stanice (engl. <i>human embryonic kidney cells</i> )

## 7. LITERATURA

- [1] V. R. Sinha, A. K. Singla, S. Wadhawan, R. Kaushik, R. Kumria, K. Bansal, S. Dhawan, Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs, *International Journal of Pharmaceutics* 274, 1-33, 2004
- [2] M. E. I. Badawy, N. E. M. Takatak, O. M. Awad, S. A. Elfiki, N. E. Abou El-Ela, Preparation and Characterization of Biopolymers Chitosan/Alginate/Gelatin Gel Spheres Crosslinked by Glutaraldehyde, *Journal of Macromolecular Science*, Vol. 56, No. 6, 359-372, 2017
- [3] X. Wang, Y. Du, L. Fan, H. Liu, Y. Hu, Chitosan – metal complexes as antimicrobial agent: Synthesis, characterization and Structure – activity study, *Polymer Bulletin*, Vol. 55, 105-113, 2005
- [4] M. Kong, X. G. Chen, K. Xing, H. J. Park, Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review; *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 144, 51-63, 2010
- [5] M. A. Islam, J. Firdous, Y. J. Choi, C. H. Yun, C. S. Cho, Design and application of chitosan microspheres as oral and nasal vaccine carriers: an updated review, *International Journal of Nanomedicine*, Vol. 7, 6077-6093, 2012
- [6] H. Bansal, S. P. Kaur, A. K. Gupta, Microsphere: Methods of Preparation and Applications; A Comparative Study, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, Vol. 10, 69-75, 2011
- [7] R. Nair, B. H. Reddy, C. K. Ashok Kumar, K. Jayraj Kumar, Application of Chitosan Microspheres as Drug Carriers: A Review, *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, Vol 1, 1-12, 2009
- [8] S. M. Kuo, G. C. Niu, S. J. Chang, C. H. Kuo, M. S. Bair, A One-Step Method for Fabricating Chitosan Microspheres, *Wiley InterScience*, 2150-2157, 2004
- [9] K. Leja, G. Lewandowicz, Polymer Biodegradation and Biodegradable Polymers – a Review, *Polish Journal of Environment Study*, Vol. 19, No. 2, 255-266, 2010
- [10] B. Ghanbarzadeh, H. Almasi, Biodegradable Polymers, *Life of Science*, 141- 183, 2013

- [11] R. C. Goy, D. de Britto, O. B. G. Assis, A Review of Antimicrobial Activity of Chitosan, *Polimeros: Ciencia e Tecnologia*, Vol. 19, 241-247, 2009
- [12] K. Hong, S. P. Meyer, Preparation and Characterization of Chitin and Chitosan – A Review, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, Vol. 4, 27-52, 2010
- [13] R. Czechowska – Biskup, D. Jarosinska, B. Rokita, P. Ulanski, J. M. Rosiak, Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan – Comparison of Methods, *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivates*, Vol. 17, 5-31, 2012
- [14] M. R. Hussain, M. Iman, T. K. Maji, Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan and Their effect on the Release Behavior of Essential Oil from Chitosan and Chitosan – Gelatin Complex Microcapsules, *Rev. Tec. Univ. Zulia*, Vol. 37, No. 2, 69-77, 2014
- [15] C. Chatelet, O. Damour, A. Domard, Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films, *Biomaterials*, Vol. 22, 261-268, 2001
- [16] P. K. Dutta, S. Tripathi, G. K. Mehrotra, J. Dutta, Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications
- [17] M. Hosseinnjad, S. M Jafari, Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan, *International Journal of Biological Macromolecules*, 1-43, 2016
- [18] J. Holappa, M. Hjalmarsdottir, O. Runarsson, T. Asplund, P. Soininen, Antimicrobial activity of chitosan N-betainates, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 65, 114-118, 2006
- [19] X. F. Li, X. Q. Feng, S. Yang, G. Q. Fu, T. P. Wang, Z. X. Su, Chitosan kills *Escherichia coli* through damage to be of cell membrane mechanism, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 79, 493-499
- [20] S. N. Kulikov, V. E. Tikhonov, E. A. Bezrodnykh, S. A. Lopatin, V. P. Varlamov, Comparative evaluation of antimicrobial activity of oligochitosans against *Klebsiella pneumoniae*, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, Vol. 41, 57-62, 2015
- [21] Q. Li, E. T. Dunn, E. W. Grandmaison, Applications and Properties of Chitosan, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, Vol. 7, 370-397, 1992

- [22] E. Onsoyen, O. Skaugrud, Metal Recovery Using Chitosan, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, Vol. 49, 395-404, 1990
- [23] M. Rhazi, J. Desbrieres, A. Tolaimate, M. Rinaudo, P. Vottero, A. Alagui, Contribution to the study of the complexation of copper by chitosan and oligomers, *Polymer*, Vol. 43, 1267-1276, 2002
- [24] A. J. Varma, S. V. Deshpande, J. F. Kennedy, Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 55, 77-93, 2004
- [25] E. Gubial, Interactions of metal ions with chitosan – based sorbents: a review; *Separation and Purification Technology*, Vol. 38, 43-74, 2004
- [26] A. C. Oyrton, J. Monteiro, C. Airola, Some Thermodynamic Data on Copper – Chitin and Copper – Chitosan Biopolymer Interactions, *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 212, 212-219, 1999
- [27] J. Desbrieres, E. Guibal, Chitosan for wastewater treatment, *Polym Int*, Vol. 67, 7-14, 2018
- [28] F. C. Wu, R. L. Tseng, R. S. Juang, Role of pH in Metal Adsorption from Aqueous Solutions Containing Chelating Agents on Chitosan, *Ind. Eng. Chem. Res.* Vol. 38, 270-275, 1999
- [29] F. C. Wu, R. L. Tseng, R. S. Juang, A review and experimental verification of using chitosan and its derivatives as sorbent for selected heavy metals, *Journal of Environmental Management*, Vol. 91, 798-806, 2010
- [30] N. C. Braier, R.A. Jishi, Density functional studies of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  binding to chitosan, *Journal of Molecular Structure*, Vol. 499, 51-55, 2000
- [31] X. Wang, Y. Du, H. Liu, Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan – Zn complex, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 56, 21-26, 2004
- [32] G. Karthikeyan, K. Anbalagan, N. Muthulakshmi Andal, Adsorption dynamics and equilibrium studies of Zn onto chitosan, *J. Chem. Sci.*, Vol. 116, 119-127, 2004
- [33] K. Sahil, M. Akanksha, S. Premjeer, A. Bilandi, B. Kapoor, Microsphere: A review, *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, 2231-2781, 2011



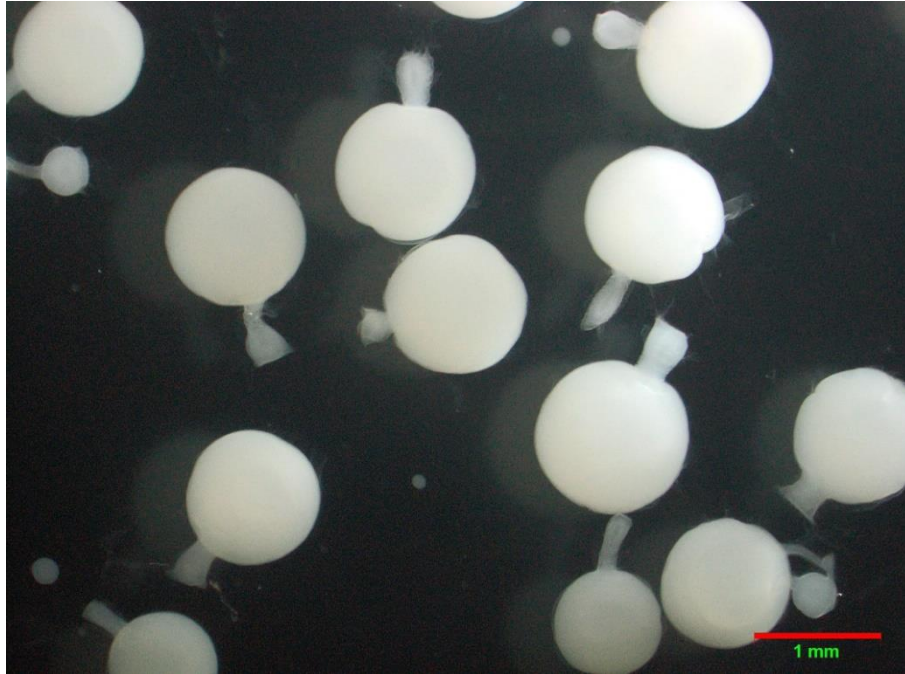
- [34] K. Songsurang, N. Praphairaksit, K. Siraleartmukul, N. Muangsin, Electrospray Fabrication of Doxorubicin-Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles for Delivery of Doxorubicin, *Archives of Pharmal Research*, Vol 34, No 4, 583-592, 2011
- [35] J. Omid, M. Khorram, A. Samimi, Combined Method of Complex Coacervation and Electrospray for Encapsulate Preparation, *Wiley InterScience*, 322-343, 2009
- [36] J. S. Quan, H. L. Jiang, E. M. Kim, pH- sensitive and mucoadhesive thiolated Eudragit – coated chitosan microspheres, *Int. J. Pharm.* Vol. 359, 205-210, 2008
- [37] S. Patil, A. Babbar, R. Mathur, A. Mishra, K. Sawant, Mucoadhesive chitosan microspheres of carvediol for nasal administration, *J. Drug Target*, Vol. 18, 321-331, 2010
- [38] R. Bodmeier, O. Paeratakul, Spherical agglomerates of water insoluble drugs, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 78, 964-967, 1989
- [39] Y. Nishioka, S. Kyotani, M. Okamura, M. Miyazaki, K. Okataki, S. Yamamoto, K. Ito, Release characteristics of cisplatin chitosan microspheres and effect of containing chitin, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 38, 2871-2873, 1990
- [40] Y. P. Li, Y. Machida, T. Sannan, T. Nagai, Preparation of chitosan microspheres containing fluorouracil using dry-in-oil method and its release characteristics, *S. T. P. Pharmaceutical Science*, Vol. 1, 363-368, 1991
- [41] H. S. Kas, Chitosan-polymeric properties and applications, *Proc. Nat. Symp, Biomed. Sci. and Tech*, 19-20
- [42] T. A. Ahmed, B. M. Aljaeid, Preparation, characterization and potential application of chitosan, chitosan derivates and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery, *Drug Design: Development and Therapy*, 483-507, 2016
- [43] J. Varshosaz, The promise of chitosan microspheres in drug delivery systems, *Expert Opin. Drug Deliv.*, Vol. 4, 263-273, 2007
- [44] G. Eisenbrada, B. Pool Zobelb, V. Bakerc, M. Ballsd, B. J. Blaauboere, A. Boobisf, A. Carereg, S. Kevekordesh, J. C. Lhuguenoti, R. Pieterse, J. Kleinerj, Methods of in vitro toxicology, *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 40, 193-236, 2002

- [45] S. Dumitriu, V. I. Popa, *Polymeric biomaterials: Structure and function*, CRC Press, 2013
- [46] M. A. Woodruff, D. W. Hutmacher, The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone, *Progress in Polymer Science*, Vol. 35, 1217-1256, 2010
- [47] A. Rogina, A. Lončarević, M. Antunović, I. Marijanović, M. Ivanković, H. Ivanković, Tuning physicochemical and biological properties of chitosan through complexation with transition metal ions, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 129, 645-652, 2019
- [48] A. Ressler, J. Rodenas-Rochina, M. Ivanković, H. Ivanković, A. Rogina, G. G. Ferrer, Injectable chitosan-hydroxyapatite hydrogels promote the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 197, 469-477, 2018
- [49] A. Jukić, K. Kraguljac, I. Šoljić, E. Vidović, A. Barišić, Viskoznost i reološka svojstva mineralnih mazivih ulja s disperzantnim polimetakrilatnim aditivima, *Goriva i maziva*, Vol. 49, 229-249, 2010
- [50] W. Wang, S. Bo, S. Li, W. Qin, Determination of the Mark-Houwink equation for chitosan with different degrees of deacetylation, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 13, 281-285, 1991
- [51] K. Kofuji, C.-J. Qian, M. Nishimura, I. Sugiyama, Y. Murata, S. Kawashima, Relationship between physicochemical characteristics and functional properties of chitosan, *European Polymer Journal*, Vol. 41, 2784-2791, 2005
- [52] V. Chernova, A. Shurshina, E. Kulich, G. Zaikov, Some approaches to viscometric study of chitosan in acetic acid solution, *Chemistry and chemical technology*, Vol. 10, 135-139, 2016
- [53] A. J. C. Brant, *Preparation and Characterization of Hydrogels from Mixtures of Chitosan and Poly(N-Vinyl-2-Pyrrolidone)*, Digital Library USP, 2008
- [54] J. Radošević, *Napetost površine vodenih otopina: Utjecaj pH i suprotno nabijenih polielektrolita*, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 2009

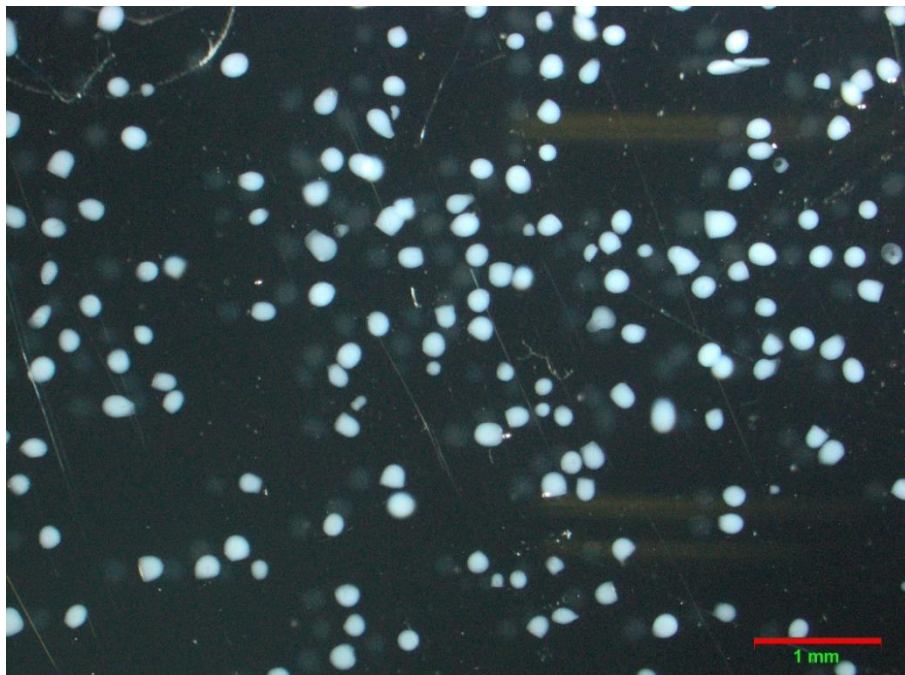
- [55] A. Bateni, A. Ababneh, J. A. W. Elliott, A. W. Neumann, A. Amirfazli, Effect of gravity and electric field on shape and surface tension of drops, *Advances in Space Research*, Vol. 36, 64-69, 2005
- [56] G. Qun, W. Ajun, Effects of molecular weight, degree of acetylation and ionic strength on surface tension of chitosan in dilute solution, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 64, 29-36, 2006
- [57] M. L. Tsaih, R. H. Chen, Effect of molecular weight and urea on the conformation of chitosan molecules in dilute solutions, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 20, 233-240, 1997
- [58] C. J. van Oss, M. K. Chaudhury, R. J. Good, Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems, *Chemical Reviews*, Vol. 88, 927-941, 1988
- [59] M. S. Usman, N. A. Ibrahim, K. Shameli, N. Zainuddin, W. M. Z. W. Yunus, Copper Nanoparticles Mediated by Chitosan: Synthesis and Characterization via Chemical Methods, *Molecules*, Vol. 17, 14928-14963, 2012
- [60] J. Nie, Z. Wang, Q. Hu, Chitosan Hydrogel Structure Modulated by Metal Ions, *Scientific Reports*, Vol. 6, 1-8, 2016
- [61] A. Lončarević, Materijali na temelju kitozana kao kelatni agensi, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2018
- [62] C. Wenling, J. Duohui, L. Jiamou, G. Yandao, Z. Nanming, Z. Xiufang, Effects of the Degree of Deacetylation on the Physicochemical Properties and Schwann Cell Affinity of Chitosan Films, *Journal of Biomaterials Applications*, Vol. 20, 157-177, 2005
- [63] I. Aranaz, M. Mengibar, R. Harris, I. Panos, B. Miralles, N. Acosta, G. Galed, A. Heras, Functional Characterization of Chitin and Chitosan, *Current Chemical Biology*, Vol. 3, 203-230, 2009
- [64] Y. Pang, A. Qin, X. Lin, L. Yang, Q. Wang, Z. Wang, Z. Shan, S. Li, J. Wang, S. Fan, Q. Hu, Biodegradable and biocompatible high elastic chitosan scaffold is cell-friendly both *in vitro* and *in vivo*, *Oncotarget*, Vol. 8, 35583-35591, 2017
- [65] X. Peng, L. Zhang, Formation and Morphologies of Novel Self-Assembled Micelles from Chitosan Derivatives, *Langmuir*, Vol. 23, 10493-10498, 2007

## 8. PRILOZI

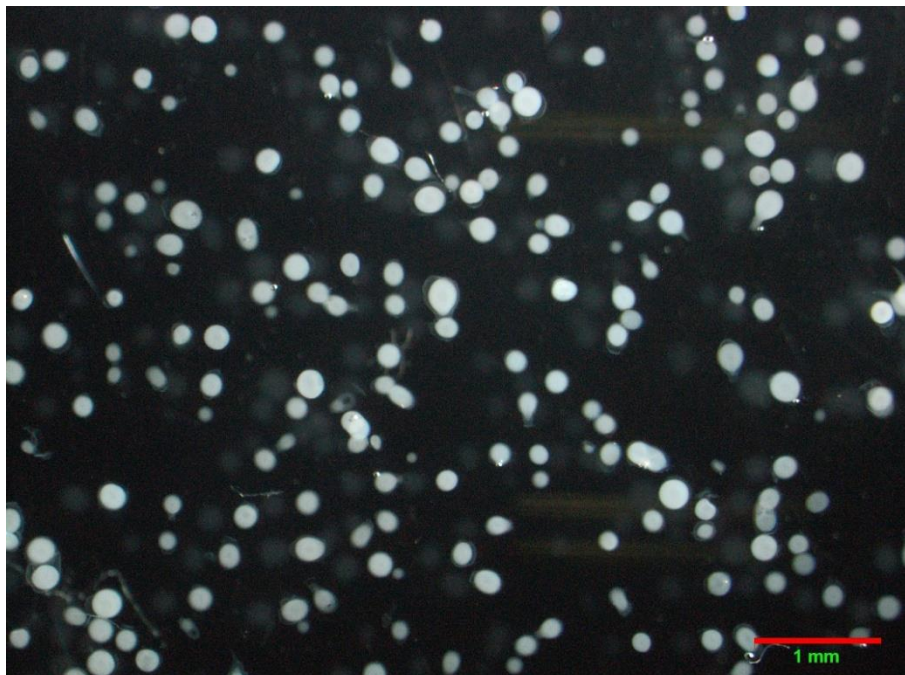
Prilog 1. Mikrosfere kompleksa MC95 Zn 10 pri 20 kV. Slika je snimljena svjetlosnim stereomikroskopom.



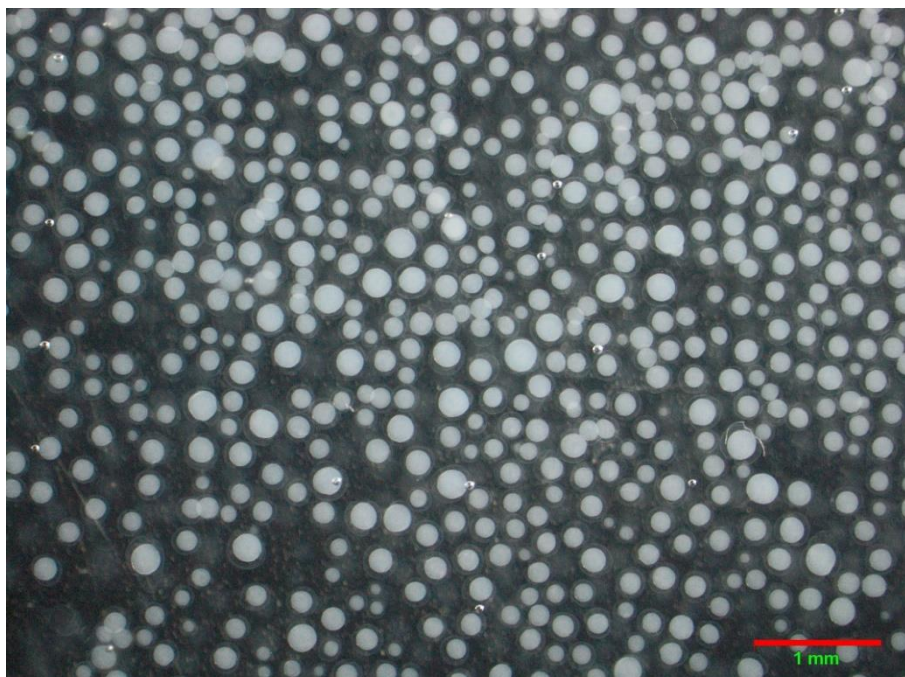
Prilog 2. Mikrosfere kompleksa MC95 Cu 1 pri 25 kV. Slika je snimljena svjetlosnim stereomikroskopom.



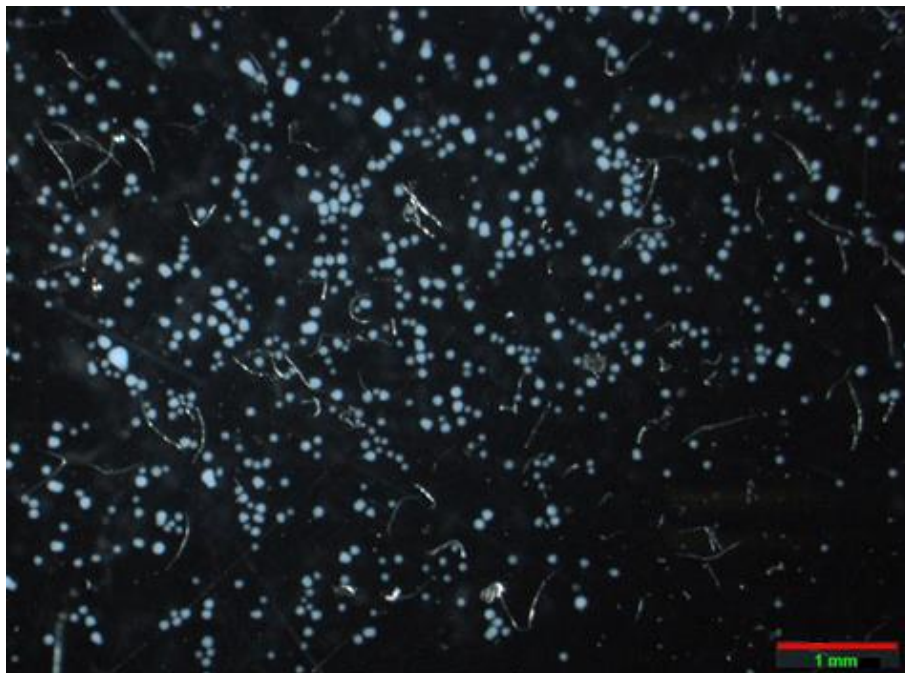
Prilog 3. Mikrosfere kompleksa MC95 Zn 5 pri 25 kV. Slika je snimljena svjetlosnim stereomikroskopom.



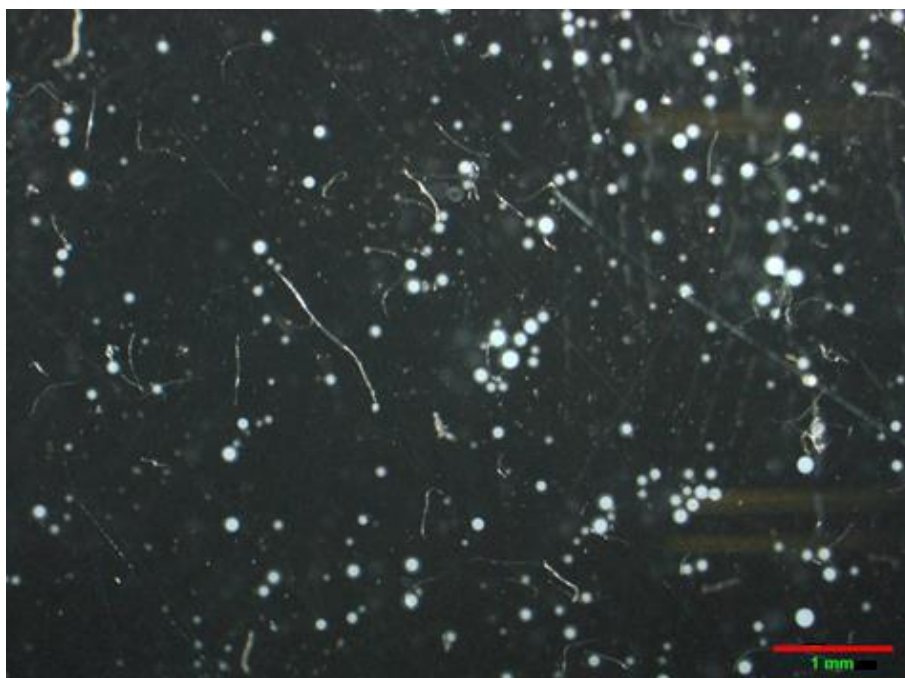
Prilog 4. Mikrosfere kompleksa MC95 Zn 10 pri 25 kV. Slika je snimljena svjetlosnim stereomikroskopom.



Prilog 5. Mikrosfere kompleksa MC95 Cu 1 pri 30 kV. Slika je snimljena svjetlosnim stereomikroskopom.



Prilog 6. Mikrosfere kompleksa MC95 Zn 10 pri 30 kV. Slika je snimljena svjetlosnim stereomikroskopom.



## ŽIVOTOPIS

Dorina Vidović [REDACTED] Prvu riječku hrvatsku gimnaziju pohađala je od 2002. do 2012. godine, nakon čega upisuje preddiplomski studij *Kemija i inženjerstvo materijala* na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski studij *Kemija i inženjerstvo materijala* upisuje 2017. godine.

Demonstratorica je na laboratorijskim vježbama iz kolegija *Fizikalna kemija I* i *Fizikalna kemija II*, na Zavodu za fizikalnu kemiju od akademske godine 2015./2016.

Sudjeluje na *Festivalu znanosti* u Zagrebu 2017. godine na temu *Vrijeme* s izradom i prezentacijom znanstvenih pokusa.

Tijekom lipnja 2017. odrađuje stručnu praksu u tvrtki DLS d.o.o. u Rijeci.

U lipnju 2019. godine sudjeluje na znanstvenom skupu Solid-State Science & Research, u Zagrebu, s izlaganjem postera na temu *Preparation and characterization of solid dispersions of a drug* čija je koautorica: Ines Topalović, Dorina Vidović, Joško Barbarić, Krunoslav Žižek.

Od 2008. godine volonterka je u udruzi za djecu s poteškoćama u razvoju u gradu Rijeci.