

# Metode ugradnje lijeka u polimerne mikročestice

---

Vlahović, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:841506>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-26**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Lucija Vlahović

**ZAVRŠNI RAD**

Zagreb, rujan 2023.

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

Lucija Vlahović

METODE UGRADNJE LIJEKA U POLIMERNE MIKROČESTICE

ZAVRŠNI RAD

Voditeljica rada: doc. dr. sc. Anamarija Rogina

Članovi ispitnog povjerenstva

doc. dr. sc. Anamarija Rogina

prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

dr. sc. Leonard Bauer

Zagreb, rujan 2023.

## **Zahvala**

*Istraživanja završnog rada provedena su u okviru projekta „Pametni sustavi za dostavu lijeka pri liječenju tumora kosti“ (Projekt SmartCar, UIP-2020-02-6201, voditeljica projekta: doc. dr. sc. Anamarija Rogina) koji je financiran od strane Hrvatske zaklade za znanost.*

*Zahvaljujem doc. dr. sc. Anamariji Rogini na prihvaćenom mentorstvu i praćenju cjelokupnog procesa te asistentici Andrei Lončarević na strpljenu, prenesenom znanju, pomoći i stručnim savjetima.*

*Zahvaljujem svojim dragim kolegama i prijateljima jer su godine studiranja učinili zabavnijima i jednostavnijima.*

*Najveće hvala mojim roditeljima, mami Jadranki i tati Željku, na podršci koju mi pružaju cijelo moje školovanje.*

## SAŽETAK

Kitozan je jedini prirodni polimer polikationske prirode kojeg svojstva poput biokompatibilnosti, biorazgradljivosti i netoksičnosti čine idealnim za upotrebu u poljoprivredi, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji, pročišćavanju otpadnih voda, tkivnom inženjerstvu te kao sustav za dostavu lijekova. Ovisno o primjeni, moguće je pripremiti materijale na temelju kitozana u obliku emulzija, filmova te mikro- i nano-čestica koje su se pokazale kao idealni dostavljači lijekova. Kako bi se postigla željena kinetika otpuštanja lijeka, a time i uspješno liječenje, potrebno je pripremiti mikro- i nanočestice kontrolirane raspodjele veličina, morfologije i strukture. Neke od metoda koje se koriste za pripremu kitozanskih mikročestica su elektroštrcanje, sušenje raspršivanjem, dobivanje iz emulzije i precipitacija. U ovom radu, proces elektroštrcanja je odabran za pripremu mikročestica. Pripremljene su kompozitne mikročestice na temelju kompleksa kitozana i bakrovih(II) iona koje kao punilo sadrže hidroksiapatit (CHT-Cu/HAp), te je istražen utjecaj dodatka hidroksiapatita na svojstva mikročestica i efikasnost ugradnje antitumorskog lijeka (doksorubicin, DOX). Suhe mikročestice analizirane su primjenom infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom prigušene totalne refleksije (ATR-FTIR) i rendgenskom difrakcijskom analizom (XRD) te rezultati ukazuju na prisutnost interakcija između polimerne matrice i punila. Veličina i oblik mikrosfera istraženi su invertnim svjetlosnim mikroskopom. Uočena je sferičnost pripremljenih mikročestica, dok su najmanje mikročestice s najužom raspodjelom dobivene za sustav s 5 mas.% HAp-a (CHT-Cu/HAp5). Dodatak većeg udjela hidroksiapatita (10 mas.%) dobivene su veće mikročestice s širom raspodjelom veličina zbog nestabilnosti procesa elektroštrcanja. Stupanj bubrenja CHT-Cu/HAp mikročestica raste smanjenjem pH vrijednosti inkubacijskog medija i povećanjem udjela hidroksiapatita. Fluorescentna spektrometrija i gravimetrijska metoda korištene pri određivanju ugradnje DOX-a u pripremljene CHT-Cu/HAp mikročestice dale su neočekivane rezultate te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se procijenila efikasnost ugradnje lijeka.

**Ključne riječi:** elektroštrcanje, kitozan, antitumorski lijek, fluorescencija.

## *Drug incorporation into polymeric microparticles*

### **ABSTRACT**

Chitosan is the only natural polycationic polymer whose properties such as biocompatibility, biodegradability and non-toxicity make it ideal for use in agriculture, food and cosmetics industry, wastewater treatment, tissue and bone engineering and as a drug delivery system. Depending on the application, it is possible to prepare chitosan-based materials in the form of emulsions, films, and micro- and nanoparticles, which have proven to be ideal drug carriers. In order to achieve the desired drug release kinetics, and thus successful tumor treatment, it is necessary to prepare micro- and nanoparticles with a controlled size distribution, morphology and structure. Some of the methods used to prepare chitosan microparticles are electrospraying, spray drying, emulsion and precipitation methods. In this work, the electrospraying process was used for the preparation of microparticles. Composite microparticles based on chitosan–copper(II) ions complex and hydroxyapatite (CHT-Cu/HAp) were prepared, while the influence of the addition of hydroxyapatite on the properties and drug loading efficiency of the antitumor drug (doxorubicin, DOX) was investigated. Dry microspheres were analyzed using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) and X-ray diffraction analysis (XRD), and the results indicated the presence of interactions between the polymer matrix and the filler. The size and shape of the microspheres were determined using an inverted light microscope. The sphericity of the prepared microparticles was observed, while the smallest microparticles with the narrowest size distribution were obtained for the system with 5 wt.% HAp (CHT-Cu/HAp5). At a higher content of hydroxyapatite (10 wt.%), larger microparticles with a wider size distribution were obtained due to the instability of the electrospraying process. The swelling degree of CHT-Cu/HAp microparticles increased at lower pH value of the incubation medium and at higher content of hydroxyapatite. Fluorescence spectrometry and the gravimetric method used to analyze the drug loading into the prepared CHT-Cu/HAp microparticles indicated unexpected results; therefore, further investigation is needed to assess the effectiveness of DOX.

**Keywords:** electrospray, chitosan, antitumor drug, fluorescence.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OPĆI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1. Hitin i njegov derivat kitozan .....	2
2.1.1. Hitin .....	2
2.1.2. Kitozan .....	3
2.2. Svojstva kitozana koja utječu na njegovu primjenu .....	4
2.2.1. Molekulska masa .....	4
2.2.2. Stupanj deacetilacije .....	5
2.2.3. Polikationsko svojstvo .....	6
2.2.4. Bubrenje .....	6
2.2.5. Topljivost .....	6
2.2.6. Viskoznost .....	7
2.2.7. Stupanj kristalnosti .....	7
2.3. Primjena kitozana .....	7
2.3.1. Poljoprivreda .....	8
2.3.2. Otpadne vode .....	8
2.3.3. Prehrambena industrija .....	8
2.3.4. Kozmetička industrija .....	9
2.3.5. Liječenje rana i tkivno inženjerstvo .....	9
2.3.6. Nosači lijekova .....	9
2.4. Priprava kitozanskih mikročestica .....	10
2.4.1. Proces elektroštrcanja .....	11
2.4.2. Utjecaj mlaza na veličinu mikročestica .....	12
2.4.3. Svojstva otopine bitna za stabilan proces elektroštrcanja .....	13
2.5. Kompleksi kitozana s prijelaznim metalima .....	14
2.5.1. Mehanizam nastajanja kompleksa .....	14
2.5.2. Pogodnosti kitozana fizikalno umreženoga bakrom .....	15
2.6. Kompozitne mikročestice s anorganskim punilom .....	16
2.6.1. Interakcije kitozana i hidroksiapatita .....	17
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>20</b>
3.1. Materijali .....	20
3.2. Priprava mikročestica .....	20

3.2.1. Priprava otopina .....	21
3.2.2. Proces elektrostrcanja .....	22
3.2.3. Priprava puferskih otopina .....	24
3.2.4. Ugradnja lijeka u polimerne mikročestice .....	24
3.3. Metode identifikacije i karakterizacije .....	25
3.4. Određivanje stupnja bubrenja .....	26
3.5. Određivanje efikasnosti ugradnje lijeka .....	26
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>28</b>
4.1. Određivanje oblika i raspodjele veličina mikročestica .....	28
4.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama (FTIR).....	31
4.3. Rendgenska difrakcijska analiza (XRD) .....	34
4.4. Stupanj bubrenja .....	36
4.5. Procjena efikasnosti ugradnje lijeka .....	37
4.5.1. Procjena efikasnosti ugradnje lijeka primjenom fluorescentne spektrometrije .....	42
4.5.2. Procjena efikasnosti ugradnje lijeka gravimetrijskom metodom.....	45
4.5.3. Prijedlozi metoda za procjenu efikasnosti ugradnje lijeka.....	46
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>48</b>
<b>6. SIMBOLI .....</b>	<b>49</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>52</b>



## 1. UVOD

Kao glavni terapeutici pri liječenju malignih bolesti koriste se citostatici, visokotoksični lijekovi koji ubijaju stanice utječući na staničnu mitozu i sintezu deoksiribonukleinske kiseline (DNK). Glavni nedostatak korištenja citostatika je neselektivnost zbog koje dolazi do oštećenja zdravog tkiva i organa, a time i ozbiljnih nuspojava koje su glavni uzrok visoke stope smrtnosti pacijenata oboljelih od malignih bolesti. Dodatni problem citostatika je i loša apsorpcija u stanice koja rezultira većim dozama terapije, a u konačnici i povećanom toksičnošću [1].

Za uspješnu terapiju potrebno je smanjiti toksičnost citostatika lokaliziranom primjenom, povećanjem selektivnosti i efikasnosti što se može postići ugradnjom lijeka u mikro- i nanonosače kao što su polimerni hidrogelovi, liposomi, lipidi te anorganski i organski nosači iz kojih se lijek u tijelu može otpuštati razgradnjom nosača ili difuzijom lijeka iz nosača u stanicu. Kvalitetni nosači lijekova moraju biti pripremljeni iz biokompatibilnih, biorazgradljivih, netoksičnih materijala koji zadržavaju stabilnost unutar organizma te imaju usku raspodjelu veličina koja osigurava ponovljivost kinetike otpuštanja lijeka [1].

Mikro- i nanočestice koje zadovoljavaju navedene uvjete mogu se pripremiti sušenjem raspršivanjem, precipitacijom, isparavanjem, ionskim geliranjem, dobivanjem iz emulzije ili procesom elektroštrcanja biokompatibilnih i biorazgradljivih polimera poput kitozana i PLGA (kopolimera mliječne i glikolne kiseline). Prednost nad ostalim polimernim materijalima daje se kitozanu jer se relativno jeftino može dobiti iz prirodnih izvora, a njegovom razgradnjom nastaju netoksični produkti koji ne stvaraju kiselu mikrookolinu unutar tijela [2].

Zbog polikationske prirode kitozan se jednostavno može kemijski i fizikalno modificirati polianionskim polimerima, anionima i prijelaznim metalima kako bi se postigla veća stabilnost i željena kinetika otpuštanja lijeka iz polimerne matrice [3].

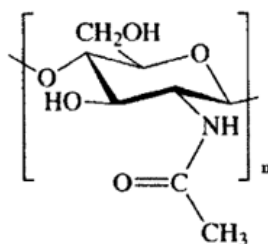
Cilj rada je pripremiti i karakterizirati kompozitne mikročestice na temelju kompleksa Cu(II)–kitozan uz punilo hidroksiapatit kao nosače za antitumorski lijek doksorubicin. Pripremljenim kompozitnim mikročesticama odredit će se kemijski sastav, stupanj bubrenja u medijima različitih pH vrijednosti (puferske otopine pH=6 i pH=7,4 te demineralizirana voda) te procijeniti efikasnost ugradnje lijeka.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Hitin i njegov derivat kitozan

#### 2.1.1. Hitin

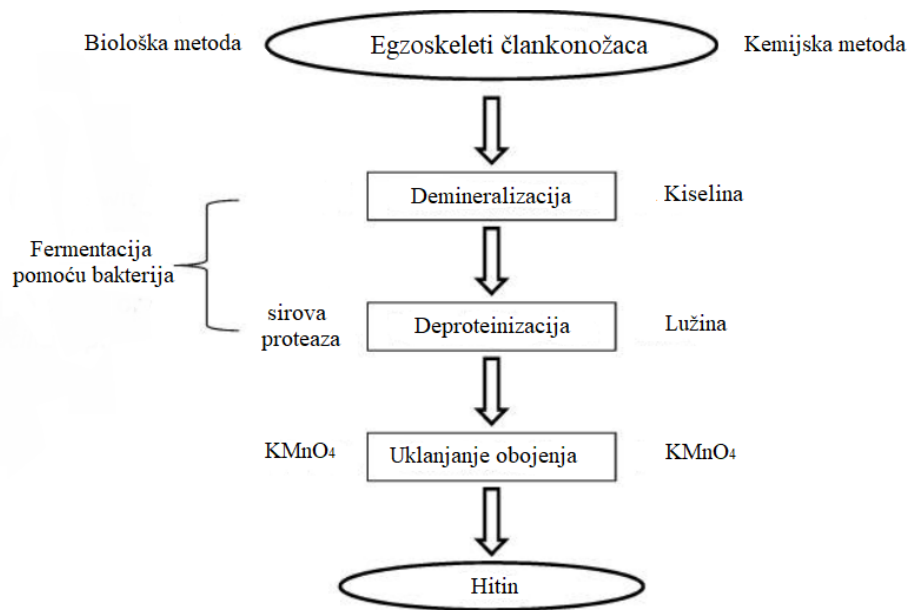
Nakon celuloze, drugi najzastupljeniji biopolimer te najčešći organski materijal koji u sebi sadrži dušik je hitin [4]. Riječ je o strukturnom, linearnom polisaharidu derivatu glukoze, čije su monomerne jedinice *N*-acetil-D-glukozamina (*Slika 1.*) povezane  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glikozidnim vezama [5]. Sastavni je dio egzoskeleta člankonožaca, staničnih stijenki gljiva i kvasaca te mnogih drugih nižih životinjskih vrsta. Iako je u prirodi široko rasprostranjen, glavni izvor su mu oklopi rakova i škampi [6].



*Slika 1.* Monomerna jedinica hitina [7]

Proces dobivanja hitina sastoji se od grupiranja oklopa istog izvora i veličine te njihovo sušenje i usitnjavanje. Proces pročišćavanja, različit ovisno o izvoru sirovog materijala, može se provesti biološkim ili kemijskim metodama (*Slika 2.*) te se pojednostavljeno dijeli na tri koraka: demineralizacija, deproteinizacija i uklanjanje obojenja. Demineralizacija je proces prilikom kojeg se uklanjaju mineralne tvari, prvenstveno kalcijev karbonat. Kemijski se taj proces provodi upotrebom kiselina, primjerice klorovodične kiseline, a biološki fermentacijom uz prisutnost bakterija koje proizvode mliječnu kiselinu. Deproteinizacija uključuje uklanjanje proteina i ostalih organskih tvari koje mogu biti prisutne u uzorku (izuzev hitina). Razlika između biološke i kemijske metode tog koraka također je korišteno sredstvo – dok kemijska metoda koristi lužine, poput natrijeva hidroksida, biološka koristi enzime kao što je proteaza. Uklanjanje obojenja konačni je korak proizvodnje hitina koji se može provesti upotrebom oksidansa, primjerice kalijeva permanganata [8,9].

Iako biološka metoda ne zahtijeva potrošnju velikih količina energije zbog blažih reakcijskih uvjeta u kojima se dobivanje hitina odvija te je ekološki prihvatljivija jer izostaje obrada upotrebom kiselina i lužina, kemijska je metoda i dalje češće korištena. Razlog tome je veća pogodnost kemijske metode za industrijsko dobivanje velikih količina hitina, i u konačnici kitozana, zbog manjih troškova proizvodnje te veće učinkovitosti samoga procesa koji je jednostavniji i brži [9,10].



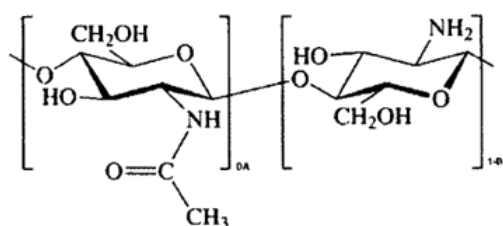
*Slika 2.* Dobivanje hitina iz sirovog materijala [8]

Konačni je produkt bijela, kristalinična krutina [11] koja, unatoč biorazgradljivosti i biokompatibilnosti [7], ne pronalazi široku primjenu zbog acetilnih skupina koje imaju hidrofobni karakter. Acetilne skupine istog ili različitih polimernih lanaca hitina povezuju se jakim vodikovim vezama te hitin čine netopljivim u vodi, razrijeđenim kiselinama i lužinama te većini organskih otapala [11]. Hitin je topljiv isključivo u koncentriranim anorganskim kiselinama uz razgradnju polimera. Rješenje za netopljivost hitina pronađeno je u njegovom derivatu kitozanu.

### 2.1.2. Kitozan

Kitozan je biokompatibilni, biorazgradljivi, netoksični prirodni polisaharid koji se odlikuje antibakterijskim, fungicidnim [12], protuupalnim, antioksidacijskim, hemostatičnim i mukoadhezivnim svojstvima koja omogućuju raznovrsnu primjenu kitozana i njegovih

modificiranih oblika [6]. Kitozan se iz hitina može dobiti smanjenjem stupnja acetilacije. Smanjenje udjela acetilne skupine koja je vezana na dušik postiže se procesom deacetilacije. Dakle, kitozan je kopolimer (*Slika 3.*) koji čine različiti udjeli *N*-acetil-D-glukoamina (acetilirane monomerne jedinice) i D-glukoamina, monomerne jedinice u kojoj je procesom deacetilacije *N*-acetilna skupina prevedena u amino skupinu ( $-\text{NH}_2$ ), a čiji udio mora biti barem 50% kako bi se dobiveni kopolimer mogao smatrati kitozanom [7].



*Slika 3.* Strukturna formula kitozana. DA predstavlja stupanj acetilacije [7]

Proces deacetilacije može se provesti kemijskom i biološkom metodom. Biološka metoda podrazumijeva korištenje enzima, a kemijska metoda reakcije s lužinama, najčešće natrijevim hidroksidom. Kao i kod proizvodnje hitina, zbog manje cijene i veće efikasnosti preferira se kemijska metoda deacetilacije [8]. Dodatna je prednost te metode veća bioaktivnost kitozana koja je posljedica postignutog većeg stupnja deacetilacije i nižih molekulskih masa [10]. Dobra svojstva dobivenog kitozana razlog su njegove široke primjene.

## 2.2. Svojstva kitozana koja utječu na njegovu primjenu

Primjena kitozana uvjetovana je fizikalno-kemijskim svojstvima polimera poput molekulske mase, stupnja deacetilacije, viskoznosti, topljivosti, kristalnosti, reaktivnosti, bubrenja te polikationskog svojstva koja će biti detaljnije objašnjeni u nastavku rada.

### 2.2.1. Molekulska masa

Svi se polimerni materijali sastoje od polimernih lanaca različite duljine, a time i različitih molekulskih masa koje mogu imati užu (velika učestalost pojavljivanja molekula sličnog stupnja polimerizacije) ili širu (mala učestalost pojavljivanja molekula sličnog stupnja

polimerizacije) raspodjelu. Molekulska masa polimera može se odrediti viskozimetrijski, gel-propusnom kromatografijom (kromatografija isključenjem po veličini, engl. *gel-permeation chromatography*) i metodom raspršenja svjetla [13]. Budući da polimerni uzorci nisu monodisperzni, rezultati tih analiza su brojčani, maseni, viskozni ili Z-prosjek molekulskih masa.

Ovisno o molekulskoj masi moguća je podjela na kitozan visokih, srednjih i nižih molekulskih masa. Visokim molekulskim masama smatraju se one veće od 1000 kDa, nižim molekulskim masama one manje od 100 kDa, a sve vrijednosti koje se nalaze između te dvije spadaju u srednje molekulske mase. Molekulska masa manja od 20 kDa obilježje je oligosaharida. Kitozan koji se koristi u komercijalne svrhe obično ima molekulsku masu između 50 i 2000 kDa [14].

Molekulska masa bitan je parametar koji utječe na topljivost i viskoznost polimera. Veće molekulske mase uzrok su veće viskoznosti i netopljivosti kitozana pa se u svrhu smanjenja molekulske mase provodi kiselinjska (najčešća),  $\gamma$ -radijacijska, oksidativna ili enzimjska hidroliza [14]. Kitozani visokih molekulskih masa također pokazuju i smanjenu biološku aktivnost. Općenito, manja molekulska masa rezultira boljom biološkom aktivnošću i topljivošću pa su tako oligosaharidi topljivi u vodi bez potrebe za protoniranjem amino skupina zakiseljavanjem. Pokazuju i bolja antifungalna, antibakterijska, antitumorska i antioksidativna svojstva. Oligosaharidi kitozana pogodniji su za proizvodnju nano- i mikročestica uske raspodjele veličine od ostalih kitozana [14].

### 2.2.2. Stupanj deacetilacije

Stupanj deacetilacije, *DD* (engl. *degree of deacetylation*), definira se kao molarni udio deacetiliranih monomernih jedinica D-glukozamina u polimernom lancu. Suprotno od toga, stupanj acetilacije označava molarni udio acetiliranih monomernih jedinica (*N*-acetilglukozamina). Utjecaj na *DD* ima proces proizvodnje kitozana – proporcionalno duljini procesa raste stupanj deacetilacije, a može se odrediti FTIR spektroskopijom, UV spektrofotometrijom,  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR analizom u čvrstom stanju [13]. Kitozani koji se koriste u komercijalne svrhe većinski imaju stupanj deacetilacije između 50 i 90% [14].

Bitan je parametar jer utječe na molekulsku masu, topljivost, fizikalna (viskoznost, bubrenje) i kemijska (reaktivnost) svojstva te biološku aktivnost kitozana. Viši stupanj deacetilacije smanjuje molekulsku masu te povećava topljivost. Uzrok veće topljivosti porastom *DD*-a je veći broj amino skupina ( $-\text{NH}_2$ ) koje se mogu protonirati ( $-\text{NH}_3^+$ ) u kiselom mediju. Kitozani

većeg stupnja deacetilacije pokazuju bolju protugljivičnu i antibakterijsku aktivnost jer posjeduju veću gustoću pozitivnog naboja [15].

### *2.2.3. Polikationsko svojstvo*

Kitozan je jedini prirodni polimer polikationske prirode. Uzrok polikationske prirode su amino skupine. Gustoća naboja ovisi o stupnju deacetilacije i pH vrijednosti medija [6]. Kod većih stupnjeva deacetilacije očekuje se veća gustoća pozitivnog naboja jer je veći udio D-glukozaminskih monomernih jedinica, a time je veća i količina amino skupina. Zbog polikationske prirode kitozan pokazuje velik afinitet prema polianionskim polimerima, anionima i prijelaznim metalima.

### *2.2.4. Bubrenje*

Bubrenje je proces apsorpcije otapala do uspostave termodinamičke ravnoteže karakteristično za polimere. Općenito, do bubrenja polimera doći će kada postoji afinitet između polimera i otapala, a što je taj afinitet veći, to je stupanj bubrenja polimera veći. Do bubrenja kitozana dolazi zbog protoniranja amino skupina koje uzrokuju unutarmolekulska elektrostatska odbijanja. Stupanj bubrenja kitozana ovisi o pH vrijednosti otopine – pri nižim pH vrijednostima otopine više amino skupina je protonirano, a porast pH uzrokuje deprotonaciju amino skupina što dovodi do smanjenja elektrostatskih odbijanja te u konačnici uzrokuje smanjenje stupnja bubrenja. Osim o pH vrijednosti medija, stupanj bubrenja ovisi i o temperaturi – porastom temperature raste stupanj bubrenja zbog disocijacije vodikovih veza između amino skupina što polimerne lance čini pokretljivijima. Budući da je bubrenje kitozana posljedica protoniranja amino skupina, na njegov stupanj bubrenja može se utjecati kemijskom ili fizikalnom modifikacijom prekursorima koji ostvaruju veze kemijske ili elektrostatske prirode s amino skupinama, poput modifikacije kitozana pentan-1,5-dialom. Kitozanski hidrogelovi koji su sadržavali veći udio pentan-1,5-diala imali su manji stupanj bubrenja zbog povezivanja polimernih lanaca preko amino skupina [16].

### *2.2.5. Topljivost*

Proces bubrenja polimera nastavlja se spontanom prelaskom makromolekula u otapalo – otapanjem polimera. Kitozan je polimer u pravilu netopljiv u vodi, ali topljiv u vodenim otopinama kiselina. Topljivost mu ovisi o stupnju deacetilacije, molekulskoj masi, pH vrijednosti medija, temperaturi i stupnju kristalnosti [6]. Kitozan postaje topljiv tek kada je pH otopine manji od 6. Razlog tome je protoniranje amino skupina. Protonirane amino

skupine povećavaju unutarmolekulska elektrostatska odbijanja te time čine kitozan topljivim [13], stoga materijali na temelju većeg stupnja deacetilacije pokazuju veći stupanj topljivosti. Na topljivost utječe i raspored acetilnih skupina u polimernom lancu. One mogu biti više ili manje jednoliko raspoređene unutar polimernog lanca, a njihov je raspored bitan jer stvaranjem vodikovih veza uzrokuju hidrofobni karakter polimera [7].

#### *2.2.6. Viskoznost*

Viskoznost je mjera otpora kapljevine prema tečenju zbog jakih unutarmolekulskih privlačnih sila. Parametri koji utječu na viskoznost kitozana su koncentracija, temperatura, pH vrijednost otopine, molekulska masa i stupanj deacetilacije. Povećanjem stupnja deacetilacije dolazi do porasta viskoznosti jer zbog povećanja gustoće pozitivnog naboja dolazi do širenja polimernih lanaca. Porastom temperature i smanjenjem koncentracije smanjuje se viskoznost kitozana [6,15]. Porast molekulske mase prati porast viskoznosti [6]. Budući da viskoznost ovisi o molekulskoj masi, viskozimetrijom se može odrediti molekulska masa te prateći promjenu viskoznosti odrediti i stabilnost polimera – razgradnjom polimera dolazi do smanjenja viskoznosti uslijed smanjenja molekulske mase polimera [6].

#### *2.2.7. Stupanj kristalnosti*

Polimerni materijali sadrže kristalnu i amorfnu fazu, a udio pojedine faze utječe na jačinu interakcija, otpornost prema otapalima i morfologiju. Prilikom primjene kitozana pokazalo se da je broj dostupnih amino skupina bitniji od broja slobodnih amino skupina. Glavni parametar koji ima utjecaj na dostupnost amino skupina, a time i na sorpciju vode i mogućnost modifikacije različitim ionima, je stupanj kristalnosti polimera. Kristalna područja (domene) teže su dostupna vodi i ionima, te će manje kristalni uzorci, koji posjeduju veću mobilnost polimernih lanaca, apsorbirati više vode. Budući da su amino skupine kristalnih domena nedostupne, kristalnost je kao parametar bitna prilikom apsorpcije tvari i umreživanja kitozana ionima ili molekulama koje veze s kitozansom ostvaruju preko amino skupina [3].

### **2.3. Primjena kitozana**

Izvršna svojstva kitozana poput biorazgradljivosti, biokompatibilnosti, antibakterijskog, fungicidnog, protuupalnog, hemostatičnog i mukoadhezivnog djelovanja omogućuju raznoliku primjenu tog polimera u poljoprivredi, zaštiti okoliša, prehrambenoj i

kozmetičkoj industriji te medicini [7]. Lako se dobiva u različitim oblicima te kemijski i enzimski modificira. Neki od oblika u kojima se kitozan može koristiti su hidrogelovi, mikro- i nanočestice [1], emulzije te filmovi [17].

### *2.3.1. Poljoprivreda*

U poljoprivredi se kitozan prvenstveno koristi za zaštitu biljaka od nametnika i bolesti, kontrolu rasta i razvoja te poboljšanje simbiotskih odnosa biljaka i biljnih mikroorganizama. Zbog fungicidnih svojstava kitozan se pokazao djelotvornim protiv fitopatogenih gljivičnih vrsta (gljivica koje parazitiraju na biljkama domaćinima) [18]. Niskomolekulski kitozan pokazuje antibakterijska svojstva te poboljšava otpornost biljaka na bolesti uspješno aktivirajući biljne imunološke obrambene mehanizme. Osim za zaštitu biljaka, koristi se i za tretiranje sjemenki kako bi se postigla zaštita u kritičnom stadiju razvoja biljaka, potaknuo rast te postigla bolja dobava mikronutrijenata [19].

### *2.3.2. Otpadne vode*

Osim u poljoprivredi, kitozan moguću primjenu pronalazi i u procesima pročišćavanja otpadnih voda. Zbog sposobnosti bioadsorpcije istražuje se kao sredstvo za flokulaciju koloidnih nečistoća [20] te sredstvo za uklanjanje teških metala poput kroma i kadmija iz zagađenih voda preko ultrafiltrirajućih membrana. Kitozan je pogodan za proizvodnju membrana jer se lako izvlači u tanke filmove [21], a s metalima stvara komplekse u kojima je metalni ion centralni ion, a kitozan ligand te tako zadržava teške metale na spomenutim membranama [3]. Primjerice CHT-PVA membrane modificirane polietilen glikolom i višestjenčanim ugljikovim nanocijevčicama koje sadrže amino skupine pokazale su se kao dobro sredstvo za adsorpciju bakra iz otpadnih voda [21]. Moguća je i primjena kitozana prilikom uklanjanja bojila i ostalih organskih zagađivala kao što su pesticidi i masti ili ulja iz otpadnih industrijskih voda [20].

### *2.3.3. Prehrambena industrija*

Biorazgradljivost, netoksičnosti, antimikrobno i fungicidno djelovanje omogućuju primjenu kitozanskih emulzija i jestivih filmova u prehrambenoj industriji, prvenstveno kako bi se produljio rok trajanja prehrambenih proizvoda i inhibirao razvoj mikroba [17]. Kitozan, zbog svoje polikationske prirode, inhibira rast mikroba stvarajući elektrostatske veze s negativno nabijenim staničnim stjenkama. Primjerice, primjenom zaštitnog sloja na bazi kitozana smanjen je nastanak plijesni na trešnjama [22]. Pokazalo se da kitozan u kombinaciji



s kalcijevim kloridom usporava razvoj plijesni na kruškama, glukozom modificirani kitozan usporava truljenje gljiva te poboljšava njihovu kvalitetu, a emulzije na bazi kitozana potencijalno bi se mogle primjenjivati kao prevlake na kokošnjim jajima kako bi zadržale kvalitetu i postigle dulji rok trajanja [17].

#### *2.3.4. Kozmetička industrija*

Biokompatibilnost i prirodno porijeklo kitozana otvaraju mogućnost primjene njegovih modificiranih oblika u kozmetičkoj industriji gdje bi mogli zamijeniti učestalo korištene sintetske (dobivene iz petrokemijskih izvora) i silikonske (na bazi silicija) polimere koji su sastavni dio kozmetičkih proizvoda. Proizvodi za njegu kože koji sadrže kitozan već se nalaze u ponudi na tržištu [23]. U njima se kitozan koristi kao sredstvo za hidrataciju, protiv akni i protiv starenja. U proizvodima za njegu kose kitozan smanjuje statički elektricitet kose, omogućuje hidrataciju i smanjuje oštećenja [7, 23].

#### *2.3.5. Liječenje rana i tkivno inženjerstvo*

Primjena kitozana u medicini i tkivnom inženjerstvu temelji se na njegovoj biokompatibilnosti, biorazgradljivosti, netoksičnosti, antibakterijskom, antimikrobnom i fungicidnom djelovanju te imuno-potencirajućoj aktivnosti. U obliku membrana i ispređenih vlakana koristi se prilikom liječenja rana i opekline jer aktivira makrofage i neutrofile (bijeke krvne stanice koje sudjeluju u imunološkom odgovoru), potiče re-epitalizaciju i staničnu aktivnost, limitira nastajanje ožiljaka te sprječava infekciju. U inženjerstvu koštanog i hrskavičnog tkiva primjenu pronalazi jer ima sposobnost zadržavanja željene morfologije tkiva. Kitozan-kalcij fosfat kompoziti korišteni su prilikom zarastanja kosti jer veća koncentracija kalcija poboljšava odgovor osteoblasta, stanica koje propagiraju rast kosti, a kitozan potiče endohondralno okoštavanje, proces kojim dolazi do nastanka kosti primarno zamjenom hrskavičnoga tkiva koštanim [24].

#### *2.3.6. Nosači lijekova*

Nano- i mikročestice obećavajući su nosači lijekova jer pospješuju kontrolirano i lokalizirano otpuštanje lijeka, a time omogućavaju stalne razine lijeka u organizmu, osiguravaju bolju stabilnost aktivnih tvari sprječavajući gubitak bioaktivnosti ili razgradnju lijeka te pospješuju terapiju. Primjerice, pokazalo se da je moguće kontrolirati brzinu otpuštanja progesterona iz PLGA (kopolimer mliječne i glikolne kiseline) mikročestica dobivenih procesom elektroštrcanja promjenom omjera monomernih jedinica mliječne i

glikolne kiseline u polimeru [25]. U tijelu se lijek iz nosača može otpuštati difuzijom iz čestica ili biorazgradnjom polimera [26].

Kitozanske nano- i mikročestice intenzivno se istražuju kao nosači lijekova, poput inzulina i antitumorskih lijekova te hormona i vitamina [25,26]. Prednost kitozana nad sintetskim biorazgradljivim polimerima je u tome što su produkti njegove razgradnje aminošećeri koje tijelo enzimski razgrađuje. Time ne dolazi do nastanka kisele mikrookoline unutar tijela. Primjerice, nanočestice kompleksa kitozan-dekstran sulfat mogu se koristiti za oralnu primjenu inzulina. Njihova pH osjetljivost štiti inzulin u želucu, a bioadhezivnost omogućava produljeni kontakt sa sluznicom crijeva što pospješuje apsorpciju inzulina [2].

Posebno važan utjecaj polimernih mikročestica u dostavi lijeka je smanjena toksičnost, a time i manji broj nuspojava antitumorskih lijekova zbog lokalizirane primjene i visokoselektivnog nakupljanja polimernih mikročestica u stanicama tumora koji omogućuju korištenje manjih količina antitumorskih lijekova za uspješnu terapiju [1]. Primjer uspješne terapije s kitozansom kao polimernim nosačem lijeka je doksorubicin, visokotoksičan lijek za čvrste tumore. On je, u kombinaciji s dekstranom, polisaharidom koji mu smanjuje toksičnost, uspješno nanašen na kitozanske nanogelove [27], trodimenzionalne hidrofilne čestice koje mogu apsorbirati velike količine vode i bioloških tekućina [1]. Efikasnost tih nanogelova dokazana je testiranjima *in vivo* koja su pokazala da je veća regresija tumora i dulji životni vijek postignut uporabom doksorubicina-dekstrana nanesenog na kitozanske nanočestice nego uporabom čiste kombinacije doksorubicina-dekstrana ili klasičnog doksorubicina [27].

## **2.4. Priprava kitozanskih mikročestica**

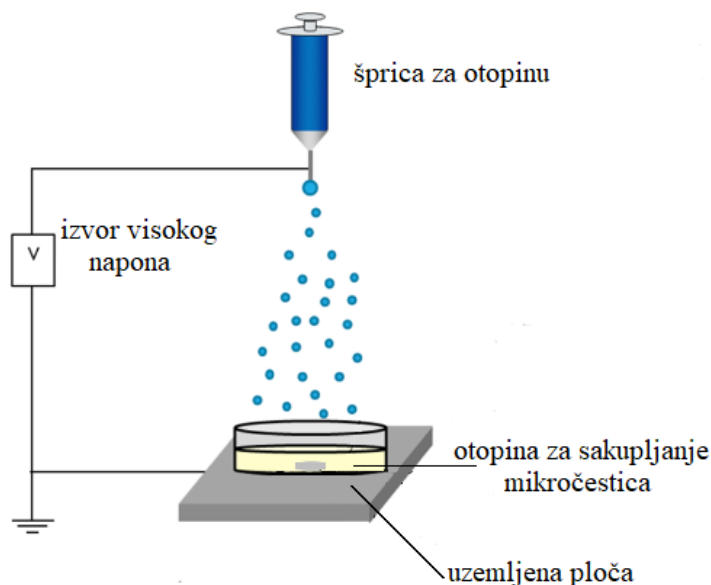
Kako bi se poboljšala efikasnost ugradnje lijeka na polimerne mikročestice te postigla bolja kontrola otpuštanja terapeutika, potrebno je proizvesti čestice točno kontrolirane veličine, oblika i raspodjele veličine čestica. Pokazalo se da monodisperzni sustavi omogućuju bolju kontrolu, a time i ponovljivost kinetike otpuštanja lijeka. Osim monodisperznosti, važan faktor koji određuje kinetiku otpuštanja lijeka je i morfologija čestica koja utječe na način i brzinu razgradnje polimerne matrice [24]. Neke od metoda kojima se postiže dobra kontrola navedenih svojstava su sušenje raspršivanjem, precipitacija, isparavanje, ionsko geliranje, dobivanje iz emulzije i proces elektroštrcanja.

Zbog jednostavnosti procesa koji se sastoji od jednog koraka, male cijene, ponovljivosti i blagih uvjeta u kojima se izvodi, elektroštrcanju se daje prednost pred ostalim metodama proizvodnje polimernih mikročestica [25,27-29]. Također, izostaje upotreba surfaktanata koji šire raspodjelu veličina čestica [26] i organskih otapala, a moguća je i uporaba polimera većih molekulskih masa i proizvodnja čestica na nanoskali [29]. Osim toga, dobivene su čestice stabilnije, imaju užu raspodjelu veličina čestica, ne dolazi do aglomeracije čestica, a lijek je efikasnije nanesen na njih [25].

#### 2.4.1. Proces elektroštrcanja

Proces elektroštrcanja temelji se na teoriji nabijenih čestica; električno polje primijenjeno na kapljicu unutar nje izaziva elektrostatsku silu (Coulombovu silu). Ta se sila suprotstavlja kohezivnoj sili unutar kapljice (površinskoj napetosti), a u trenu u kojem je nadjača dolazi do raspada kapljice na manje čestice čija je veličina na mikro- i nanoskali [28].

Aparatura za elektroštrcanje jeftina je i jednostavna za izvesti (*Slika 4.*). Sastoji se od šprice u koju se stavlja otopina i vodljive kapilare (igle), izvora visokog napona (reda veličine u kilovoltima i većinom pozitivnog) te kolektora koji se postavlja na željenu udaljenost od igle, a na koji se sakupljaju proizvedene čestice. Kolektor može biti uzemljen ili suprotnog pola od onog primijenjenoga na metalnu iglu. Također, može biti u obliku ploče na koju se sakupljaju suhe čestice (otapalo isparava prilikom raspršivanja čestica) ili otopine iz koje se kasnije izdvajaju prikupljene čestice [28,29].

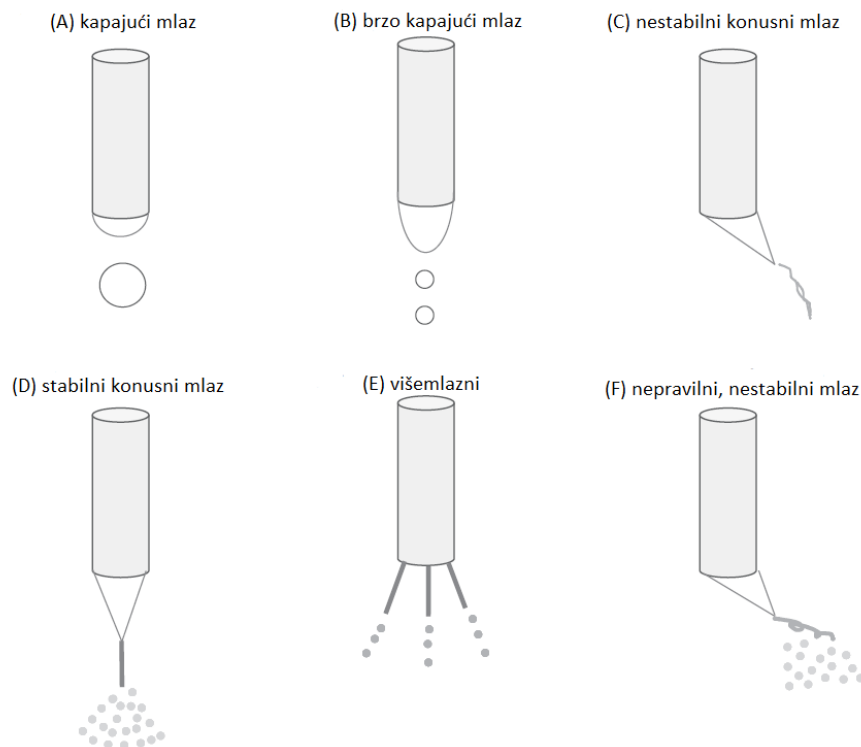


**Slika 4.** Pojednostavljena shema aparature za elektroštrcanje [30]

Za proizvodnju kitozanskih mikročestica iz kiselih otopina u kojima je topljiv, sakupljanje u lužnatoj otopini u kojoj taloži pogodno je jer dodatno uklanja ostatke otapala koje nije isparilo prilikom elektroštrcanja. Također, sakupljanjem u otopini mikročestice zadržavaju željeni sferični oblik, a lagano miješanje dodatno sprječava aglomeraciju. Nedostatak sakupljanja mikročestica u otopini je nemogućnost istovremene proizvodnje mikročestica i uklapanja nekih lijekova. Kada bi se u istom koraku proizvele mikročestice i u njih ugradio lijek, sakupljanje mikročestica u otopini moglo bi dovesti do hidrolize lijeka što smanjuje efikasnost ugradnje. Primjer takvoga lijeka je doksorubicin koji se iz tog razloga na mikročestice ugrađuje naknadno [26].

#### 2.4.2. Utjecaj mlaza na veličinu mikročestica

Elektroštrcanjem otopine iz igle moguće je postići različite mlazove (*Slika 5.*), ovisno o primijenjenom naponu. Kako se povećava napon tako se dobiveni mlaz mijenja iz kapajućih prema konusnima, a daljnjim porastom napona dolazi do razdvajanja mlaza u više smjerova te pojave nepravilnih i nestabilnih mlazova koji se trebaju izbjegavati zbog nelokaliziranog sakupljanja čestica [25]. Kako bi se dobile mikročestice pravilnog oblika i uske raspodjele veličine čestica, potrebno je osigurati pogodan mlaz [2,27,28].

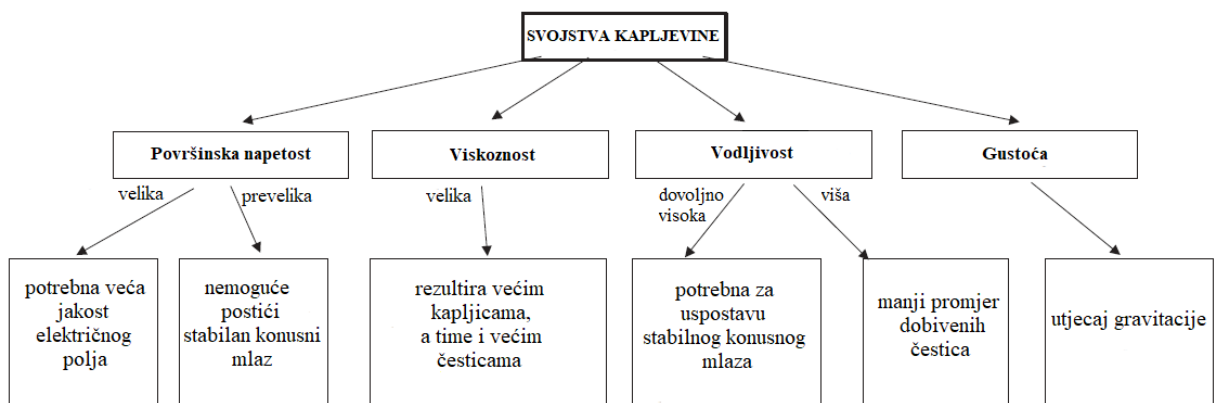


**Slika 5.** Ilustracija različitih mlazova prilikom procesa elektroštrcanja [25]

Jedino se uspostavom stabilnog, Taylorovog konusnog mlaza (*Slika 5. (D)*), u kojem je proces raspada kapljice stabilan, mogu dobiti monodisperzni sustavi polimernih mikročestica. Taylorov konus nastaje kada elektrostatska sila iznosom bude bliska vrijednosti površinske napetosti jer dolazi do nakupljanja naboja na površini kapljice. Taj naboj deformira kapljicu, a kada nadjača površinsku napetost dolazi do raspada kapljice na manje. Dobivene mikročestice su tada dobro dispergirane, uske raspodjele veličina, a do aglomeracije prilikom sakupljanja čestica ne dolazi zbog odbojnih Coulombovih sila između istovrsnih naboja [26,28]. Eksperimentalno se uspostava stabilnog konusnog mlaza može odrediti vizualno, prateći izgled mlaza, ili kontrolom struje koja prolazi kroz kapilaru – kada je postignut stabilni konusni mlaz, struja koja prolazi kroz iglu je stalna [31]. Osim o naponu, postignuti mlaz ovisi o protoku otopine kroz kapilaru i svojstvima otopine. Elektroštrcanjem mikročestica polistirena u otopini dimetilformamida pokazalo se da napon potreban za uspostavu stabilnog konusnog mlaza raste porastom protoka otopine kroz kapilaru [32].

#### 2.4.3. Svojstva otopine bitna za stabilan proces elektroštrcanja

Na veličinu i morfologiju čestica te raspodjelu veličina čestica utječu svojstva otopine koja se elektroštrca (*Slika 6.*), poput površinske napetosti, viskoznosti, električne vodljivosti i gustoće.



*Slika 6.* Svojstva kapljevine koja utječu na proces elektroštrcanja [25]

Električna vodljivost otopine ima velik utjecaj na stabilnost procesa proizvodnje mikročestica elektroštrcanjem; samo određene vrijednosti električne vodljivosti daju stabilne mlazove koje je moguće kontrolirati promjenom parametara poput napona i protoka kroz kapilaru. Unutar tog intervala u kojem je moguća uspostava stabilnih mlazova veća električna vodljivost

rezultira manjim promjerom dobivenih čestica [33]. Pokazalo se da preniska električna vodljivost i prevelika viskoznost otopine onemogućuju uspostavu stabilnog konusnog mlaza [34].

Veća površinska napetost i veća električna vodljivost zahtijevaju veću jakost primijenjenog električnog polja za uspostavu stabilnog konusnog mlaza [32].

Budući da se proces elektroštrcanja odvija u jednom koraku u blagim uvjetima (sobna temperatura, atmosferski tlak) te, osim otapanja, ne zahtijeva dodatnu obradu kitozana, ova metoda omogućuje pripremu velikog broja raznovrsnih modificiranih nano- i mikročestica na temelju kitozana koje imaju poboljšanu morfologiju, oblik i svojstva.

## **2.5. Kompleksi kitozana s prijelaznim metalima**

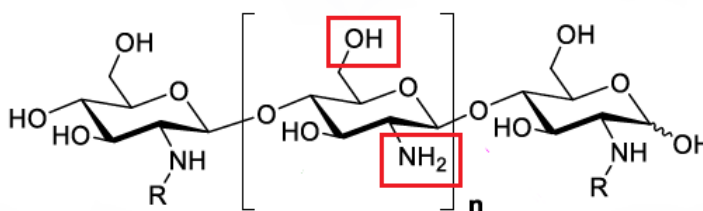
Iako je materijale na temelju kitozana lakše pripremiti nego materijale na temelju hitina, njihova je stabilnost narušena hidrofилnim karakterom i pH-osjetljivošću [7]. Zbog hidrofилne prirode kitozan stvara hidrogelove adsorpcijom velikih količina otapala (vode) što dovodi do smanjenja stabilnosti kitozanskih nano- i mikročestica. Posebno visok stupanj bubrenja kitozan pokazuje u razrijeđenim kiselinama što u konačnici dovodi do otapanja mikročestica na temelju kitozana [29]. Uzrok bubrenja kitozana su slabe vodikove veze između paralelnih polimernih lanaca. Kako bi se poboljšala stabilnost kitozana u kiselom mediju, potrebno mu je modificirati strukturu.

Polikationska priroda kitozana omogućuje njegovo povezivanje s polianionskim materijalima, anionima i prijelaznim metalima. Za modifikaciju kitozanskih mikročestica pogodnije je fizikalno umreživanje prijelaznim metalima poput bakra jer, za razliku od primjerice kemijskog umrežavanja genipinom, njihovo povezivanje s polimerom ne uključuje toksične kemikalije koje mogu zaostati u materijalu [29].

### *2.5.1. Mehanizam nastajanja kompleksa*

Prijelazni metali pogodni su za stvaranje kompleksa s kitozansom jer posjeduju nepopunjene d- i f- orbitale koje omogućuju stvaranje kompleksa između polimera i atoma tih metala. Komplekse s prijelaznim metalima kitozan radi kelirajućim mehanizmom koji je opisan sposobnošću atoma ili iona da stvara koordinatnu vezu u kojoj je kitozan elektrodonor

(posjeduje slobodne elektrone), a prijelazni metal elektron akceptor (posjeduje prazne elektronske orbitale) [3]. Predloženo je nekoliko modela koji objašnjavaju nastajanje koordinatne veze između kitozana i prijelaznih metala [3,29]. Neki od njih pretpostavljaju da u stvaranju koordinatne veze sudjeluju samo amino skupine, dok prema drugim modelima uz amino skupinu ( $-\text{NH}_2$ ) u stvaranju koordinatne veze sudjeluju i hidroksilne skupine ( $-\text{OH}$ ) polimernog lanca. (Slika 7.)



**Slika 7.** Funkcionalne skupine kitozana koje stvaraju koordinatne veze: amino skupina ( $-\text{NH}_2$ ) i hidroksilna skupina ( $-\text{OH}$ ) [6]

Prvi model koji predlaže da koordinatnu vezu kation metala stvara samo s amino skupinama je „model privjeska“ prema kojemu je kation poput privjeska povezan na isključivo jednu amino skupinu. Drugi je „model mosta“ u kojemu su minimalno dvije amino skupine istog ili više različitih lanaca povezane kationom, a treći je model u kojemu kation također ima ulogu „mosta“, ali stvara točno četiri koordinatne veze s amino skupinama dajući kvadratno-planarnu geometriju. Model koji pretpostavlja da u tvorbi koordinatnih veza sudjeluju i hidroksilne skupine kaže da se četiri koordinatne veze prijelaznog metala stvaraju s dvije amino i dvije hidroksilne skupine [3,29].

### 2.5.2. Pogodnosti kitozana fizikalno umreženoga bakrom

Elektroštrcanjem su dobivene stabilne mikročestice kitozana modificiranog bakrom. Pokazalo se da dodatak bakra ima dvojak ulogu: smanjuje dinamičku viskoznost otopine kitozana, a veće koncentracije bakra daju pravilne, sferične mikročestice bolje morfologije [29]. Također, kompleks bakra i kitozana potencijalno sinergijski djeluje s doksorubicinom kao citostatik što dodatno smanjuje koncentraciju lijeka potrebnu za uspješnu terapiju.

Bakar potiče proizvodnju ROS-a (engl. *reactive oxygen species*), reaktivne molekule koje sadrže perokside ( $-O_2^{2-}$ ), superokside ( $-O_2^-$ ) te hidroksi-radikale ( $OH\cdot$ ) koji u određenoj mjeri nastaju prilikom normalne funkcije stanice, a štetni su za nukleinske kiseline, lipide i proteine. Oksidativni stres potaknut prekomjernom proizvodnjom ROS-a, na koji su tumorske stanice osjetljivije od zdravih stanica, mogao bi se koristiti pri liječenju malignih bolesti. Kompleks u kojemu je centralni atom bakar, a ligandi organska molekula fenantolin potaknuo je proizvodnju hidroksi-radikala te posljedično razgradnju DNK *in vitro* [35]. Prilikom kompleksiranja koriste se organski ligandi jer je toksičnost kompleksa bakra veća od toksičnosti ostalih bakrovih spojeva. Primjerice, citotoksičnost bakar-(pirazol-piridin) kompleksa je do 20 puta veća od citotoksičnosti  $CuCl_2$  [36].

## 2.6. Kompozitne mikročestice s anorganskim punilom

Morfologija nosača lijeka i efikasnost ugradnje lijeka u nosač mogu se dodatno poboljšati dodatkom bioaktivne keramike. Primjerice, Hao i suradnici sintetizirali su nanočestice mezoporozne silike s i bez dodatka bioaktivne keramike (hidroksiapatita) te ustanovili da je ugradnja citostatika (doksorubicina) u nanočestice koje sadrže hidroksiapatit i do pet puta veća u odnosu na nanočestice koje ne sadrže hidroksiapatit. Također, dodatak hidroksiapatita riješio je problem nakupljana nanočestica mezoporozne silike u organe poput jetre, slezene i bubrega povećanjem biorazgradljivosti materijala [37].

Hidroksiapatit (HAp),  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  je anorganska tvar koja se zbog svoje biokompatibilnosti, biorazgradljivosti, netoksičnosti, osteokonduktivnosti i velike dostupnosti koristi u liječenju rana, tkivnom inženjerstvu te kao komponenta nosača lijekova. Strukturom je najbliži anorganskoj komponenti koja gradi kosti. Može se dobiti sintetski ili iz prirodnih izvora. Sintetski hidroksiapatit, za koji je tipičan stehiometrijski omjer  $Ca/P=1,67$ , može se dobiti reakcijom u čvrstom stanju, sol-gel procesom, iz emulzije i mikroemulzije te hidrotermalnom metodom iz spojeva poput kalcijeva pirofosfata ( $Ca_2P_2O_7$ ), natrijeva hidrogenfosfata ( $Na_2HPO_4$ ) i kalijeva hidrogenfosfata ( $K_2HPO_4$ ). Proizvodnja sintetskog hidroksiapatita skuplja je od proizvodnje hidroksiapatita koji se dobiva iz prirodnih izvora, a dobiveni produkt ne sadrži ione poput magnezija, natrija, fosfora, silicija i željeza koji imaju utjecaj na koštano tkivo. Budući da nije biorazgradljiv te sporije potiče regeneraciju kosti, za biomedicinske primjene koristi se hidroksiapatit iz prirodnih izvora [38].



Prirodni izvori hidroksiapatita su kosti sisavaca i riba te ljuska jajeta i kamenica iz kojih se HAp dobiva uklanjanjem organskih tvari iz anorganske matrice metodama kalciniranja, precipitacije ili alkalne hidrolize. Hidroksiapatit dobiven iz prirodnih izvora zbog supstitucije različitim ionima ne posjeduje omjer Ca/P jednak 1,67 [38].

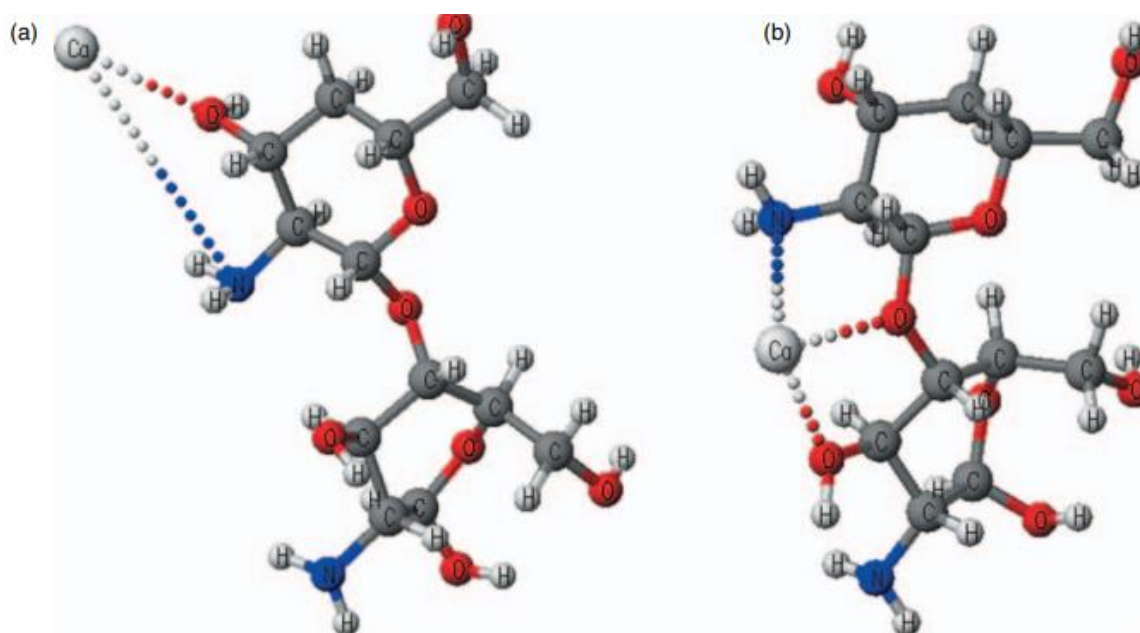
Osim supstitucije kationima poput magnezija, natrija i stroncija, u strukturi prirodnog hidroksiapatita dolazi do ugradnje karbonatne ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) skupine zbog otopljenog  $\text{CO}_2$  u vodenoj otopini fosfata. Rezultat supstitucije fosfatne skupine karbonatnom je B-tip hidroksiapatita, a ako karbonatna skupina supstituira hidroksilnu skupinu, dobiva se hidroksiapatit A-tipa [39]. Pokazalo se da B-tip hidroksiapatita, zbog supstitucije fosfatnih iona karbonatnim, ima manju kristalnost, a time i veću topljivost što povoljno utječe na biorazgradljivost i poticanje rasta koštanog tkiva [40]. Kiselost i topljivost hidroksiapatita ovise i o Ca/P omjeru – što je omjer veći, kiselost i topljivost HAp-a su manji [39].

Hidroksiapatit se često koristi kao punilo u materijalima na temelju kitozana, potičući proliferaciju, diferencijaciju, adheziju i migraciju osteoblasta [41]. Pogodan je nosač lijeka ili punilo koje poboljšava ugradnju lijeka (koji sadrži hidroksilne skupine) u nosače na temelju polimera. Lijekovi koji posjeduju hidroksilne skupine uspostavljaju veze elektrostatske prirode s kalcijevim ionima hidroksiapatita. Liu i suradnici dokazali su da ugradnja doksorubicina na mikro- i nanočestice hidroksiapatita pospješuje terapiju liječenja osteosarkoma. Nanočestice hidroksiapatita u koje je ugrađen doksorubicin endocitozom (prijenost tvari u stanicu uvrtnjem stanične membrane koja stvara citoplazmatski mjehurić) ulaze u tumorske stanice. U lizosomima (organeli koji sudjeluju u međustaničnoj probavi), zbog kisele mikrookoline, dolazi do pucanja veza između doksorubicina i hidroksiapatita, a doksorubicin ulazi u mitohondrije (organeli koji služe kao izvor stanične energije). Nakon ulaska u mitohondrije, prekida njihovu staničnu funkciju, sprječava migraciju tumorskih stanica te, u konačnici, uzrokuje staničnu smrt. Također, Liu i suradnici pokazali su da hidroksiapatit prethodno ugrađen u tijelo ima sposobnost na sebe vezati molekule doksorubicina koji kruži u tijelu. Mikro- i nanočestice hidroksiapatita ugrađene u abdominalno tkivo štakora pokazale su i do tri puta viši intenzitet fluorescencije (izazvan doksorubicinom koji je kružio organizmom) od okolnog tkiva [42].

### *2.6.1. Interakcije kitozana i hidroksiapatita*

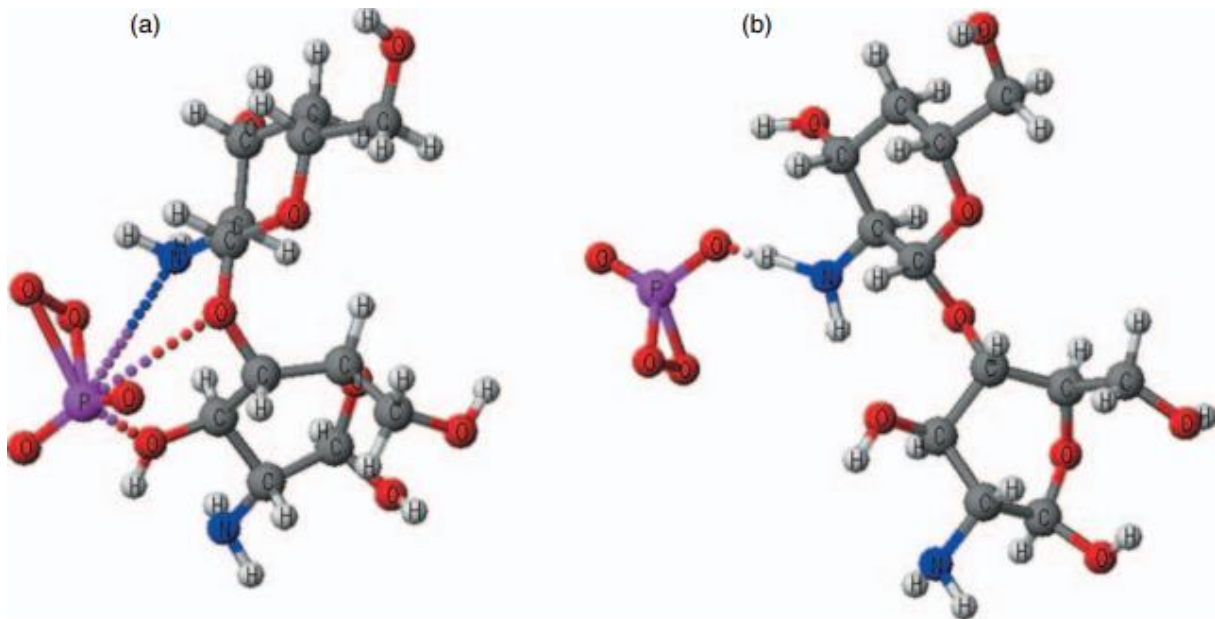
Veza između kitozana i hidroksiapatita elektrostatske je prirode – kalcijevi ( $\text{Ca}^{2+}$ ), fosfatni ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) i hidroksilni ioni ( $\text{OH}^-$ ) hidroksiapatita ostvaruju vodikove veze s

hidroksilnim i amino skupinama kitozana što dovodi do promjene u fizikalno-kemijskim svojstvima materijala. Energetski najpovoljniji modeli koji su predloženi kao objašnjenje interakcija između kitozana i hidroksiapatita uključuju interakcije kalcijevih iona (*Slika 8.*) i fosfatnih iona (*Slika 9.*) s amino i hidroksilnim skupinama kitozana. Pretpostavlja se da kalcijev ion (sam ili povezan s hidroksilnom skupinom) ostvaruje interakcije s amino i hidroksilnom skupinom iste monomerne jedinice (*Slika 8. (a)*), ili amino skupinom jedne i hidroksilnom skupinom druge monomerne jedinice polimernog lanca (*Slika 8. (b)*) [43].



**Slika 8.** Shematski prikaz mogućih interakcija kitozana s ionom kalcija ( $\text{Ca}^{2+}$ ) [43]

Za fosfatnu se skupinu pretpostavlja da ostvaruje vodikove veze s amino skupinom jedne te hidroksilnom skupinom druge monomerne jedinice. Prema tom modelu vodikova veza s amino skupinom uspostavlja se s atomom fosfora, a s hidroksilnom skupinom s atomom kisika (*Slika 9. (a)*). Drugi model predlaže nastanak jedne vodikove veze između fosfatne skupine s amino skupinom preko atoma kisika (*Slika 9. (b)*) [43].



*Slika 9.* Shematski prikaz mogućih interakcija kitozana s fosfatnim ionom ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) [43]

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

U nastavku rada navedeni su korišteni materijali i metode za pripremu mikročestica, metode identifikacije i karakterizacije dobivenih mikročestica te je objašnjen postupak ugradnje lijeka u mikročestice i procijenjena efikasnost ugradnje lijeka.

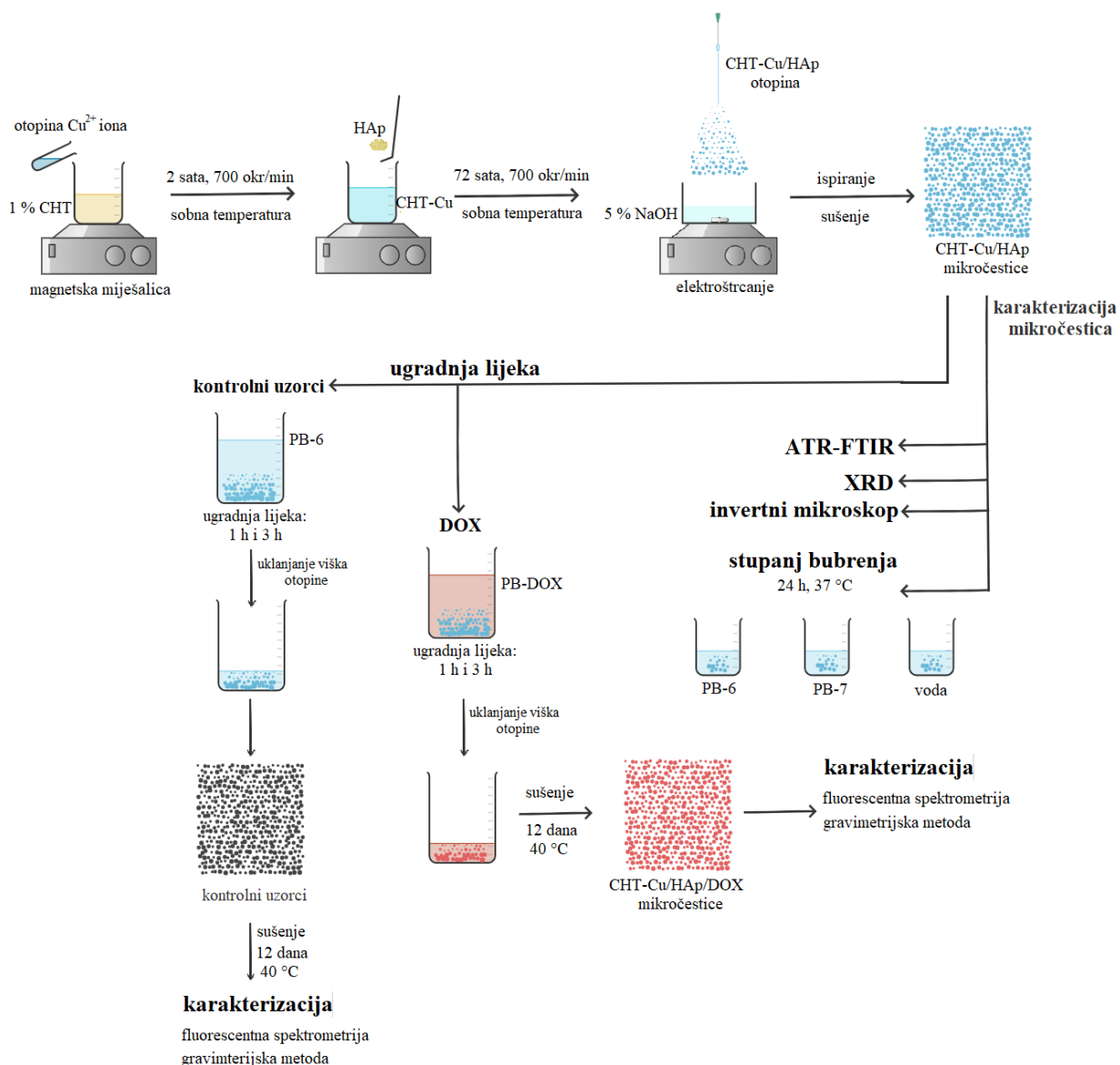
#### 3.1. Materijali

U ovom radu korišteni su sljedeći materijali:

- Kitozan, CHT 85/200 (stupanj deacetilacije 83,2%; Heppe Medical Chitosan GmbH; Njemačka)
- Octena kiselina,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (99,8%; Lach-Ner; Češka)
- Bakar(II) acetat monohidrat,  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times \text{H}_2\text{O}$  (BDH Prolabo; UK)
- Hidroksiapatit,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  dobiven metodom precipitacije
- Natrijev hidroksid, NaOH mini perle (Gram-mol d.o.o.; Hrvatska)
- Demineralizirana voda
- Etanol,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  (96%; KEFO d.o.o.; Slovenija)
- Aceton,  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$  (Honeywell Riedel-de Haen; Njemačka)
- Bezvodni natrijev hidrogenfosfat,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Gram-mol d.o.o.; Hrvatska)
- Natrijev dihidrogenfosfat monohidrat,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (VWR Chemicals; UK)
- Doksorubicin HCl (Biosynth Carbosynth; Švicarska)

#### 3.2. Priprava mikročestica

*Slika 10.* prikazuje shemu provedbe eksperimentalnog dijela rada.



**Slika 10.** Shematski prikaz priprave i karakterizacije kompozitnih mikročestica na temelju kompleksa kitozan-bakar (CHT-Cu) i anorganske faze (hidroksiapatit, HAp) te ugradnje antitumorskog lijeka doksorubicina (DOX) u pripremljene mikročestice

### 3.2.1. Priprava otopina

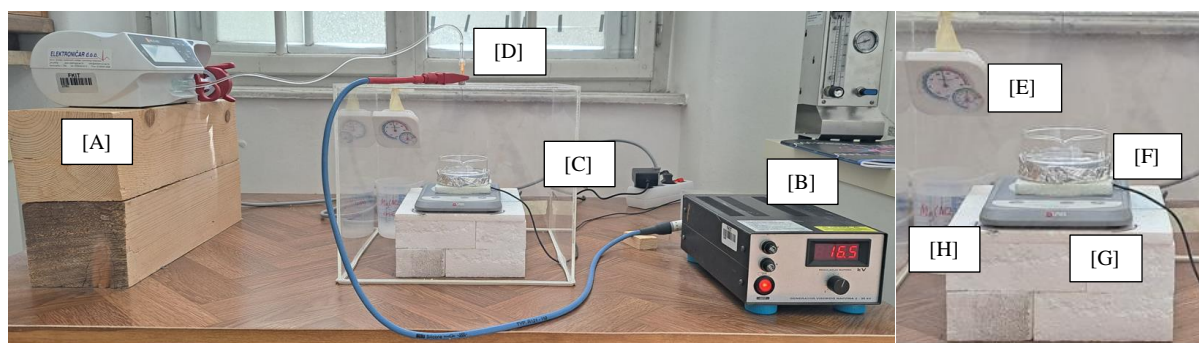
Prvo je pripremljena 1 mas.% otopina kitozana (CHT) otapanjem polimera u 1 %-tnoj otopini octene kiseline pri sobnim uvjetima. Dobivena otopina filtrirana je kako bi se uklonile prisutne nečistoće. Zatim je pripremljena otopina  $\text{Cu}^{2+}$  iona otapanjem određene količine bakrova(II) acetata monohidrata u destiliranoj vodi. Masa soli koju je potrebno otopiti određena je ovisno o množinskom omjeru bakrovih iona i amino skupina u polimernom lancu

koji je iznosio  $n(\text{Cu}^{2+}):n(-\text{NH}_2)=0,0916:1$ . Potrebna količina bakrovih iona određuje se prema količini amino skupina jer se pretpostavlja da  $\text{Cu}^{2+}$  ioni primarno ostvaruju interakcije s atomom dušika amino skupine [29]. Kako bi se postigao zadani množinski omjer bakrovih iona i amino skupina, otopina kompleksa kitozan-bakar ( $\text{CHT-Cu}^{2+}$ ) pripremljena je miješanjem otopine polimera i otopine  $\text{Cu}^{2+}$  iona u volumnom omjeru  $V(\text{CHT}):V(\text{Cu}^{2+})=8,8:1,2$  te je otopina kompleksa miješana 72 sata.

Suspenzije za dobivanje kompozitnih mikročestica koje kao punilo sadrže hidroksiapatit (HAp) pripremljene su dodatkom hidroksiapatita u pripremljenu otopinu kompleksa kitozan-bakar. Priprava suspenzija  $\text{CHT-Cu}^{2+}/\text{HAp}$  različitih masenih udjela hidroksiapatita provedena je pri sobnim uvjetima, dodatkom odgovarajuće mase hidroksiapatita, a koja je potrebna za postizanje masenog omjera  $\text{CHT-Cu}^{2+}/\text{HAp}=95/5$  (uzorak  $\text{CHT-Cu}/\text{HAp}5$ ) i  $\text{CHT-Cu}^{2+}/\text{HAp}=90/10$  (uzorak  $\text{CHT-Cu}/\text{HAp}10$ ). Suspenzije su miješanje 72 sata.

### 3.2.2. Proces elektroštrcanja

Mikročestice na temelju kitozana fizikalno umreženoga s  $\text{Cu}^{2+}$  ionima s i bez dodatka anorganske faze (hidroksiapatita) pripravljene su procesom elektroštrcanja koristeći aparaturu prikazanu na *Slici 11*.



**Slika 11.** Aparatura za elektroštrcanje: [A] pumpa, [B] izvor visokog napona, [C] komora izrađena od poli(metil-metakrilata), [D] metalna igla, [E] senzor temperature i relativne vlažnosti, [F] 50 mL 5 %-tne otopine NaOH za sakupljanje mikročestica, [G] magnetska miješalica, [H] zasićena otopina  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$

Šprica od 10 mL prvo je napunjena pripremljenom  $\text{CHT-Cu}^{2+}$  otopinom s, odnosno bez dodatka HAp-a te je spojena na pumpu koja održava potrebni protok otopine. Igla je

pozitivno nabijena, a kolektor uzemljen. Kao kolektor korištena je staklena kristalizerka u kojoj se nalazilo 50 mL 5 %-tne otopine NaOH, pripremljena otapanjem potrebne mase NaOH u demineraliziranoj vodi. Kristalizerka je izolirana aluminijskom folijom, a otopina za sakupljanje mikročestica lagano miješana kako bi se izbjegla aglomeracija mikročestica. Protok otopine kroz iglu, promjer igle te udaljenost vrha igle od otopine za sakupljanje mikročestica držane su konstantnima, a korišteni napon mijenjao se za svaki sustav ovisno o relativnoj vlažnosti i temperaturi kako bi se postigao željeni Taylorov konus (postizanje Taylorovog konusa određeno je vizualno). Parametri procesa elektroštrecanja navedeni su u *Tablici 1.*

**Tablica 1.** Uvjeti procesa elektroštrecanja;  $l$  – razmak između igle i otopine za sakupljanje mikročestica,  $\dot{V}$  – volumni protok otopine,  $RH$  – relativna vlažnost,  $T$  – temperatura,  $U$  – napon

<b>igla [G]</b>		23
<b><math>l</math> [cm]</b>		10
<b><math>\dot{V}</math> [mL h<sup>-1</sup>]</b>		5
<b><math>RH</math> [%]</b>		62 ± 9
<b><math>T</math> [°C]</b>		25,9 ± 0,7
<b><math>U</math> [kV]</b>	<b>CHT-Cu<sup>2+</sup>/HAp0</b>	15,4 ± 0,3
	<b>CHT-Cu<sup>2+</sup>/HAp5</b>	16,2 ± 1,9
	<b>CHT-Cu<sup>2+</sup>/HAp10</b>	17,6 ± 1,4

Za lakše postizanje stalnih uvjeta temperature i relativne vlažnosti, prostor u kojem dolazi do nastanka Taylorovog konusa nalazi se unutar poli(metil-metakrilatne) komore. Zasićena otopina magnezijeva nitrata (Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) korištena je kako bi se postigle što manje oscilacije u vrijednosti relativne vlažnosti tijekom provedbe procesa elektroštrecanja, s obzirom na to da je  $RH$  zasićene otopine Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 53,4% pri 25 °C [44].

Dobivene mikročestice ostavljene su tijekom noći u otopini NaOH, nakon čega su ispirane demineraliziranom vodom do neutralnog pH, a zatim dehidratizirane etanolom te sušene acetonom. Demineralizirana voda, etanol i aceton izmijenjeni su tri puta (demineralizirana voda i etanol svakih pola sata, a aceton svakih 15 minuta). Mikročestice su zatim ostavljene na sobnim uvjetima kako bi zaostali aceton ispario.

Kao kontrolni uzorci pripremljene su mikročestice kompleksa kitozan-bakar bez dodatka HAp-a (CHT-Cu) prethodno opisanim postupkom.

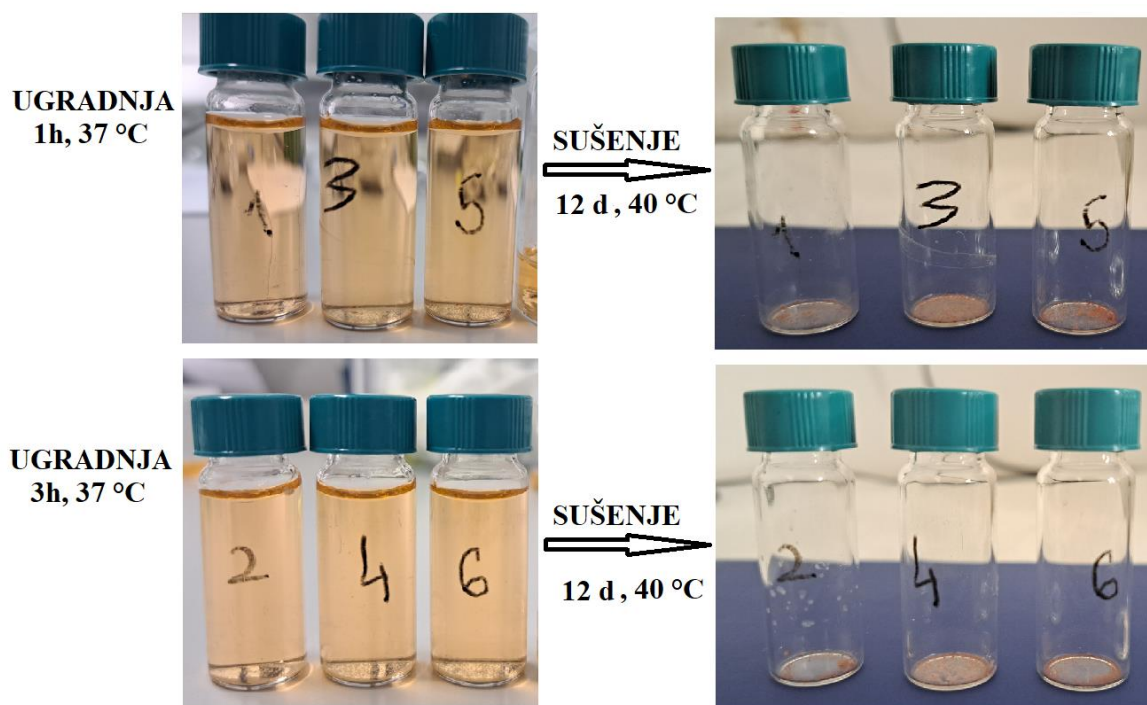
### 3.2.3. Priprava puferских otopina

Stupanj bubrenja pripremljenih mikročestica ispitan je u otopinama fosfatnog pufera, PB (engl. *phosphate buffer solution*) pH vrijednosti 6 (pH vrijednost tumorskog mikrookruženja [45]) i 7,4 (fiziološki pH [46]), a kao kontrolna otopina korištena je demineralizirana voda (pH=6,4). Puferске otopine pripremljene su otapanjem odgovarajuće količine natrijeva dihidrogenfosfata ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) u 80 mL demineralizirane vode, a zatim otapanjem odgovarajuće količine natrijeva hidrogenfosfata ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Nakon otapanja soli, izmjerena je pH vrijednost pripremljenih otopina, po potrebi korigiran pH dodatkom 5 %-tne otopine NaOH te je dodana demineralizirana voda kako bi se dobilo 100 mL otopina pufera. Konačne pH vrijednosti otopina iznosile su 6 (PB-6) te 7,4 za drugu otopinu (PB-7).

### 3.2.4. Ugradnja lijeka u polimerne mikročestice

Za ugradnju antitumorskog lijeka u pripremljene mikročestice korišteno je svojstvo pH osjetljivosti kitozana. S obzirom na to da kitozan bubri u blago kiselom mediju, lijek doksorubicin (DOX) otopljen je u fosfatnom puferu pH 6 (PB-6). Početna koncentracija otopine lijeka iznosila je 25 ppm, a priprema i čuvanje otopine DOX-a provedeno je u mraku. Odgovarajući volumen pripremljene otopine lijeka dodan je na prethodno izvagane suhe mikročestice (~1 mg) te je proces ugradnje lijeka proveden tijekom jednog, odnosno tri sata, pri temperaturi od 37 °C u mraku. Nakon zadanog vremena, otopina lijeka je uklonjena, a mikročestice s ugrađenim lijekom sušene tijekom dvanaest dana pri 40 °C. Proces ugradnje lijeka prikazan je na *Slici 12*.





**Slika 12.** Prikaz ugradnje lijeka (lijevo) te suhe mikročestice s ugrađenim lijekom (desno)

### 3.3. Metode identifikacije i karakterizacije

Prigušena totalna refleksija infracrvene spektroskopije s Fourierovim transformacijama (ATR-FTIR) provedena je na spektrofotometru Bruker Vertex 70 u mjernom području od  $4000$  do  $400\text{ cm}^{-1}$  uz rezoluciju  $4\text{ cm}^{-1}$  i snimanje provedeno 32 puta pri  $22\text{ °C}$ .

Rendgenska difrakcijska analiza praha (XRD) provedena je na difraktometru XRD Shimadzu 6000 u mjernom rasponu kutova  $3^\circ < 2\theta < 70^\circ$  s vremenom zadržavanja  $0,60$  sekundi uz  $\text{CuK}\alpha$  zračenje valne duljine  $1,5405\text{ \AA}$ . Identifikacija kristalnih faza provedena je korištenjem ICDD baze (engl. *International Centre for Diffraction Data*).

Raspodjela veličina mikročestica procijenjena je pomoću svjetlosnog invertnog mikroskopa Olympus IX3 s kamerom Hamamatsu ORCA-Flash 4.0, uz CellSens software za analizu slika, odnosno uz ImageJ program za analizu slika.

### 3.4. Određivanje stupnja bubrenja

Stupanj bubrenja pripremljenih kompozitnih mikročestica određen je u otopinama različitih pH vrijednosti pri temperaturi od 37 °C tijekom 24 sata. Nakon 24 sata inkubacije mikročestica u ispitivanim medijima, mikročestice su snimljene invertnim svjetlosnim mikroskopom, a u programu ImageJ određena je površina minimalno 70 čestica svakog uzorka te iz nje izračunat polumjer koristeći formulu (1):

$$r = \sqrt{\frac{A}{\pi}} \quad (1)$$

Volumen mikročestica izračunat je koristeći formulu za volumen sfere (2) uz pretpostavku da je sferičnost mikročestica jednaka jedan:

$$V = \frac{4 * \pi * r^3}{3} \quad (2)$$

Stupanj bubrenja *SD* (engl. *swelling degree*) izražen je kao omjer volumena nabubrenih mikročestica ( $V_{ot}$ ) i volumena suhih mikročestica ( $V_s$ ) (3):

$$SD = \frac{V_{ot}}{V_s} \quad (3)$$

### 3.5. Određivanje efikasnosti ugradnje lijeka

Doksorubicin posjeduje sposobnost fluorescencije [47] pa se efikasnost ugradnje lijeka može procijeniti iz promjene intenziteta fluorescencije otopine doksorubicina prije i nakon provedene ugradnje lijeka u mikročestice.

Pripremljena je baždarna krivulja ovisnosti intenziteta fluorescencije o koncentraciji doksorubicina u mjernom rasponu koncentracija od 0 do 50 ppm. Potom je određen intenzitet fluorescencije početne otopine lijeka u PB-6 (prije ugradnje lijeka u mikročestice), a zatim je određen intenzitet fluorescencije otopine doksorubicina nakon ugradnje u kompozitne mikročestice. Na temelju određenih intenziteta fluorescencije, procijenjena je efikasnost ugradnje lijeka. Kao slijepa proba korištena je otopina fosfatnog pufera pH vrijednosti 6 (PB-6, bez doksorubicina).

Drugi način kojim se može procijeniti efikasnost ugradnje doksorubicina u kompozitne mikročestice je praćenjem promjene mase mikročestica. Suhe mikročestice se važu prije ( $m_p$ ) i nakon provedenog procesa ugradnje lijeka ( $m_n$ ). Efikasnost ugradnje lijeka ( $EE_{DOX}$ ) izražena je kao omjer mase mikročestica nakon ( $m_n$ ) i prije ( $m_p$ ) inkubacije mikročestica u otopini lijeka (4):

$$EE_{DOX} = \frac{m_n}{m_p} \quad (4)$$

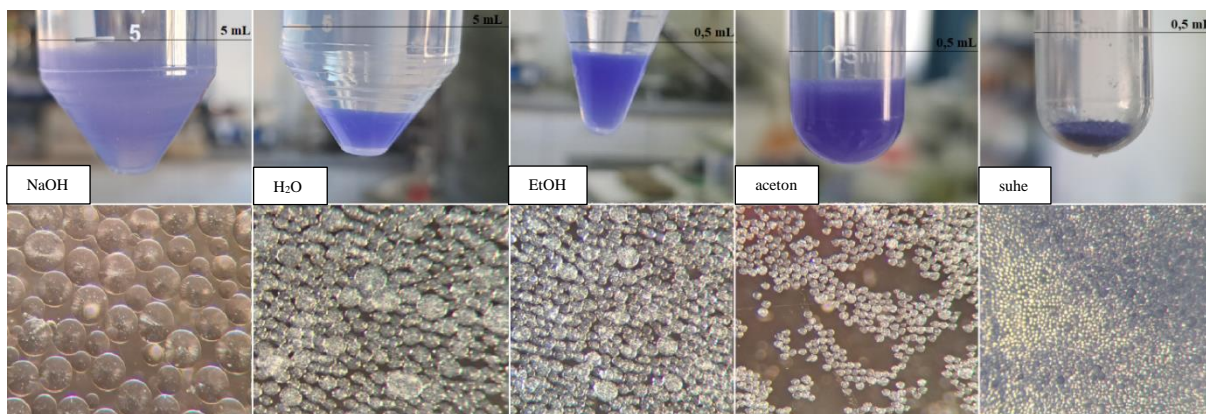
Kao kontrolni uzorci koriste se mikročestice koje su inkubirane u čistoj otopini PB-6 (bez doksorubicina) pri istim uvjetima (1 i 3 h, 37 °C). Suhe mikročestice se važu prije ( $m_p$ ) i nakon ( $m_n$ ) provedenog procesa, a omjer  $m_n/m_p$  predstavlja količinu adsorbiranih soli u mikročestice.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu pripravljene su mikročestice na temelju kompleksa kitozan–bakar s i bez dodatka anorganske faze (hidroksiapatita) primjenom procesa elektroštrcanja. Provedena je identifikacija i karakterizacija dobivenih suhih mikročestica. Za identifikaciju mikročestica korištene su prigušena totalna refleksija infracrvene spektroskopije s Fourierovim transformacijama (ATR-FTIR) i rendgenska difrakcijska analiza (XRD). Procijenjen je stupanj bubrenja pripremljenih mikročestica u puferkim otopinama (pH=6 i pH=7,4) te demineraliziranoj vodi (pH=6,4). Na temelju pH-osjetljivosti kitozanskih mikročestica pripremljene su mikročestice s ugrađenim antitumorskim lijekom (doksorubicinom), a primjenom gravimetrijske metode i fluorescentne spektroskopije procijenjena je efikasnost ugradnje lijeka.

### 4.1. Određivanje oblika i raspodjele veličina mikročestica

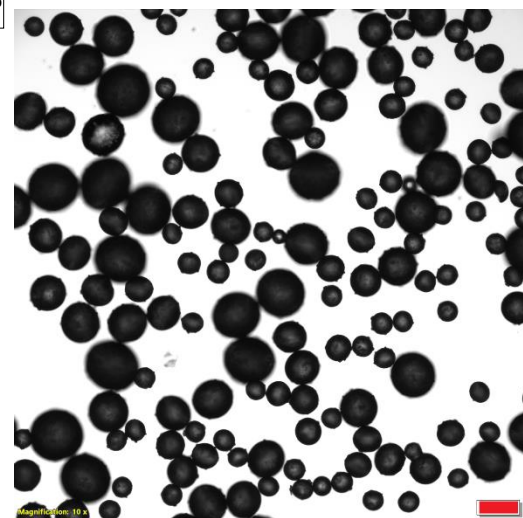
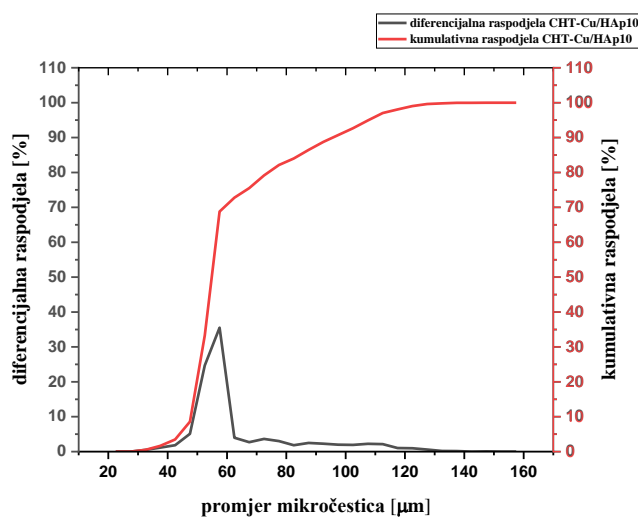
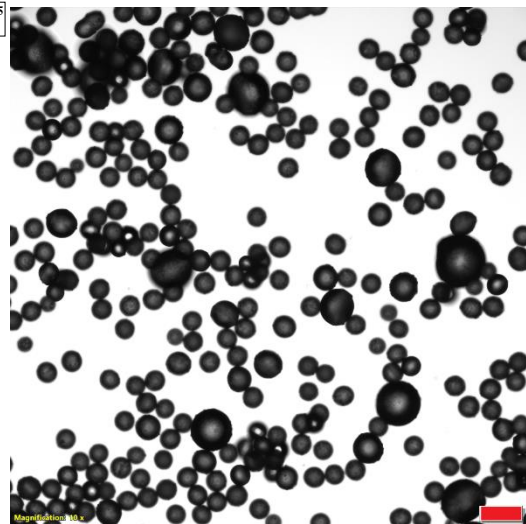
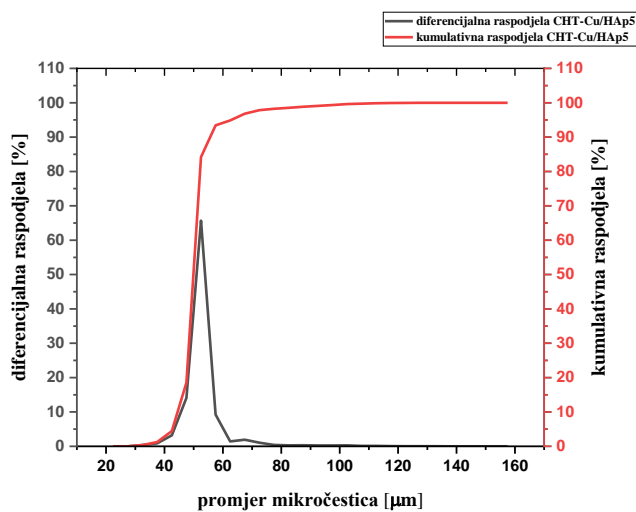
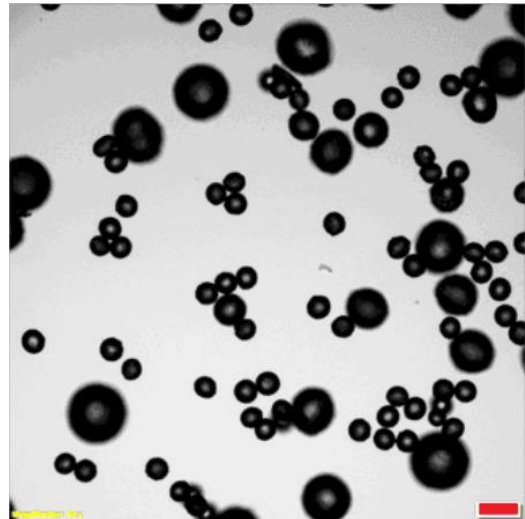
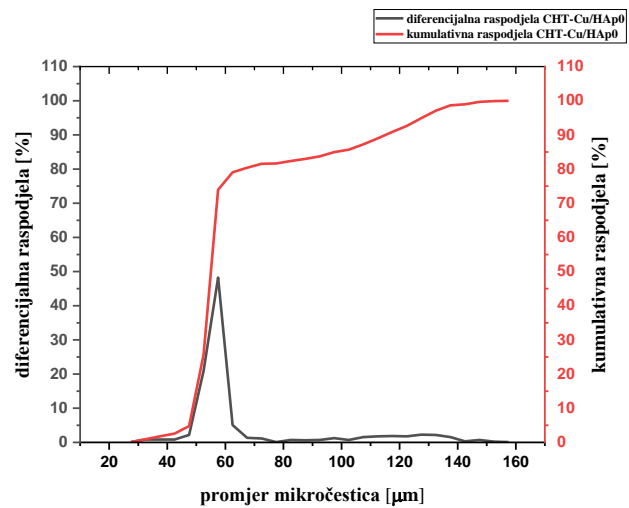
Elektroštrcanjem su uspješno dobivene mikrosfere na temelju fizikalno umreženoga kitozana bakrovim(II) ionima s i bez dodatka anorganske faze kao punila (hidroksiapatita). *Slika 13.* prikazuje pripravljene kompozitne mikročestice CHT-Cu/HAp10 u 5 %-tnoj otopini NaOH koja je korištena kao neutralizacijski medij (kolektor). Nadalje, primjećuje se smanjenje volumena produkta u procesu ispiranja demineraliziranom vodom (H<sub>2</sub>O) zbog uklanjanja natrijeva acetata (produkta neutralizacije octene kiseline natrijevim hidroksidom) te dehidracije (EtOH) i sušenja mikročestica. Primjenom svjetlosnog mikroskopa (mikrografije, *Slika 13.* donji red) potvrđeno je vizualno smanjenje volumena produkta uz zadržavanje sferičnog oblika mikročestica. Isto opažanje uočeno je i kod uzoraka CHT-Cu/HAp5 te CHT-Cu.



**Slika 13.** Prikaz smanjena volumena mokrih mikročestica u 5 %-tnoj otopini NaOH te tijekom ispiranja demineraliziranom vodom ( $H_2O$ ), etanolom (EtOH) i sušenja acetonom, te suhih mikročestica CHT-Cu/HAp10 kompozita. Mikrografije su slikane pri uvećanju 6,5×

Na *Slici 14.* (lijevo) prikazane su diferencijalna i kumulativna raspodjela veličine kompozitnih mikročestica CHT-Cu/HAp0, CHT-Cu/HAp5 i CHT-Cu/HAp10. Za uzorak CHT-Cu/HAp0 dobivene su mikročestice veličine  $67 \pm 25 \mu m$ , za uzorak CHT-Cu/HAp5  $53 \pm 8 \mu m$  (najuža raspodjela veličina čestica), a za uzorak CHT-Cu/HAp10  $64 \pm 20 \mu m$ . Dodatkom hidroksiapatita raste viskoznost otopine što za posljedicu ima pomak napona pri kojem se uspostavlja stabilni Taylorov konus prema višim vrijednostima te širi raspon unutar kojega se on pronalazi. Uslijed toga prosječna veličina CHT-Cu/HAp10 mikročestica veća je od prosječne veličine CHT-Cu/HAp5 mikročestica. Kumulativna raspodjela mikročestica pokazuje da je 90 % CHT-Cu/HAp0 mikročestica manje od  $120 \mu m$ , CHT-Cu/HAp5 mikročestica je do  $60 \mu m$ , a CHT-Cu/HAp10 mikročestica do  $100 \mu m$ .

Na *Slici 14.* (desno) prikazane su mikrografije uzoraka mikročestica CHT-Cu/HAp0, CHT-Cu/HAp5 i CHT-Cu/HAp10 snimljene invertnim svjetlosnim mikroskopom uz povećanje 10 $\times$ . Mikrografije potvrđuju da su elektroštrcanjem uspješno pripremljene mikročestice sferičnog oblika te da su najmanje mikročestice dobivene za uzorak CHT-Cu/HAp5 koji pokazuje i najužu raspodjelu veličina.

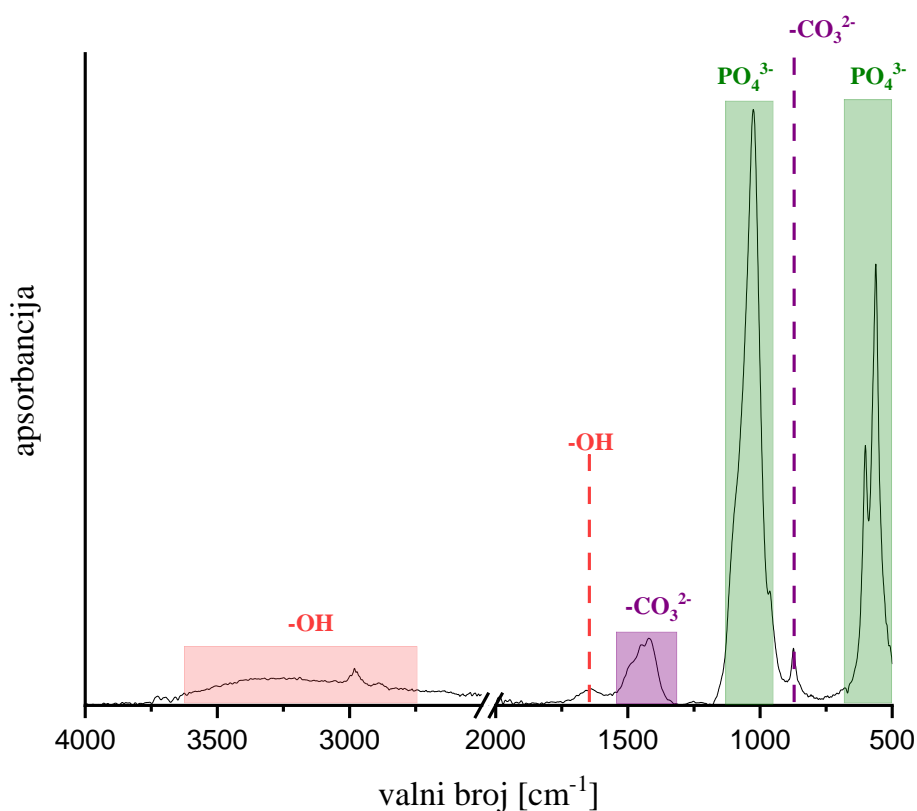


**Slika 14.** Grafički prikaz diferencijalne i kumulativne raspodjele veličina mikročestica na temelju kompleksa kitozan-bakar bez i s dodatkom hidroksiapatita (lijevo) i mikrografije suhih mikročestica pri povećanju 10× (desno). Crvena linija predstavlja skalu od 100  $\mu\text{m}$ .

## 4.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama (FTIR)

Prigušenom totalnom refleksijom infracrvene spektroskopije s Fourierovim transformacijama dobiveni su FTIR spektri hidroksiapatita te mikročestica kompleksa kitozan-bakar s i bez dodatka anorganskog punila.

Na FTIR spektru hidroksiapatita (*Slika 15.*) uočavaju se karakteristične apsorpcijske vrpce povezane s  $\text{-OH}$  i  $\text{-PO}_4^{3-}$  skupinama, ali i vrpce povezane s vibracijama istežanja  $\text{-CO}_3^{2-}$ . Široka apsorpcijska vrpca između  $3500$  i  $3000\text{ cm}^{-1}$  te apsorpcijska vrpca pri  $1650\text{ cm}^{-1}$  javljaju se zbog vibracija istežanja  $\text{-OH}$  iz apsorbirane vode. Fosfatni anioni daju signale uzrokovane simetričnim i asimetričnim vibracijama istežanja i savijanja pri  $1026$ ,  $960$ ,  $601$  i  $561\text{ cm}^{-1}$  [40]. Da je riječ o hidroksiapatitu koji sadrži  $\text{-CO}_3^{2-}$  skupine potvrđuju vrpce pri  $1452$ ,  $1416$  i  $870\text{ cm}^{-1}$  koje ukazuju na vibracije istežanja karakteristične za B-supstituirani hidroksiapatit u kojemu su fosfatni anioni ( $\text{-PO}_4^{3-}$ ) djelomično zamijenjeni karbonatnim anionima ( $\text{-CO}_3^{2-}$ ) [40].

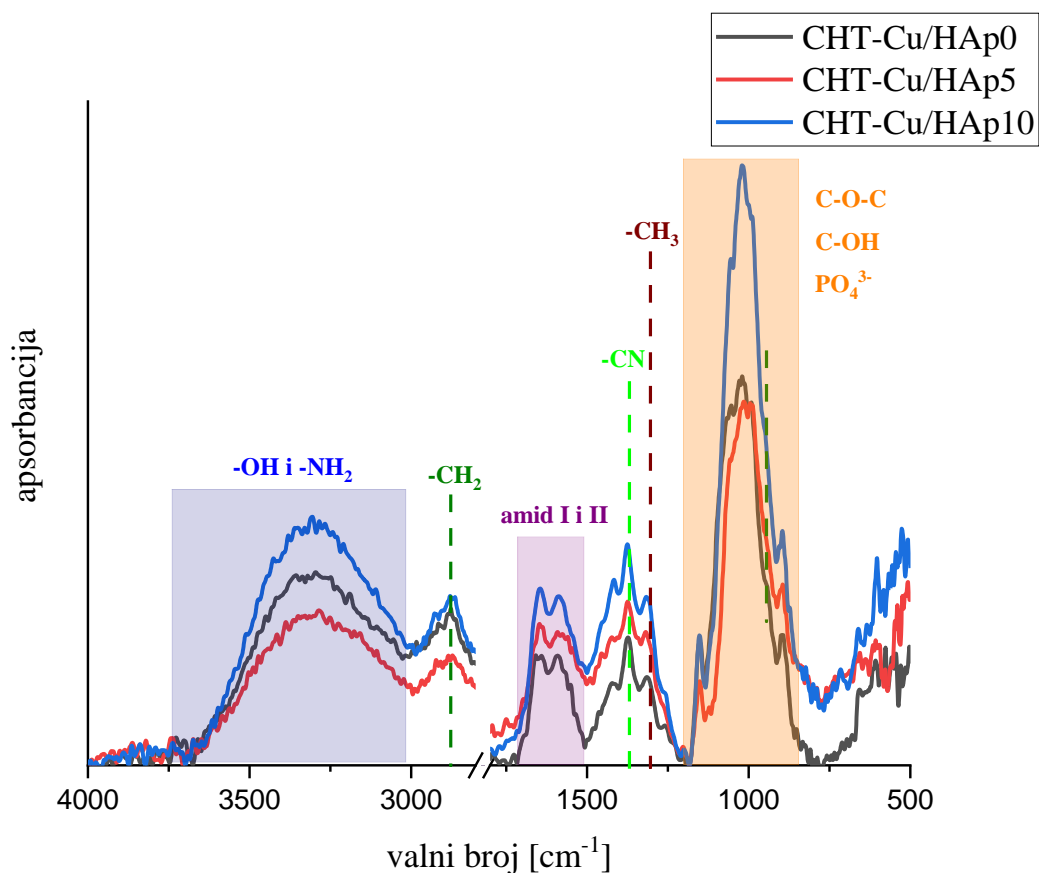


*Slika 15.* FTIR spektar hidroksiapatita korištenog za pripravu kompozitnih mikročestica

*Slika 16.* prikazuje FTIR spektre mikročestica na temelju kompleksa kitozan-bakar s i bez dodatka hidroksiapatita. Na FTIR spektru CHT-Cu uzorka moguće je uočiti karakteristične apsorpcijske vrpce kitozana [29]. Apsorpcijske vrpce između 3400 i 2800  $\text{cm}^{-1}$  odgovaraju asimetričnim i simetričnim vibracijama istezanja funkcionalnih skupina: vrpca pri 3360  $\text{cm}^{-1}$  odgovara vibraciji istezanja O–H veze, vrpca pri 3282  $\text{cm}^{-1}$  odgovara vibraciji istezanja N–H veze, dok vrpca pri 2874  $\text{cm}^{-1}$  odgovara vibraciji istezanja C–H veze u –CH– i –CH<sub>2</sub> skupini. Vrpce pri 1646 i 1573  $\text{cm}^{-1}$  odgovaraju vibracijama istezanja amida, od kojih apsorpcijska vrpca pri 1646  $\text{cm}^{-1}$  odgovara vibraciji istezanja C=O veze s vibracijom istezanja C–N veze te savijanja N–H veze amida I, a vrpca pri 1573  $\text{cm}^{-1}$  vibraciji savijanja N–H veze te vibraciji istezanja C–N veze amida II. Postojanje vrpce amida I potvrđuje da uzorak kitozana nije potpuno deacetiliran. Vrpca pri 1364  $\text{cm}^{-1}$  povezuje se s vibracijom rastezanja C–N veze. Vrpca pri 1316  $\text{cm}^{-1}$  odgovara savijanju C–H veze u CH<sub>3</sub> skupini. Između 1150 i 1000  $\text{cm}^{-1}$  nalazi se vrpca koja se povezuje s kisikovim atomima, a sadrži tri pika. Prvi, pri 1150  $\text{cm}^{-1}$  pripisan je C–O–C vibracijama asimetričnog istezanja, a dva pri 1058 i 1015  $\text{cm}^{-1}$  povezani su s C–O vibracijama istezanja karakterističnim za polisaharide. Na spektru nisu uočene apsorpcijske vrpce koje bi se mogle povezati s octenom kiselinom, etanolom ili acetonom iz čega je moguće zaključiti da niti otapalo niti sredstva za sušenje ne zaostaju u mikročesticama.

Nadalje, na FTIR spektrima mikročestica koje sadrže hidroksiapatit (CHT-Cu/HAp5 i CHT-Cu/HAp10) u području između 3600 i 3000  $\text{cm}^{-1}$  dolazi do preklapanja apsorpcijskih vrpca karakterističnih za –OH i –NH<sub>2</sub> skupine kitozana te –OH skupine prisutne zbog apsorbirane vode u hidroksiapatitu. Povećanje intenziteta vrpce –OH skupine izraženije je za uzorak koji sadrži veći udio hidroksiapatita, tj. za CHT-Cu/HAp10. Za uzorke CHT-Cu/HAp5 i CHT-Cu/HAp10 zabilježena je i promjena intenziteta apsorpcijskih vrpca u području između 1200 i 800  $\text{cm}^{-1}$  te između 700 i 500  $\text{cm}^{-1}$ , a do čega dolazi zbog preklapanja apsorpcijskih vrpca kitozana (C–O–C i C–O istezanja) s apsorpcijskim vrpcama vibracija –PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> hidroksiapatita. Nije došlo do pomaka vidljivih apsorpcijskih vrpca fosfatnih skupina, a pomak ostalih apsorpcijskih vrpca u tim područjima nije bilo moguće odrediti zbog međusobnog preklapanja i interakcija kitozana s bakrovim ionima.





*Slika 16.* FTIR spektri kompozitnih mikročestica kompleksa CHT-Cu s i bez dodatka anorganske faze (hidroksiapatita)

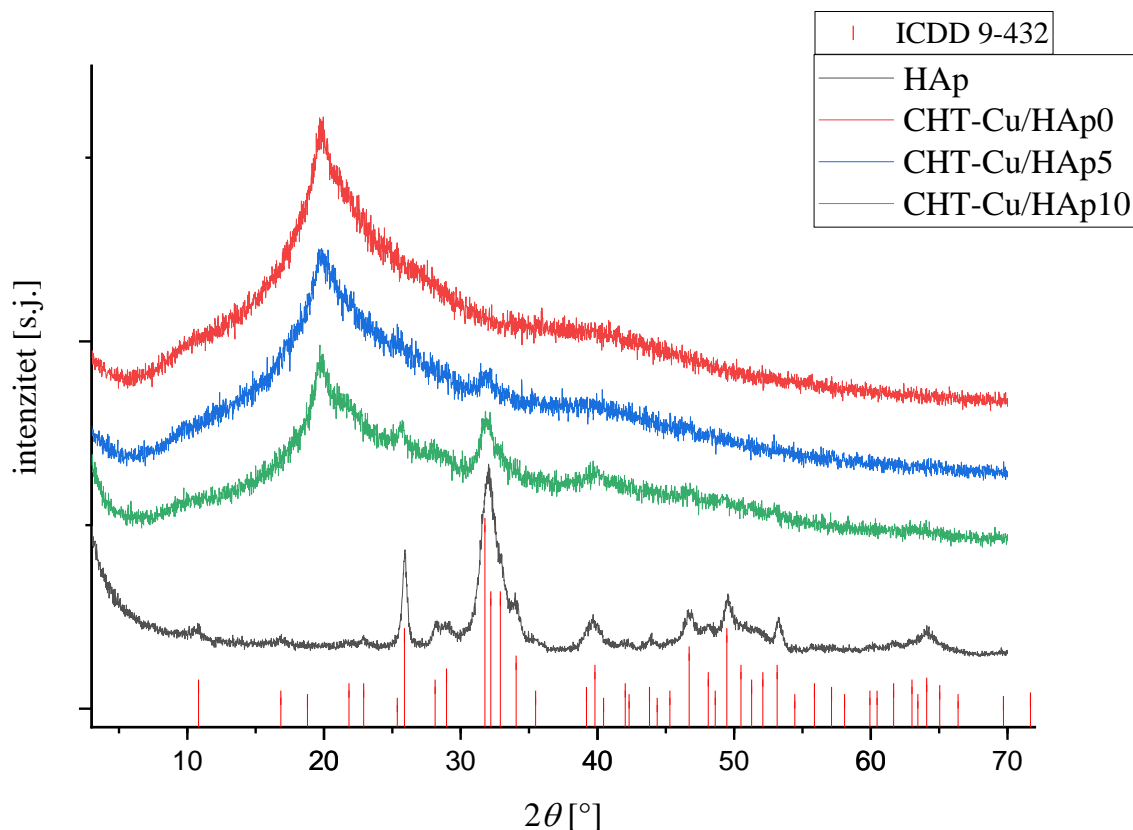
Na FTIR spektrima kompozitnih uzoraka (*Slika 16.*) ne uočavaju se pojave novih apsorpcijskih vrpci, već samo promjene u intenzitetima i valnim brojevima iz čega je moguće zaključiti da između kompleksa kitozan-Cu(II) iona i hidroksiapatita ne dolazi do stvaranja kemijskih veza već je veza elektrostatske prirode [43].

Također, zbog velikog afiniteta hidroksiapatita prema dvovalentnim kationima moguće je da dolazi do djelomične supstitucije kalcijevih iona hidroksiapatita bakrovim(II) ionima [48]. Primjerice, pripremajući nanočestice na temelju hidroksiapatita kokristalizacijskom i enzimskom metodom, Orlova i suradnici [49] zabilježili su da prilikom interakcija organskog kompleksa bakra(II) s hidroksiapatitom dolazi do apsorpcije bakra (organski ligand zaostaje u otopini), a što je objašnjeno nastankom hidroksiapatita dopiranog  $\text{Cu}^{2+}$  ionima uslijed raspada

kompleksa. U skladu s fokusom ovoga rada, HAp–Cu<sup>2+</sup> interakcije nisu detaljnije proučavane te predstavljaju područje za daljnje istraživanje.

### 4.3. Rendgenska difrakcijska analiza (XRD)

Rendgenska difrakcijska analiza korištena je za identifikaciju pripremljenih mikročestica. Dobiveni su difraktogrami hidroksiapatita kompozitnih mikročestica (*Slika 17.*).



**Slika 17.** Difraktogrami mikročestica na temelju kompleksa kitozan-bakar (CHT-Cu) s i bez hidroksiapatita (HAp), korištenog hidroksiapatita te pripadajuće ICDD kartice broj 9-432

Uzorak hidroksiapatita identificiran je pomoću ICDD (prema engl. *International Center for Diffraction Data crystallographic database*) kartice (sintetskog) hidroksiapatita broj 9-432 (*Slika 17.*). U uzorku HAp-a detektirani su difrakcijski maksimumi pri  $2\theta$  11°, 17°, 23°, 26°, 32°, 39°, 46°, i 50°.

28°, 29°, 32°, 34°, 39°, 42°, 44°, 46°, 48°, 49°, 53°, 60°, 61° i 64°, a koji se poklapaju s difrakcijskim maksimumima ICDD kartice. Širenje difrakcijskih maksimuma i njihovo preklapanje ukazuje na nižu kristalnost korištenog hidroksiapatita zbog prisutne supstitucije fosfatnih aniona karbonatnim [39], kao i manju veličinu nastalih kristalita. Ovakva struktura HAp-a je vrlo slična strukturi prirodne komponente kosti (biološki apatit) [50].

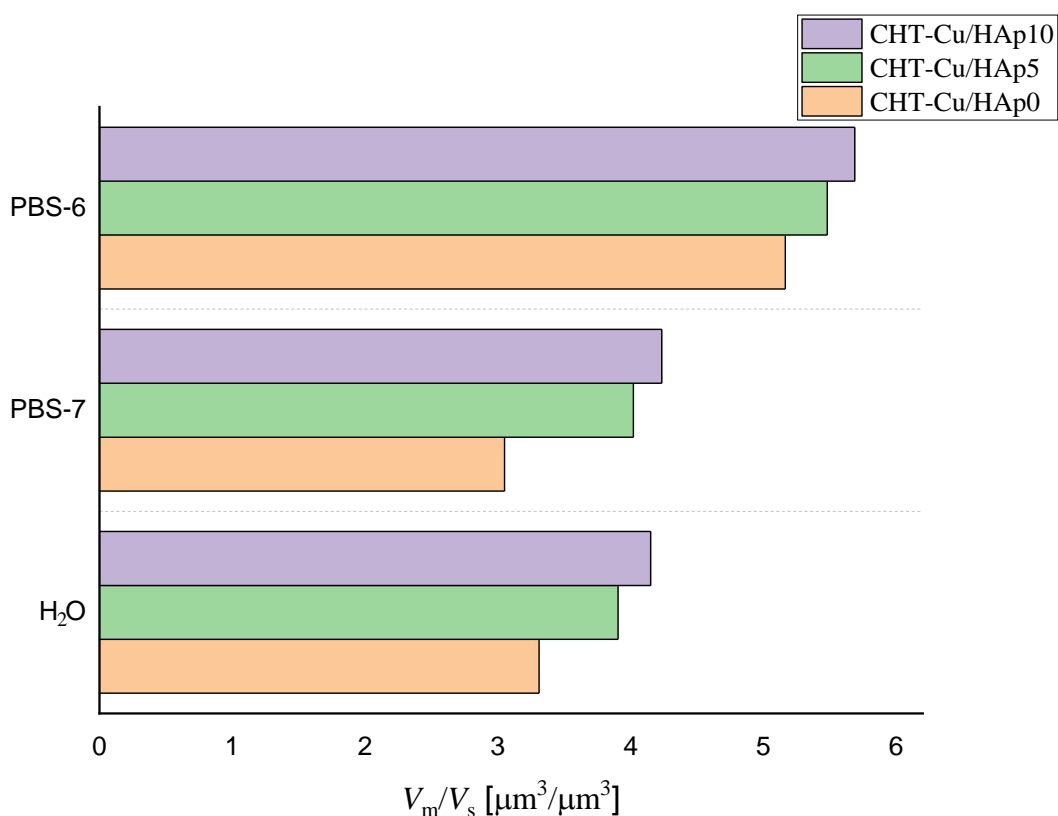
Nadalje, široki difrakcijski maksimum pri  $2\theta \approx 20^\circ$  karakterističan za kitozan [51] prisutan je u svim analiziranim uzorcima na temelju kitozana (CHT-Cu/HAp0, HAp5 i HAp10). Intenzitet tog difrakcijskog maksimuma smanjuje se povećanjem udjela hidroksiapatita. Mogući razlog te pojave su prisute interakcije hidrosilne i amino skupine kitozana te  $\text{Ca}^{2+}$  i fosfatnih iona HAp-a koje utječu na stvaranje vodikovih veza između punila i matrice, a koje smanjuju mogućnost orijentacije makromolekula i pravilnog slaganja što se detektira kao smanjenje intenziteta [52]. Pri  $2\theta \approx 40^\circ$  pojavljuje se široki signal slabog intenziteta koji može biti posljedica povećanja intenziteta signala amorfne faze kitozana ili pojave nove kristalne konformacije nakon umreživanja kitozana bakrovim(II) ionima [51].

Uzorak CHT-Cu/HAp5 pokazuje prisutnost slabog difrakcijskog maksimuma na  $2\theta \approx 26^\circ$  te difrakcijskog maksimuma jačeg intenziteta pri  $2\theta \approx 32^\circ$ , dok se u uzorku CHT-Cu/HAp10 uočava i dodatni maksimum pri  $2\theta \approx 39^\circ$ . Prisutnost tih difrakcijskih maksimuma u kompozitnim mikročesticama ukazuje na prisutnost hidroksiapatita, nastalog ponovnim taloženjem u doticaju s NaOH otopinom. Difrakcijski maksimumi pri  $2\theta \approx 26^\circ$  i  $32^\circ$  većeg su intenziteta za uzorak CHT-Cu/HAp10 u odnosu na uzorak CHT-Cu/HAp5, a što je u skladu prisutnim većim udjelom anorganske faze u kompozitnim mikročesticama.

Xianmiao i suradnici [52] zabilježili su slične rezultate za CHT/HAp membrane pripravljene metodom lijevanja i sušenja. Uočili su pojavu većeg broja difrakcijskih maksimuma koji su pripisani hidroksiapatitu jer su udjeli hidroksiapatita u uzorcima bili veći (20-60%) te širenje i smanjenje difrakcijskog maksimuma pri  $2\theta \approx 20^\circ$  koji je objašnjen promjenom kristalnosti kitozana zbog prisutnosti hidroksiapatita. Huang i suradnici [53] potvrdili su uspješnost elektrokemijske depozicije hidroksiapatita na kitozanski porozni nosač rendgenskom difrakcijskom analizom. Dobiven je veći broj difrakcijskih maksimuma koji je ukazivao na prisutnost hidroksiapatita, a difrakcijski maksimumi bili su prošireni zbog manje kristalnosti mikročestica hidroksiapatita.

#### 4.4. Stupanj bubrenja

Slika 18. grafički je prikaz procijenjenog stupnja bubrenja pripremljenih CHT-Cu mikročestica s i bez dodatka HAp-a izražen kao omjer volumena mokrih i suhih mikročestica ( $V_m/V_s$ ). Mikročestice su bile inkubirane u puferkim otopinama pH vrijednosti 6 (PB-6) i 7,4 (PB-7) te demineraliziranoj vodi (pH=6,4) pri temperaturi 37 °C tijekom 24 sata.



**Slika 18.** Grafički prikaz stupnja bubrenja izražen kao omjer volumena mokrih i suhih mikročestica ( $V_m/V_s$ ) CHT-Cu/HAp0, CHT-Cu/HAp5 i CHT-Cu/HAp10 u otopini fosfatnog pufera pH vrijednosti 6 (PB-6) i 7,4 (PB-7), te demineraliziranoj vodi (H<sub>2</sub>O)

Kod sva tri uzorka (CHT-Cu/HAp0, HAp5 i HAp10) dolazi do povećanja stupnja bubrenja smanjenjem pH vrijednosti otopine uslijed protoniranja amino skupina koje povećavaju unutarmolekulska elektrostatska odbijanja polimernih lanaca, a što posljedično olakšava ulazak otapala (vode) [16]. Nadalje, pregledom literature [54,55] pronađeno je da se stupanj bubrenja (kapacitet apsorpcije vode) materijala na temelju kitozan–hidroksiapatit smanjuje

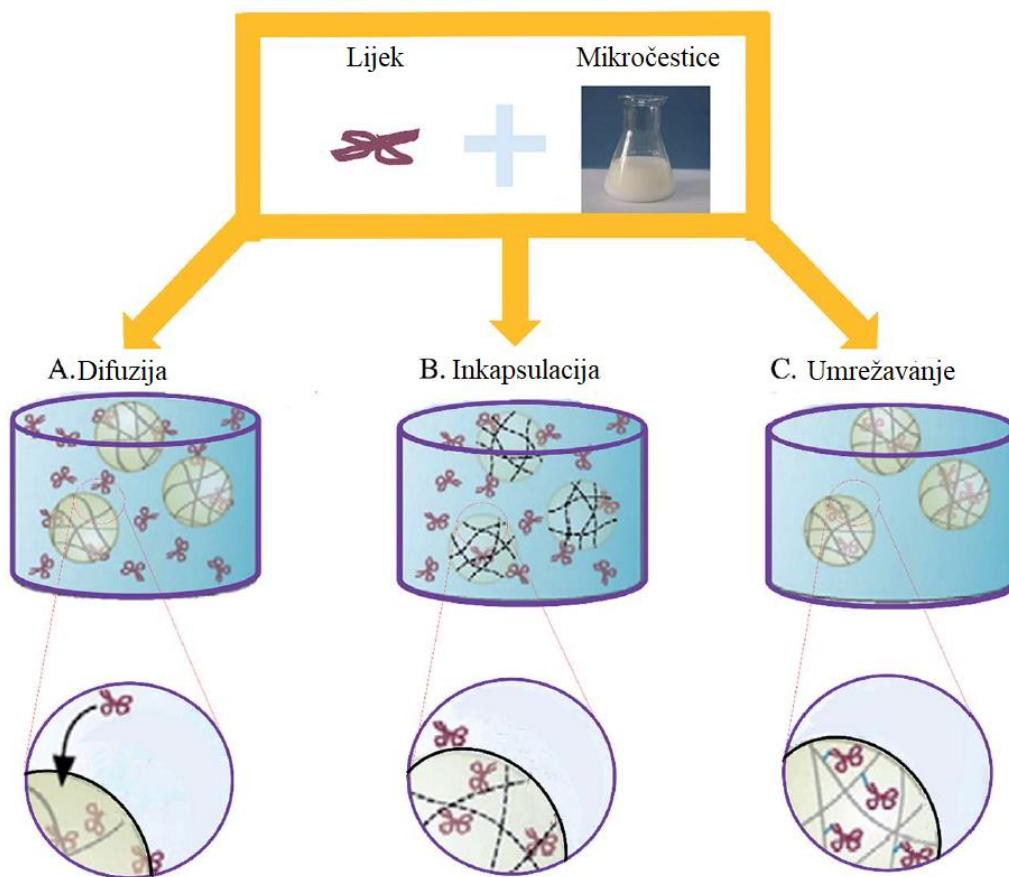
porastom udjela hidroksiapatita, a što se pripisuje prisutnosti manjeg udjela komponente koja bubri (polimerne matrice). Međutim, u ovom radu je zabilježeno da uz povećanje udjela hidroksiapatita u mikročesticama dolazi do porasta stupnja bubrenja.

Mogući razlog povećanja stupnja bubrenja mikročestica povećanjem udjela hidroksiapatita je smanjenje udjela uređenih (kristaličnih) domena u kitozan-Cu<sup>2+</sup> matrici uslijed smještanja čestica punila između makromolekula, kao što ukazuju rezultati provedene XRD analize.

Drugi mogući razlog povećanja stupnja bubrenja povećanjem udjela hidroksiapatita je uslijed veće poroznosti mikročestica – porozniji sustavi posjeduju veći kapacitet bubrenja [56]. Za CHT/HAp kompozitni sustav dobiven koprecipitacijskom metodom [55] pokazano je da porastom udjela hidroksiapatita raste stupanj bubrenja uslijed povećanja poroznosti materijala potaknute procesom enzimske razgradnje. Primjenom svjetlosnog mikroskopa u ovom radu nije bilo moguće detaljnije istražiti morfologiju (poroznost) pripremljenih CHT-Cu/HAp mikročestica te utjecaj na svojstvo bubrenja. Stoga se predlaže daljnje istraživanje morfologije primjenom pretražne elektronske mikroskopije. Također, treba imati i na umu da su sustavi CHT-Cu/Hap0 i CHT-Cu/HAp10 pokazali široke raspodjele veličina suhih čestica te da je stupanj bubrenja procijenjen u odnosu na ~70 nasumično odabranih mokrih čestica, a što posljedično može utjecati na dobivene rezultate.

#### **4.5. Procjena efikasnosti ugradnje lijeka**

Općenito se lijek u mikročestice može ugraditi na tri načina: difuzijom, inkapsulacijom te umreživanjem (*Slika 19.*). Ugradnja lijeka difuzijom odvija se na unaprijed pripremljene nosače apsorpcijom/adsorpcijom lijeka. Tom metodom na nosače se ugrađuju manje molekule čije otpuštanje s nosača u organizmu traje od nekoliko sati do nekoliko dana, a pogodna je zbog minimalne šanse gubitka aktivnosti lijeka. Metoda inkapsulacije lijeka se odvija u jednom koraku – ugradnjom lijeka u mikročestice tijekom njihove pripreve formiranjem mikročestica oko lijeka. Iz tako pripremljenih nosača lijek se otpušta od nekoliko dana do nekoliko tjedana. Umreživanjem dolazi do stvaranja kovalentnih veza između lijeka i polimernog nosača čime se postiže dugotrajno otpuštanje lijeka u organizmu koje može trajati od nekoliko dana do nekoliko mjeseci, ali umreživanje lijeka i polimera može dovesti do gubitka aktivnosti lijeka [57].



*Slika 19.* Shematski prikaz metoda ugradnje lijeka u polimerne mikročestice [57]

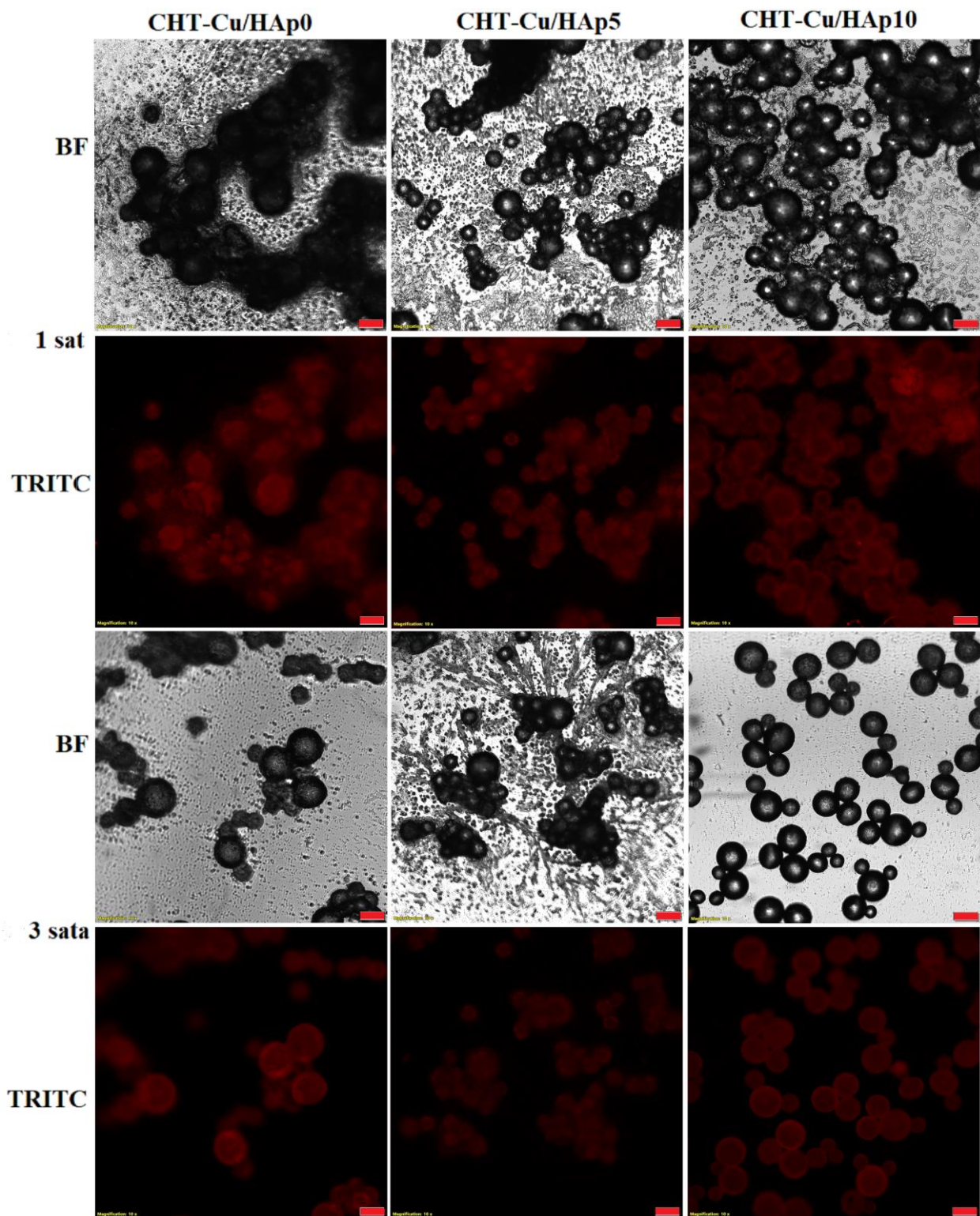
Kada se polimerne nano- i mikročestice pripremaju procesom elektrostrcanja, lijek se može ugraditi inkapsulacijom u materijal prilikom pripreme nosača u jednom koraku. Druga je mogućnost ugradnja lijeka nakon pripreme mikročestica elektrostrcanjem koristeći svojstvo pH osjetljivosti polimera – kitozan bubri pri nižim pH vrijednostima te posljedično apsorbira/adsorbira lijek otopljen u blago kiselom mediju. Sušenjem nano- ili mikročestica uklanja se otapalo te lijek ostaje ugrađen u nosač [58].

U ovom je radu za ugradnju lijeka korišteno svojstvo pH osjetljivosti kitozana kako bi se olakšala difuzija te poboljšala efikasnost ugradnje lijeka u mikročestice. Mikročestice su inkubirane u otopini fosfatnog pufera pH=6 u kojoj je otopljen doksorubicin (PB-DOX), jedan i tri sata u mraku na temperaturi 37 °C. Nakon uklanjanja PB-DOX otopine mikročestice su sušene dvanaest dana na temperaturi 40 °C. Uspješna ugradnja doksorubicina na pripremljene mikročestice na temelju CHT-Cu matrice s i bez dodatka anorganskog punila (HAp-a) potvrđena je primjenom fluorescentnog mikroskopa u crvenom području (TRITC,

Texas red filter) (*Slika 20*). Fluorescencija aktivnog oblika doksorubicina može se detektirati fluorescentnim mikroskopom [47]. Dimerizacijom molekula doksorubicina (pod utjecajem svjetlosti ili natrijevog klorida prisutnog u otopini) nastaje manje aktivan oblik lijeka koji nema svojstvo fluorescencije [59]. Na temelju mikrografija dobivenih primjenom TRITC filtera moguće je zaključiti da je aktivni oblik antitumorskog lijeka DOX-a uspješno ugrađen u pripremljene CHT-Cu mikročestice s i bez HAp-a. Nadalje, iz mikrografija (*Slika 20. i 21.*) vidljivo je da su mikročestice nakon ugradnje lijeka zadržale sferičan oblik te da je došlo do porasta veličine mikročestica uslijed ugradnje lijeka. Mikrografije dobivene snimanjem u svjetlom polju (BF, engl. *bright field*) pokazuju prisutnost istaloženih soli i potencijalno neaktivnog oblika lijeka koji su prilikom sušenja istaložili na staklenu podlogu i mikročestice. Kako bi se dobile „čiste“ mikročestice s ugrađenim lijekom predlaže se prije sušenja provesti korak ispiranja demineraliziranom vodom. Nadalje, očekuje se da će prisutnost  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{PO}_4^{3-}$  iona u uzorcima CHT-Cu/HAp5 i HAp10 povećati efikasnost ugradnje doksorubicina u mikročestice [60,61]. Na temelju dobivenih mikrografija nije uočena promjena intenziteta fluorescencije.

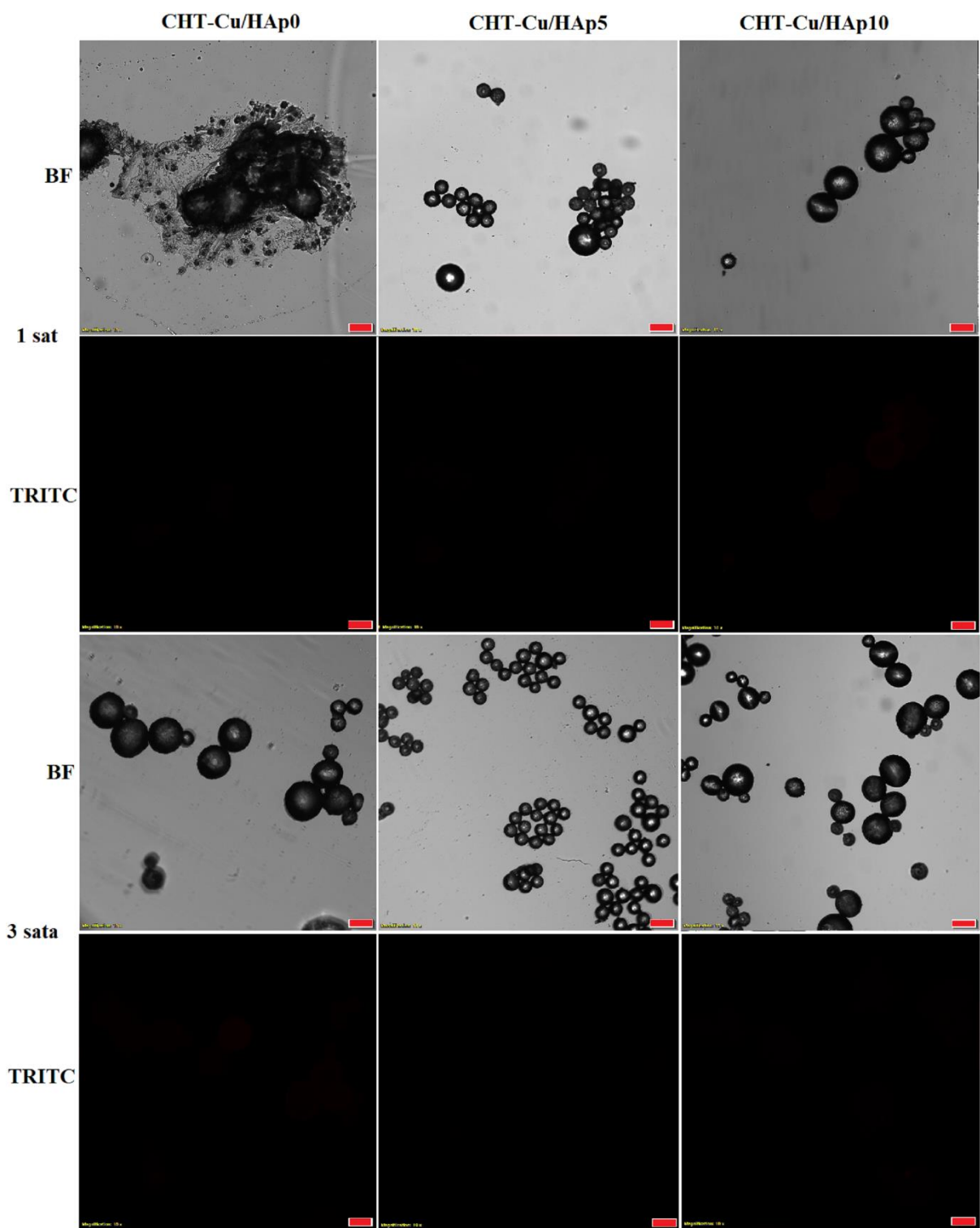
*Slika 21.* prikazuje kontrolne uzorke dobivene nakon inkubacije u PB-6 otopini tijekom jednog i tri sata. Na mikrografijama dobivenim snimanjem u svjetlom polju (CHT-Cu/HAp0) mogu se primijetiti soli pufera (fosfati) istaložene na staklenu podlogu, a mikročestice nije moguće uočiti na mikrografijama dobivenim uporabom TRITC filtera zato što ne posjeduju svojstvo fluorescencije – fluorescencija je isključivo rezultat ugradnje doksorubicina u mikročestice. Također, moguće je uočiti da je došlo do promjene veličine mikročestica u odnosu na suhe netretirane (dobivene procesom elektroštrcanja), što ukazuje na mogućnost apsorpcije soli (fosfata) u mikročestice.





*Slika 20.* Mikrografije suhih mikročestica s ugrađenim lijekom nakon jednog i tri sata ugradnje lijeka dobivene fluorescentnim mikroskopom uz povećanje 10×, upotrebom BF i TRITC filtera; crvena skala odgovara 100 μm

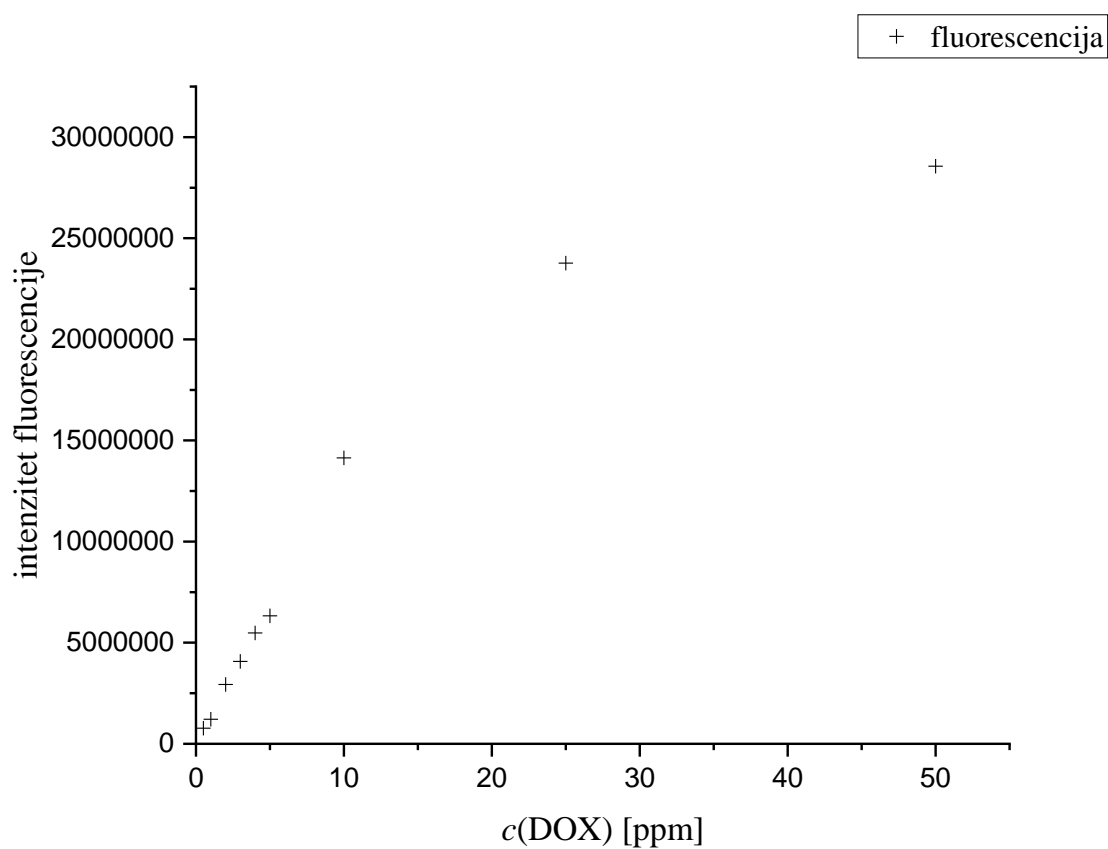


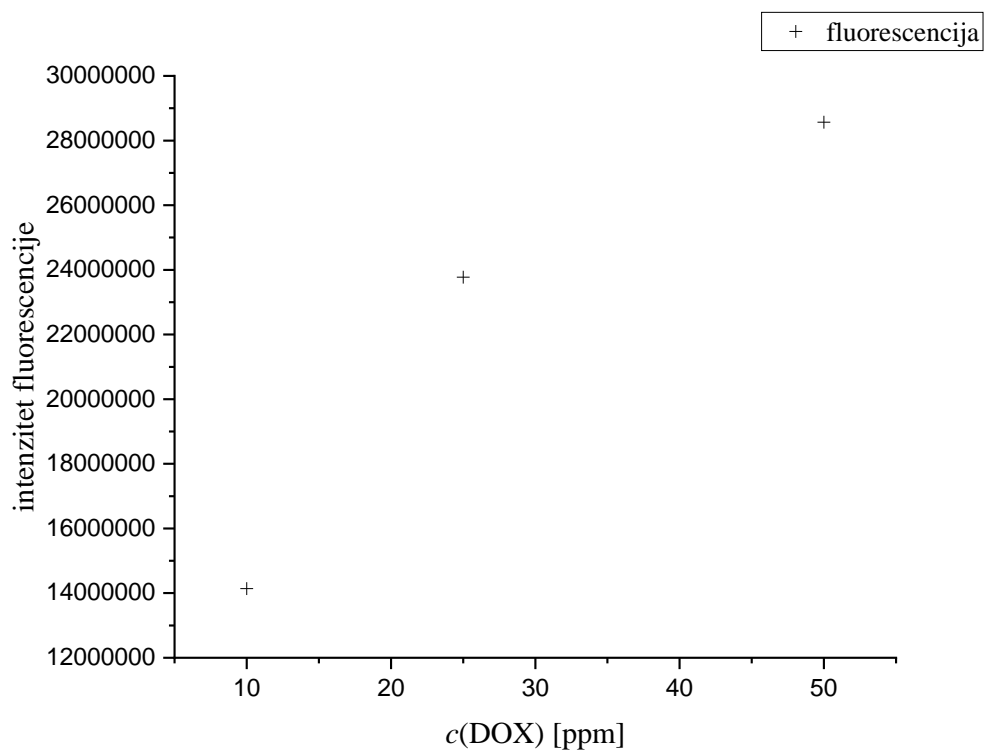
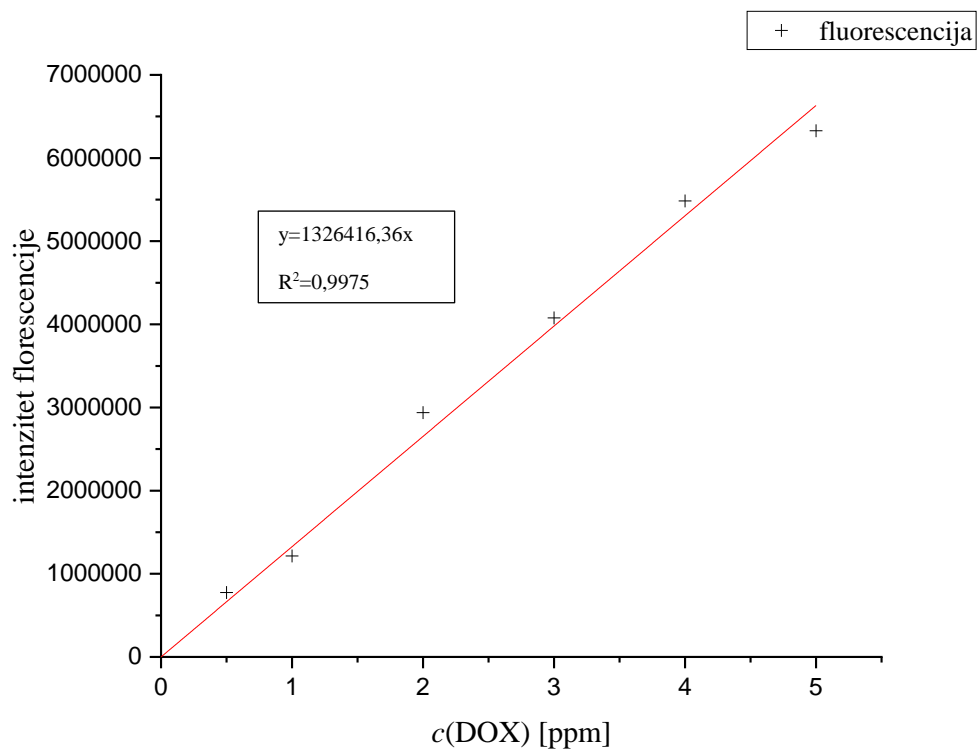


*Slika 21.* Mikrografije suhih kontrolnih mikročestica nakon jednog i tri sata inkubacije u PB-6 otopini dobivene fluorescentnim mikroskopom uz povećanje 10×, upotrebom BF i TRITC filtera; crvena skala odgovara 100 μm

#### 4.5.1. Procjena efikasnosti ugradnje lijeka primjenom fluorescentne spektrometrije

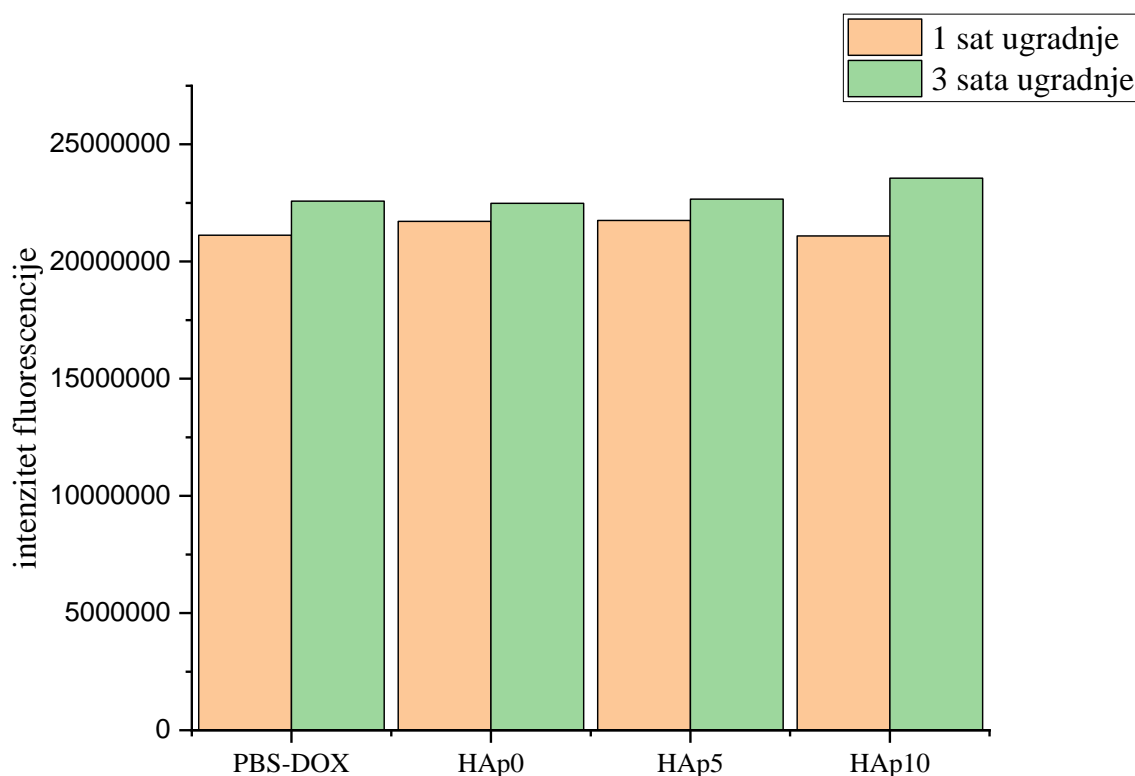
Prilikom izrade baždarne krivulje (krivulja ovisnosti intenziteta fluorescencije o koncentraciji doksorubicina) (*Slika 22. (gore)*) u području koncentracija doksorubicina 0 – 50 ppm linearna ovisnost dobivena je za koncentracijsko područje 0 – 5 ppm (*Slika 22. (sredina)*). Povećanjem koncentracije gubi se linearnost pa se koncentracija lijeka ne može točno odrediti, već samo procijeniti.





**Slika 22.** Ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji doksorubicina (DOX) dobivena prilikom izrade baždarnog pravca u području koncentracija 0 – 50 ppm (gore) je linearna u području koncentracija 0-5 ppm (sredina), a nelinearna u području koncentracija >5 ppm (dolje)

Za početnu koncentraciju PB-DOX otopine (25 ppm) izmjeren je intenzitet fluorescencije te je pretpostavljeno da će se intenzitet otopine lijeka nakon ugradnje lijeka u mikročestice smanjiti proporcionalno količini adsorbiranog/apsorbiranog lijeka u mikročestice. Kao što je vidljivo na *Slici 23.*, mjerenja intenziteta otopina DOX-a nakon jednog sata za CHT-Cu/HAp0 i CHT-Cu/HAp5 čestice, odnosno tri sata za CHT-Cu/HAp5 i CHT-Cu/HAp10 pokazala su povećanje intenziteta u odnosu na kontrolnu otopinu (otopina DOX-a bez mikročestica držana pri istim uvjetima). To bi značilo da je koncentracija lijeka u otopini nakon ugradnje porasla. Razlog porasta intenziteta fluorescencije otopine lijeka nakon provedene inkubacije kompozitnih mikročestica su moguće interakcije između kitozana i lijeka koje usporavaju razgradnju lijeka.

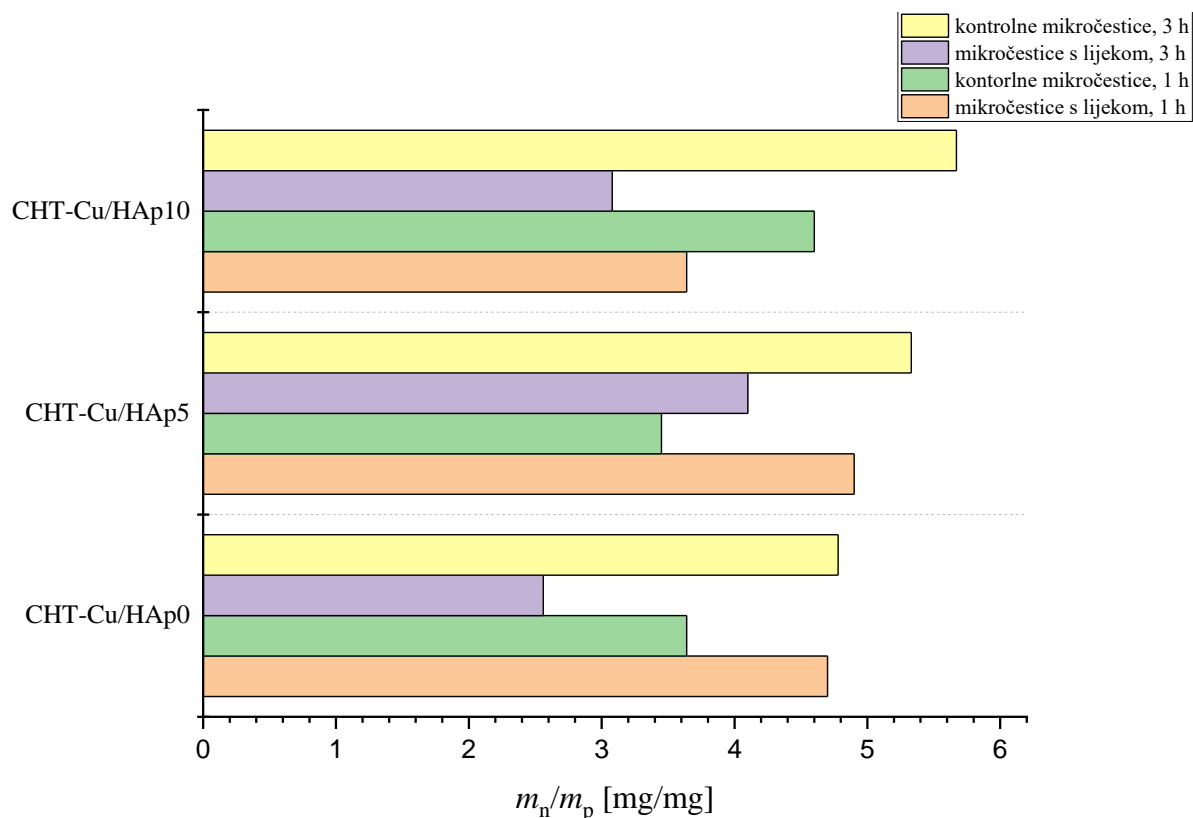


**Slika 23.** Intenzitet fluorescencije otopine doksorubicina s mikročesticama (CHT-Cu/HAp0, HAp5 i HAp10) i bez mikročestica (PB-DOX) nakon jednog i tri sata ugradnje pri 37 °C

Budući da se ova metoda pokazala neadekvatnom, predložena je druga metoda procjene efikasnosti ugradnje lijeka na mikročestice – gravimetrijska metoda.

#### 4.5.2. Procjena efikasnosti ugradnje lijeka gravimetrijskom metodom

Slika 24. prikazuje dobivene promjene masa CHT-Cu/HAp mikročestica uslijed ugradnje doksorubicina te apsorpcije soli nakon jednog i tri sata inkubacije u PB-DOX (otopina s lijekom) i PB-6 (kontrolna otopina) pri temperaturi 37 °C.



**Slika 24.** Grafički prikaz promjene mase mikročestica nakon ugradnje lijeka ( $m_n$ ) nakon jednog i tri sata inkubacije u otopini lijeka (PB-DOX) te kontrolnoj otopini (PB-6) pri 37 °C, u odnosu na netretirane mikročestice ( $m_p$ )

Mjerenjem mase CHT-Cu/HAp mikročestica nakon procesa ugradnje lijeka u odnosu na netretirane, dobiveni su rezultati koji nemaju pravilan trend promjene:

- Uzorci CHT-Cu/HAp0 i CHT-Cu/HAp5 inkubirani u PB-DOX otopini jedan sat imaju veću promjenu mase u odnosu na uzorak CHT-Cu/HAp10 inkubiran pri istim uvjetima.

- Uzorak CHT-Cu/HAp5 inkubiran u PB-DOX otopini tri sata ima  $\sim 1,3\times$  veću promjenu mase od uzorka CHT-Cu/HAp10, odnosno  $\sim 1,6\times$  od uzorka CHT-Cu/HAp0, inkubiranih pri istim uvjetima.
- Uzorci CHT-Cu/HAp0 i CHT-Cu/HAp5 inkubirani u kontrolnoj otopini (PB-6) jedan sat pokazuju slične vrijednosti istaloženih soli, dok uzorak CHT-Cu/HAp10 pri istim uvjetima ima  $\sim 0,92\times$  veću apsorpciju soli.
- Uzorak CHT-Cu/HAp10 inkubiran u kontrolnoj otopini 1 h pokazuje znatno veći sadržaj soli (4,6 mg/mg), nego isti uzorak inkubiran u otopini lijeka (3,6 mg/mg).

Moguće je uočiti trend povećanja mase istaloženih soli (fosfata) u CHT-Cu/HAp mikročesticama koje su inkubirane u PB-6 (kontrolnoj) otopini tijekom dužeg vremena (3h). Također, ti uzorci pokazuju veću promjenu mase, nego uzorci inkubirani u otopini lijeka tijekom istog vremena.

Općenito, dobiveni rezultati gravimetrijske metode slažu se s vizualno primijećenim promjenama, a koje su ukazale na veće mikročestice nakon procesa ugradnje lijeka u odnosu na netretirane CHT-Cu/HAp mikročestice. Također, treba imati na umu da je za svaki sustav vagano  $\sim 1,0$  mg mikročestica te da je mjerenje provedeno bez replika. Kako bi se dobili jasniji rezultati o efikasnosti ugradnje doksorubicina na kompozitne mikročestice potrebno je analizirati promjenu mase većeg broja replika svakog uzorka ili efikasnost ugradnje lijeka procijeniti nekom drugom metodom.

Zaključno, može se reći da duljim vremenom inkubacije mikročestica u mediju proporcionalno raste apsorpcija soli u mikročestice, te da sustav CHT-Cu/HAp5 pokazuje obećavajuća svojstva s obzirom na to da posjeduje najveću efikasnost ugradnje lijeka (za oba ispitivana vremena inkubacije).

#### *4.5.3. Prijedlozi metoda za procjenu efikasnosti ugradnje lijeka*

Pregledom literature [62] pronađena je druga metoda određivanja efikasnosti ugradnje doksorubicina u nanočestice na temelju kitozana. Doksorubicin je u različitim koncentracijama na nanočestice ugrađen tijekom procesa elektroštrcanja. U radu je za procjenu efikasnosti ugradnje lijeka korištena UV-Vis spektrofotometrija pri valnoj duljini 480 nm, a metoda se sastojala od inkubiranja kitozanskih nanočestica s ugrađenim lijekom u demineraliziranoj vodi 48 sati te mjerenjem intenziteta sakupljenog ekstrakta nakon centrifugiranja. Za svaki sustav nanočestica mjerenja su ponovljena tri puta. Kalibracijska

krivulja pripremljena je pomoću otopina doksorubicina u vodi poznatih koncentracija. Efikasnost ugradnje računata je prema formuli (6):

$$EE [\%] = \frac{(\text{početna koncentracija DOX-a} - \text{koncentracija DOX-a u supernatantu}) * 100}{\text{početna koncentracija DOX-a}} \quad (6)$$

Za promatrane sustave kitozanskih nanočestica dobivena je relativno visoka efikasnost ugradnje doksorubicina između 62,6 i 67,9%, a najveća standardna devijacija iznosila je  $\pm 6,9\%$ .

Wu i suradnici [63] istraživali su ovisnost efikasnosti ugradnje doksorubicina u mikročestice na temelju hidroksiapatita i želatine u ovisnosti o količini dodanog kitozana. Za procjenu efikasnosti koristili su UV-Vis spektrofotometriju pri 480 nm. Kalibracijski pravac pripremljen je u rasponu koncentracija doksorubicina od 0 do 180 ppm. Efikasnost ugradnje računata je prema formuli (6). Iz dobivenih rezultata zaključili su da efikasnost ugradnje doksorubicina u mikročestice na temelju hidroksiapatita i želatine raste s porastom udjela kitozana zbog stvaranja vodikovih veza između doksorubicina i kitozana.

Također, moguća metoda za kvantitativno određivanje doksorubicina ugrađenog na kitozanske mikročestice je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, HPLC (prema engl. *high performance liquid chromatography*) gdje se kao pokretna faza koristi smjesa acetonitril/voda=25/75 koja sadrži 0,1% trietilamina, a mjeri se masa lijeka ugrađena na mikročestice te početna masa lijeka. Park i suradnici [64] tu su metodu koristili za procjenu efikasnosti ugradnje doksorubicina u mikročestice na temelju kitozana i tetrafenilporfirina. Efikasnost ugradnje računali su prema formuli (7):

$$EE [\%] = \frac{\text{masa DOX-a u uzorku}}{\text{početna masa DOX-a}} * 100\% \quad (7)$$

Iz dobivenih rezultata zaključili su da efikasnost ugradnje doksorubicina raste porastom koncentracije tetrafenilporfirina te porastom omjera DOX/CHT prilikom ugradnje.

## 5. ZAKLJUČAK

Mikročestice na temelju kompleksa kitozan-bakar s i bez dodatka hidroksiapatita uspješno su pripremljene metodom elektroštrcanja.

Dobivene CHT-Cu/HAp mikročestice analizirane su primjenom ATR-FTIR i XRD metode koje ukazuju na prisutnost hidroksiapatita u analiziranim uzorcima. Na FTIR spektrima ne dolazi do pojave novih vrpci, već samo do promjene intenziteta i valnih brojeva postojećih, što ukazuje na elektrostatsku prirodu veze kitozana,  $\text{Cu}^{2+}$  iona i hidroksiapatita. Povećanjem udjela anorganske faze u uzorcima, XRD analizom utvrđeno je smanjenje intenziteta difrakcijskog maksimuma karakterističnog za kitozan pri  $2\theta \approx 20^\circ$ , kao i povećavanje difrakcijskih maksimuma prisutne faze koja se slaže s podacima ICDD kartice broj 9-432, a koja odgovara hidroksiapatitu.

Invertnim svjetlosnim mikroskopom procijenjen je oblik i raspodjela veličina kompozitnih mikročestica. Utvrđeno je kako su sve mikročestice tijekom pripreve zadržale sferičan oblik. Dodatak hidroksiapatita u manjem udjelu (uzorak CHT-Cu/HAp5) smanjuje veličinu mikročestica te sužuje raspodjelu veličina, ali povećanjem udjela hidroksiapatita (HT-Cu/HAp10) raste viskoznost otopine što destabilizira proces elektroštrcanja te u konačnici širi raspodjelu veličina mikročestica.

Stupanj bubrenja određen je kao omjer volumena mokrih i suhih mikročestica u otopini fosfatnog pufera pH vrijednosti 6 i 7,4 te demineraliziranoj vodi (pH=6,4). Smanjenjem pH vrijednosti otopine raste stupanj bubrenja uslijed protoniranja amino skupina polimernog lanca. Porastom udjela hidroksiapatita raste stupanj bubrenja uzoraka u svim ispitivanim medijima, a mogući razlog tome je manji udio uređenih domena polimerne matrice nastalih uslijed prisutnosti čestica punila.

Primjenom fluorescentne mikroskopije potvrđena je ugradnja aktivnog oblika antitumorskog lijeka doksorubicina u sve CHT-Cu/HAp mikročestice. Međutim, primjenom fluorescentne spektrometrije te gravimetrijske metode, nije bilo moguće u potpunosti odrediti efikasnost ugradnje lijeka u mikročestice. Stoga su potrebna daljnja istraživanja kako bi se procijenila efikasnost ugradnje lijeka u CHT-Cu/HAp mikročestice.

Kao sustav s obećavajućim svojstvima pokazao se CHT-Cu/HAp5 uslijed najuže raspodjele veličina čestica te potencijalno najveće efikasnosti ugradnje lijeka.



## 6. SIMBOLI

DNK	deoksiribonukleinska kiselina
PLGA	kopolimer mliječne i glikolne kiseline
Cu(II)	kation bakra
-NH <sub>2</sub>	amino skupina
DA	stupanj acetilacije (engl. <i>degree of acetylation</i> )
DD	stupanj deacetilacije (engl. <i>degree of deacetylation</i> )
FTIR	infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom
UV	ultraljubičasto zračenje (engl. <i>ultraviolet</i> )
-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	protonirana amino skupina
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
CHT-PVA	kopolimer kitozana i poli(vinil-alkohola)
-OH	hidroksilna skupina
ROS	reaktivne molekule kisika (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
-O <sub>2</sub> <sup>2-</sup>	peroksidni anion
-O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	superoksidni anion
OH·	hidroksidni radikal
CuCl <sub>2</sub>	bakrov(II) klorid
Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	hidroksiapatit, HAp
Ca <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	kalcijev pirofosfat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	natrijev hidrogenfosfat
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	kalijev hidrogenfosfat
-CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	karbonatni anion

CO <sub>2</sub>	ugljikov(IV) oksid
-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	fosfatni anion
CHT	kitozan
CH <sub>3</sub> COOH	octena kiselina
Cu(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ×H <sub>2</sub> O	bakrov(II) acetat monohidrat
NaOH	natrijev hidroksid
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	etanol, EtOH
C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	aceton
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ×H <sub>2</sub> O	natrijev dihidrogenfosfat monohidrat
DOX	doksorubicin
CHT-Cu <sup>2+</sup>	kompleks kitozana i bakra
CHT-Cu/HAp	kompozit kompleksa kitozan-bakar i hidroksiapatita
CHT-Cu/HAp0	mikročestice koje ne sadrže hidroksiapatit
CHT-Cu/HAp5	mikročestice koje sadrže 5 mas.% hidroksiapatita
CHT-Cu/HAp10	mikročestice koje sadrže 10 mas.% hidroksiapatita
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	magnezijev nitrat
PB	otopina fosfatnog pufera (prema engl. <i>phosphate buffer solution</i> )
PB-6	otopina fosfatnog pufera pH vrijednosti 6
PB-7	otopina fosfatnog pufera pH vrijednosti 7,4
XRD	rendgenska difrakcijska analiza
ICDD	identifikacijska kartica iz ICDD baze (engl. <i>International Centre for Diffraction Data</i> )
TRITC	tetrametilrodoamin (Texas red; crvena fluorescencija)
BF	standardni filter (engl. <i>bright field</i> )
UV-Vis	ultraljubičasta i vidljiva svjetlost

HPLC	visokoselektivna tekućinska kromatografija (engl. <i>high performance liquid chromatography</i> )
$l$	duljina [cm]
$\dot{V}$	volumni protok [mL/h]
$RH$	relativna vlažnost zraka [%]
$T$	temperatura [°C]
$U$	napon [kV]
$r$	polumjer sfere [ $\mu\text{m}$ ]
$A$	površina mikročestica [ $\mu\text{m}^2$ ]
$V$	volumen sfere [ $\mu\text{m}^3$ ]
$m$	masa mikročestica [mg]
$2\theta$	kut pri kojem se javlja difrakcijski maksimum [°]
$EE$	efikasnost ugradnje [%]
$SD$	stupanj bubrenja [%]

## 7. LITERATURA

- [1] Senapati, S., Mahanta, A. K., Kumar, S., Maiti, P., Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance, *Sig. Transduct. Target. Ther.*, **3** (2018) 7.
- [2] Saboktakin, M. R., Maharramov, A., Ramazanov, M., pH sensitive chitosan-based supramolecular gel for oral drug delivery of insulin, *J. Mol. Genet. Med.*, **9** (2015) 2-5.
- [3] Guibal, E., Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review, *Sep. Purif. Technol.*, **38** (2004) 43-74.
- [4] Cui, J., Yu, Z., Lau, D., Effect of Acetyl Group on Mechanical Properties of Chitin/Chitosan Nanocrystal: A Molecular Dynamics Study, *Int. J. Mol. Sci.*, **17** (2016) 61.
- [5] Cohen, E., Chitin synthesis and inhibition: a revisit, *Pest. Manag. Sci.*, **57** (2001) 946-950.
- [6] Aranaz, I., Alcántara, A. R., Civera, M. C., Arias, C., Elorza, B., Heras Caballero, A., Acosta, N., Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications, *Polymers (Basel)*, **13** (2021) 3256.
- [7] Rinaudo, M., Chitin and chitosan: properties and applications, *Prog. Polym. Sci.*, **31** (2006) 603-632.
- [8] Cheung, R. C., Ng, T. B., Wong, J. H., Chan, W. Y., Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications, *Mar. Drugs*, **13** (2015) 5156-5186.
- [9] Kou, S., Peters, L., Mucalo, M., Chitosan: A review of sources and preparation methods, *Int. J. Biol. Macromol.*, **169** (2021) 85-94.
- [10] Kaczmarek, M. B., Struszczyk-Swita, K., Li, X., Szczęsna-Antczak, M., Daroch, M. Enzymatic Modifications of Chitin, Chitosan, and Chitooligosaccharides, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **7** (2019) 243.
- [11] Amalraj, A., Jude, S., Gopi, S., Polymer blends, composites and nanocomposites from chitin and chitosan; manufacturing, characterization and applications, u: Thomas, S., Pius A., Gopi, S., Handbook of Chitin and Chitosan, Vol. 2: Composites and Nanocomposites from Chitin and Chitosan, Manufacturing and Characterisations, Elsevier, Amsterdam, 2020., str.1-46.

- [12] Lopez-Moya, F., Suarez-Fernandez, M., Lopez-Llorca, L. V., Molecular Mechanisms of Chitosan Interactions with Fungi and Plants, *Int. J. Mol. Sci.*, **20** (2019) 332.
- [13] Raafat, D., Sahl, H. G., Chitosan and its antimicrobial potential-a critical literature survey, *Microb. Biotechnol.*, **2** (2009) 186-201.
- [14] Gonçalves, C., Ferreira, N., Lourenço, L., Production of Low Molecular Weight Chitosan and Chitooligosaccharides (COS): A Review, *Polymers (Basel)*, **13** (2021) 2466.
- [15] Shakeel, A., Saiqa, I., Chitin and chitosan: history, composition and properties, u: Saiqa, I., Shakeel A., Chitosan: Derivatives, Composites and Applications, Scrivener Publishing LLC, Beverly, 2017., str.1-24.
- [16] Rohindra, D. R., Nand, A. V., Khurma, J. R., Swelling properties of chitosan hydrogels, *SPJNAS*, **22** (2004) 32-35.
- [17] Gutiérrez, T. J., Chitosan Applications for the Food Industry, u: Ahmed, S., Ikram, S., Chitosan: Derivatives, Composites and Applications, Scrivener Publishing LLC, Beverly, 2017., str.183-232.
- [18] Meng, X., Yang, L., Kennedy, J. F., Shiping Tian, S., Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit, *Carbohydr. Polym.*, **81** (2010) 70-75.
- [19] Orzali, L., Corsi, B., Forni, C., Riccioni, L., Chitosan in Agriculture: A New Challenge for Managing Plant Disease, u: Shalaby, E., Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides, IntechOpen, London, 2017., str.17-36.
- [20] Nechita P., Applications of chitosan in wastewater treatment, u: Shalaby, E., Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides, IntechOpen, London, 2017., str.209-228.
- [21] Salehi, E., Madaeni, S. S., Rajabi, L., Derakhshan, A. A., Daraei, S., Vatanpour, V., Static and dynamic adsorption of copper ions on chitosan/polyvinyl alcohol thin adsorptive membranes: Combined effect of polyethylene glycol and aminated multi-walled carbon nanotubes, *Chem. Eng. J.*, **215-216** (2013) 791-801.
- [22] Zhang, C., Gong, H., Liu, Y., Effects of postharvest coating using chitosan combined with natamycin on physicochemical and microbial properties of sweet cherry during cold storage, *Int. J. Bio. Macromol.*, **214** (2022) 1-9.

- [23] Guzmán, E., Ortega, F., Rubio, R. G., Chitosan: A Promising Multifunctional Cosmetic Ingredient for Skin and Hair Care, *Cosmetics*, **9** (2022) 99.
- [24] Muzzarelli, R. A. A., Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone, *Carbohydr. Polym.*, **76** (2009) 167-182.
- [25] Cam, M. E., Zhang, Y., Edirisinghe, M., Electrospayed microparticles: a novel drug delivery method, *Expert Opin. Drug. Deliv.*, **16** (2019) 895-901.
- [26] Bock, N., Dargaville, T. R., Woodruff, M. A., Electrospaying of polymers with therapeutic molecules: State of the art, *Prog. Polym. Sci.*, **37** (2012) 1510-1551.
- [27] Mitra, S., Gaur, U., Ghosh, P. C., Maitra, A. N., Tumour targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier, *J. Control. Release*, **74** (2001) 317-23.
- [28] Bock, N., Woodruff, M. A., Hutmacher, D. W., Dargaville, T. R., Electrospaying, a Reproducible Method for Production of Polymeric Microspheres for Biomedical Applications, *Polymers*, **3** (2011) 131-149.
- [29] Lončarević, A., Ivanković, M., Rogina, A., Electrospayed Chitosan–Copper Complex Microspheres with Uniform Size, *Materials*, **14** (2021) 5630.
- [30] Uhl, A. M., Mills, S. C., Andrew, J. S., Synthesis of cobalt ferrite nanoparticles via electrospaying into a liquid collector, *J. Mater. Res.*, **35** (2020) 864-871.
- [31] Ciach, T., Microencapsulation of drugs by electro-hydro-dynamic atomization, *Int. J. Pharm.*, **324** (2006) 51-55.
- [32] Park, C. H., Lee, J., Electrospayed Polymer Particles: Effect of the Solvent Properties, *J. Appl. Polym. Sci.*, **114** (2009) 430-437.
- [33] Loscertales, I. G., Barrero, A., Guerrero, I., Cortijo, R., Marquez, M., Ganan-Calvo, A. M., Micro/Nano Encapsulation via Electrified Coaxial Liquid Jets, *Science*, **295** (2002) 1695-1698.
- [34] Valo, H., Peltonen, L., Vehviläinen, S., Karjalainen, M., Kostiainen, R., Laaksonen, T., Hirvonen, J., Electrospay encapsulation of hydrophilic and hydrophobic drugs in poly(L-lactic acid) nanoparticles, *Small*, **5** (2009) 1791-1798.

- [35] Tardito, S., Marchio, L., Copper Compounds in Anticancer Strategies, *Curr. Med. Chem.*, **16** (2009) 1325-1348.
- [36] Tardito, S., Bassanetti, I., Bignardi, C., Elviri, L., Tegoni, M., Mucchino, C., Bussolati, O., Franchi-Gazzola, R., Marchiò, L., Copper Binding Agents Acting as Copper Ionophores Lead to Caspase Inhibition and Paraptotic Cell Death in Human Cancer Cells, *J. Am. Chem. Soc.*, **133** (2011) 6235-6242.
- [37] Hao, X., Hu, X., Zhang, C., Chen, S., Li, Z., Yang, X., Zhang, J., Hybrid Mesoporous Silica-Based Drug Carrier Nanostructures with Improved Degradability by Hydroxyapatite, *ACS Nano*, **9** (2015), 9614–9625.
- [38] Firdaus Hussin, M. S., Zuhudi Abdullah, H. Z., Idris, M. I., Abdul Wahap, M. A., Extraction of natural hydroxyapatite for biomedical applications—A review, *Heliyon*, **8** (2022) e10356.
- [39] Ferraris, S., Yamaguchi, S., Barbani, N., Cazzola, M., Cristallini, C., Miola, M., Vernè, E., Spriano, S., Bioactive materials: In vitro investigation of different mechanisms of hydroxyapatite precipitation, *Acta Biomater.*, **102** (2020) 468-480.
- [40] Qing-Xia, Z., Ya-Ming, L.; Dan, H., Co-substitution of carbonate and fluoride in hydroxyapatite: Effect on substitution type and content, *Front. Mater. Sci.*, **9** (2015) 192-198.
- [41] Xianmiao, C., Yubao, L., Yi, Z., Li, Z., Jidong, L., Huanan, W., Properties and in vitro biological evaluation of nano-hydroxyapatite/chitosan membranes for bone guided regeneration, *Mater. Sci. Eng. C.*, **29** (2009) 29-35.
- [42] Liu, Y., Nadeem, A., Sebastian, S., Olsson, M. A., Wai, S. N., Styring, E., Engellau, J., Isaksson, H., Tägil, M., Lidgren, L., Raina, D. B., Bone mineral: A trojan horse for bone cancers. Efficient mitochondria targeted delivery and tumor eradication with nano hydroxyapatite containing doxorubicin, *Mater. Today Bio.*, **14** (2022) 100227
- [43] Maachou, H., Bal, K., Bal, Y., Chagnes, A., Cote, G., Aliouche, D., In Vitro Biomineralization and Bulk Characterization of Chitosan/Hydroxyapatite Composite Microparticles Prepared by Emulsification Cross-Linking Method: Orthopedic Use., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **168** (2012) 1459-1475.
- [44] Wexler, A., Hasegawa, S., Relative humidity-temperature relationships of some saturated salt solutions in the temperature range 0 to 50 °C, *J. Res. Natl. Inst.*, **53** (1954) 19-26.

- [45] Lee, S., Shanti, A., Effect of Exogenous pH on Cell Growth of Breast Cancer Cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (2021) 9910.
- [46] Fabrice Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Heurteaux, C., Lazdunski, M., TASK, a human background K<sup>+</sup> channel to sense external pH variations near physiological pH, *EMBO J.*, **16** (1997) 5464-5471.
- [47] Shah, S., Chandra, A., Kaur, A., Sabnis, N., Lacko, A., Gryczynski, Z., Fudala, R., Gryczynski, I., Fluorescence properties of doxorubicin in PBS buffer and PVA films, *J. Photochem. Photobiol. B.*, **170** (2017) 65-69.
- [48] Stanić, V., Dimitrijević, S., Antić-Stanković, J., Mitrić, M., Jokić, B., Plećaš, I. B., Raičević, S., Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders, *Appl. Surf. Sci.*, **256** (2010) 6083-6089.
- [49] Orlova, M. A., Nikolaev, A. L., Trofimova, T. P., Severin, A. V., Gopin, A. V., Zolotova, N. S., Orlov, A. P., Specific properties of hydroxyapatite as a potential transporter of copper ions and its complexes, *Russ. Chem. Bull.*, **68** (2019) 1102–1108.
- [50] Rogina, A., Ivanković, M., Ivanković, H., Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite within chitosan matrix, *Mater. Sci. Eng. C*, **33** (2013) 4539-4544.
- [51] Gritsch, L., Maqbool, M., Mouriño, V., Ciraldo, F. E., Cresswell, M., Jackson, P. R., Lovell, C., Boccaccini, A. R., Chitosan/hydroxyapatite composite bone tissue engineering scaffolds with dual and decoupled therapeutic ion delivery: copper and strontium, *J. Mater. Chem. B.*, **7** (2019) 6109-6124.
- [52] Xianmiao, C., Yubao, L., Yi, Z., Li, Z., Jidong, L., Huanan, W., Properties and in vitro biological evaluation of nano-hydroxyapatite/chitosan membranes for bone guided regeneration, *Mater. Sci. Eng. C.*, **29** (2009) 29-35.
- [53] Huang, Z. H., Dong, Y. S., Chu, C. L., Lin, P. H., Electrochemistry assisted reacting deposition of hydroxyapatite in porous chitosan scaffolds, *Mater. Lett.*, **62** (2008) 3376-3378.
- [54] Granja, P., Silva, A. I. N., Borges, J. P., Barrias, C., Amaral, I., Preparation and Characterization of Injectable Chitosan-Hydroxyapatite Microspheres, *Key Eng. Mater.*, **254-256** (2004) 573-576.



- [55] Tanase, C. E., Popa, M. I., Verestiuc, L., Chitosan-Hydroxyapatite Composite Obtained by Biomimetic Method as New Bone Substitute, 2009 Advanced Technologies for Enhanced Quality of Life, Iasi, Romania, 2009, pp. 42-46.
- [56] Gupta, N. V., Shivakumar, H.G., Investigation of Swelling Behavior and Mechanical Properties of a pH-Sensitive Superporous Hydrogel Composite, *Iran J. Pharm. Res.*, **11** (2012) 481-493.
- [57] Liu, H., Wang, C., Li, C., Qin, Y., Wang, Z., Yang, F., Li, Z., Wang, J., A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing, *RSC Adv.*, **14** (2018) 7533-7549.
- [58] Li, S., Xiao, L., Deng, H., Shi X., Cao, Q., Remote controlled drug release from multi-functional Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GO/Chitosan microspheres fabricated by an electrospray method, *Colloids Surf. B.*, **151** (2017) 354-362.
- [59] Changenet-Barret, P., Gustavsson, T., Markovitsi, D., Manet, I., Montib, S., Unravelling molecular mechanisms in the fluorescence spectra of doxorubicin in aqueous solution by femtosecond fluorescence spectroscopy, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **15** (2013) 2937-2944.
- [60] G. Dördelmann, D. Kozlova, S. Karczewski, R. Lizio, S. Knauer, M. Epple, Calcium phosphate increases the encapsulation efficiency of hydrophilic drugs (proteins, nucleic acids) into poly(D,L-lactide-co-glycolide acid) nanoparticles for intracellular delivery, *J. Mater. Chem. B* 2 (2014) 7250.
- [61] C. Qiu, Y. Wu, Q. Guo, Q. Shi, J. Zhang, Y. Meng, F. Xia, J. Wang, Preparation and application of calcium phosphate nanocarriers in drug delivery, *Mater. Today Bio* 17 (2022) 100501.
- [62] Songsurang, K., Praphairaksit, N., Siraleartmukul, K., Muangsin N., Electrospray fabrication of doxorubicin-chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for delivery of doxorubicin, *Arch. Pharm. Res.*, **34** (2011) 583-592.
- [63] Wu, M. Y., Liang, Y. H., Yen, S. K., Effects of Chitosan on Loading and Releasing for Doxorubicin Loaded Porous Hydroxyapatite–Gelatin Composite Microspheres, *Polymers*, **14** (2022) 4276.

[64] Park, J. M., Lee, S. Y., Lee, G. H., Chung, E. Y., Chang, K. M., Kwak, B. K., Kuh, H. J., Lee, J., Design and characterisation of doxorubicin-releasing chitosan microspheres for anti-cancer chemoembolisation, *J. Microencapsul.*, **29** (2012) 695-705.