

Materijali na temelju kitozana kao kelatni agensi

Lončarević, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:149:320912>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Andrea Lončarević

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018.

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

Andrea Lončarević

MATERIJALI NA TEMELJU KITOZANA KAO KELATNI AGENSI

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Marica Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Marica Ivanković

dr. sc. Anamarija Rogina

prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

Zagreb, rujan 2018.

Zahvale

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. sc. Marici Ivanković, na prihvaćenom mentorstvu te stručnom vodstvu i savjetima tijekom izrade rada.

Veliko hvala i dr. sc. Anamariji Rogina na pomoći i savjetima pri izvedbi eksperimentalnog dijela, kao i pisanju cijelog rada.

Zahvaljujem se i dr. sc. Maji Antunović s Prirodoslovnog fakulteta u Zagrebu, odsjeka Biologije, Zavoda za molekularnu biologiju na pomoći oko biološke karakterizacije materijala.

Hvala svima koji su bili uz mene tijekom cijelog studija, posebno I.V.

Zadnje, ali meni najvažnije: najveće hvala mojim roditeljima i sestri Ini koji su mi omogućili da postanem ovo što danas jesam. Hvala što ste vjerovali u mene i uvijek bili tu!

SAŽETAK

Do sada, mali broj istraživanja posvećen je utjecaju dvovalentnih metalnih iona na strukturu i svojstva hidrogelova kitozana. S toga je cilj ovog rada pokazati kako se dodatkom dvovalentnih metalnih iona u dozvoljenim granicama toksičnosti može manipulirati strukturom, fizikalnim i biološkim svojstvima hidrogelova kitozana.

Kitozan je netoksičan, biokompatibilan i biorazgradivi polimer koji se može koristiti kao nosač u području tkivnog inženjerstva. Ovisno o stupnju deacetilacije i molekulskoj masi polimera, dodatkom bakrovih i cinkovih iona (Cu^{2+} i Zn^{2+}) dobivaju se hidrogelovi definirane strukture. Potencijalna metoda pripreme hidrogelova kelata kitozan – metalni ion s točno određenom strukturom je proces keliranja.

U eksperimentalnom dijelu rada, korištene su dvije vrste kitozana: srednje (C1) i visoke (C2) molekulske mase. Kao metalni prekursori korištene su soli acetata bakra i cinka, dok su koncentrirana otopina natrijevog hidroksida te zasićena atmosfera amonijaka služili kao neutralizirajući agensi. UV-Vis spektroskopska analiza otopina ukazala je na nastanak kelata kitozan – metalni ion. Pripremljeni hidrogelovi postupkom liofilizacije prevedeni su u nosače i kserogelove koji su okarakterizirani primjenom infracrvene spektroskopske analize s Fourierovim transformacijama (FTIR) i kvalitativnom rendgenskom difrakcijskom analizom (XRD). Morfologija i mikrostruktura uzoraka istražena je pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa (SEM). Provedene analize ukazuju na interakcije Cu^{2+} i Zn^{2+} iona s amino i hidroksilnim skupinama polimera, kao i na nastanak anorganskih kristalnih faza kada je gelirajući agens otopina NaOH. Test citotoksičnosti pokazao je da su kelati kitozana s bakrovim(II) ionima koncentracije veće od 3 mmol dm^{-3} citotoksični za Hek293 stanice, dok uzorci s cinkovim(II) ionima za sve istraživane koncentracije nisu pokazali citotoksična svojstva.

Ključne riječi: kitozan, keliranje, metalni ioni, mikrostruktura, citotoksičnost.

SUMMARY

Chitosan based materials as chelating agents

Up till now, a small number of studies were focused on the influence of divalent metal ions on the structure and properties of chitosan hydrogels. The aim of this work was to manipulate the physical and biological properties of chitosan's hydrogels by the addition of divalent metal ions at non-toxic concentrations.

Chitosan is a non-toxic, biocompatible and biodegradable polymer which can be used as a scaffold in tissue engineering. Depending on the degree of deacetylation and molecular weight of polymer, hydrogels with specific structures can be produced by the addition of copper and zinc ions (Cu^{2+} and Zn^{2+}). As a potential method, the chelation process can be used to prepare hydrogels of chelate chitosan – metal ion with defined structure.

In the experimental part of this work, two types of chitosan were used: medium (C1) and high (C2) molecular weight. Copper and zinc acetate were used as metal precursors, while concentrated solution of sodium hydroxide and saturated ammonia atmosphere were used as the neutralisation agents. The UV-Vis spectrophotometric analysis of the chitosan– M^{2+} solutions indicated the formation of corresponding chelates. The prepared hydrogels were transformed into scaffolds and xerogels by the lyophilisation method and characterized by Fourier transform infrared spectroscopic analysis (FTIR) and qualitative X-ray diffraction analysis (XRD). The morphology and microstructure of the samples were investigated by scanning electron microscopy (SEM). The analyses indicated interactions of Cu^{2+} and Zn^{2+} ions with amino and hydroxyl groups of the polymer, as well as the formation of inorganic crystalline phases with the NaOH as gelling agent. The cytotoxicity test confirmed that chelates with the concentration of copper(II) ion higher than 3 mmol dm^{-3} were cytotoxic for Hek293 cells, whereas chelates with zinc(II) ions of whole investigated concentration range did not show cytotoxic properties.

Keywords: chitosan, chelation, metal ions, microstructure, cytotoxicity.

SADRŽAJ

1	UVOD	1
2	OPĆI DIO	3
2.1	Hidrogel	3
2.1.1	Injekcijski polimerni sustavi	3
2.1.2	Liofilizacija	6
2.2	Kitozan	7
2.2.1	Stupanj deacetilacije i molekulska masa	8
2.2.2	Mehanizmi interakcija između kitozana i metalnih iona.....	8
2.2.3	Antimikrobna aktivnost.....	16
2.2.4	Citotoksičnost materijala na temelju kitozana i metalnih iona.....	19
3	EKSPERIMENTALNI DIO	21
3.1	Materijali	21
3.2	Priprema hidrogelova, kserogelova i kontrolnih uzoraka	21
3.2.1	Postupak <i>in situ</i> keliranja metalnih iona kitozanom.....	22
3.2.2	Priprema kontrolnih uzoraka	23
3.3	Metode karakterizacije	24
3.3.1	Mjerenje pH vrijednosti medija.....	24
3.3.2	Ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija.....	24
3.3.3	Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama i difuzna refleksija infracrvenog zračenja.....	24
3.3.4	Rendgenska difrakcijska analiza	25
3.3.5	Pretražna elektronska mikroskopija	25
3.4	Citotoksičnost kserogela kitozan – metalni ion	25
3.5	Statistička obrada podataka	26
4	REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1	UV-Vis spektroskopija	27

4.2	Mikrostruktura materijala	30
4.2.1	Hidrogelovi kelata kitozan – metalni ion	31
4.2.2	Kontrolni uzorci	39
4.3	DRIFT analiza.....	39
4.4	FTIR analiza	42
4.5	Rendgenska difrakcijska analiza	48
4.6	MTT test	52
5	ZAKLJUČAK	54
6	POPIS SIMBOLA	56
7	LITERATURA	58
	ŽIVOTOPIS.....	63

1 UVOD

Posljednjih godina velika se pažnja pridaje istraživanjima interakcija između biorazgradivih nosača temeljenih na prirodnim polisaharidima i terapijskih proteina. Najčešće korišteni polisaharidi su hitin te njegov derivat kitozan zbog velike biokompatibilnosti, biorazgradivosti i netoksičnosti. Do interakcija između kitozana i terapijskih peptida, proteina, DNA (deoksiribonukleinska kiselina) itd. dolazi uslijed prisutnosti velikog broja (protoniranih) amino te hidroksilnih skupina. Zbog toga je polimer pronašao široku primjenu u inženjerstvu tkiva, kao i u liječenju rana gdje protonirane amino skupine polimera privlače negativno nabijene proteine plazme što je praćeno adhezijom i nastajanjem tromba, tj. koagulacijom krvi [1,2]. Protoniranjem $-NH_2$ skupina kitozan postaje polielektrolit, a kada otopina polimera dođe u kontakt s lužinom, uslijed fizikalnog umreženja prelazi u oblik hidrogela [3].

Nadalje, jedna od glavnih primjena kitozana i njegovih derivata temelji se na njihovoj sposobnosti da snažno vežu teške i toksične metalne ione [4]. Kitozan u kiselom mediju ima kationski karakter koji dopušta otapanje polimera i oblikovanje te elektrostatsko privlačenje s anionskim komponentama (što je primijenjeno u procesima adsorpcije). U neutralnom mediju deprotonirane amino skupine omogućavaju keliranje metalnih kationa ili organskih tvari. Ova svojstva koriste se u različitim znanstvenim područjima kao što su obnova metala, koagulacija-flokulacija organskih komponenti, a čisti polimer može se koristiti kao adsorbens u čvrstom stanju za pesticide, lijekove itd. Budući da toplinskom razgradnjom kitozana ne nastaju štetne tvari, kitozan se smatra ekološki prihvatljivijim materijalom u odnosu na konvencionalne sintetičke smole [5]. Uslijed kationske prirode polimera, kitozan se može upotrijebiti i u osjetljivim kolorimetrijskim sensorima za različite analite [6].

U današnje vrijeme, većina istraživanja usmjerena je na primjenu kelata na temelju kitozana s metalnim ionima (pročišćavanje otpadnih voda, industrijski katalizatori, mekani kompozitni materijali itd.), dok je manji dio istraživanja posvećen dizajniranju hidrogelova s hijerarhijskom strukturom. Jaki afinitet između kitozana i metalnih iona vodi prijelazu iz orijentirane (usmjerene) u višeslojnu strukturu, dok slabi afinitet vodi ka kompozitnom gelu s *in situ* nastalim anorganskim česticama [3].

S obzirom na manjak istraživanja utjecaja dvovalentnih metalnih iona na strukturu i svojstva hidrogelova kitozana, ovaj rad usmjeren je na pripremu stabilnih hidrogelova uz pomoć keliranja. Cilj ovog rada je prikazati kako manipulirati strukturom, fizikalnim i

biološkim svojstvima hidrogela kitozana dodatkom dvovalentnih metalnih iona u dozvoljenim granicama toksičnosti. Primjenom vrlo niskih koncentracija prijelaznih metala, bakra i cinka, može se dobiti točno definirana struktura hidrogela kitozana koji potencijalno može poslužiti kao nosač u području tkivnog inženjerstva.

2 OPĆI DIO

2.1 Hidrogel

Gelovi se obično definiraju kao razrijeđeni umreženi sustavi te se u stabilnom stanju dijele prema svojstvu tečenja na slabe i jake. Hidrogelovi su trodimenzijske mreže nastale od sintetskih ili prirodnih polimera koje mogu apsorbirati i zadržati veliku količinu vode. Struktura hidrogela nastaje zbog hidrofilnih skupina ili domena prisutnih u polimernoj mreži nakon hidratacije u vodenoj okolini [7].

Najvažnija svojstva hidrogela su propusnost, kapacitet zadržavanja vode (bubrenje) i biokompatibilnost. Uslijed značajnog sadržaja vode, hidrogelovi imaju stupanj fleksibilnosti sličan onom prirodnih tkiva. To se može dodatno kemijski modificirati promjenom polarnosti, površinskih i mehaničkih svojstava te stupnja bubrenja [7]. Također, svojstvo bubrenja hidrogelova usko je povezano i s mehaničkim svojstvima kao što su modul elastičnosti i modul smicanja [8].

Hidrogelovi mogu reagirati na podražaje iz okoline u kojoj se nalaze. Do promjene volumena i svojstava bubrenja može doći promjenom temperature, pH vrijednosti medija, prisutnosti elektrolita, odnosno električnog polja ili pak svjetlosti [7].

Hidrogelovi mnogih sintetskih i prirodnih polimera proizvode se za primjenu u tkivnom inženjerstvu za oporavak oštećenih tkiva, farmaceutskom i biomedicinskom području. Uslijed visoke sposobnosti apsorpcije vode, biokompatibilnosti, odličnih mehaničkih svojstava i sličnosti s mekim biološkim tkivom, hidrogelovi se mogu koristiti za liječenje rana, kao sustavi za dostavljanje lijekova za kontrolirano i neprestano otpuštanje aktivnih supstanci, u poljoprivredi, transdermalnim sustavima te kao dentalni materijali, implantati, injekcijski polimerni sustavi itd. Prirodni polimeri, posebice polisaharidi kao što su kitozan, pektin, natrijev alginat i škrob, dobro su razvijene matrice za pripremu hidrogelova za različite zahtjeve [7-9]. Do sada je istraženo i razvijeno niz metoda pripreme hidrogelova na temelju prirodnih i sintetskih polimera, a u nastavku će se predstaviti najčešće korištene metode za područje tkivnog inženjerstva.

2.1.1 Injekcijski polimerni sustavi

Injekcijski hidrogelovi imaju mnoge prednosti kao što su oblikovanje u kalupu, veća bioadhezija, manje invazivni postupak ugradnje te mogu pružiti pogodan mikrookoliš za rast i razvoj stanica. Također, imaju mehanička i strukturna svojstva slična mnogim tkivima te

potencijalno mogu oponašati okoliš izvanstanične matrice. U njih mogu biti i inkapsulirane (nano)čestice lijekova, faktori rasta ili bioaktivne komponente koje se mogu kontinuirano otpuštati [9].

Mogućnost injektiranja lijeka ugrađenog u polimer na određeno mjesto te mogućnost polimera da stvara polučvrstu matricu za lijekove ima mnoge prednosti: jednostavnija primjena, lokalizirana dostava (na specifično mjesto), produženo vrijeme dostave lijeka, smanjene doze (uz smanjenje neželjenih nuspojava vezanih uz sustavnu dostavu lijeka) te poboljšana iskustva pacijenta. Zbog toga se sve više proučavaju mnogi *in situ* polimerni sustavi za dostavljanje lijekova [10].

Polučvrsti injekcijski implantatni sustavi podijeljeni su u četiri skupine i to prema mehanizmu postizanja *in vivo (in situ)* očvršćivanja. Prva skupina su plastomerne paste, odnosno polimerni sustavi koji se u tijelo injektiraju u rastaljenom obliku, a hlađenjem na temperaturu tijela prelaze u polučvrsto stanje. Drugu skupinu čine *in situ* umreženi sustavi koji mogu nastati različitim metodama, stvarajući čvrsti polimerni sustav ili gel. To uključuje reakcije umreživanja inicirane toplinom ili apsorpcijom fotona (uz pomoć zračenja), odnosno ionskim interakcijama između malih kationa i polimernih aniona (geliranje posredovano ionima). Injekcijski implantatni sustavi nastali *in situ* taloženjem čine treću skupinu. Taloženje može biti potaknuto uklanjanjem otapala, promjenom temperature ili promjenom pH vrijednosti medija. Zadnja skupina injekcijskih sustava nastaje *in situ* očvršćivanjem organogelova koji su sastavljeni od amfifilnih lipida netopljivih u vodi (bubre u vodenom mediju te daju različite oblike liotropnih tekućih kristala). U tablici 1 dani su primjeri najčešće korištenih komponenata za sustave za dostavu lijekova te su navedeni glavni nedostaci, a u tablici 2 navedeni su načini geliranja te dani primjeri tako dobivenih sustava na temelju kitozana kao polimerne matrice budući da se hidrogelovi na temelju kitozana intenzivno istražuju za različite primjene u dostavljanju enzima, proteina i lijekova [8,10].

Tablica 1. Biorazgradivi sustavi za dostavu lijekova [10].

SUSTAV ZA DOSTAVU LIJEKOVA		NEDOSTATCI	KOMPONENTE	
1.	Plastomerne paste	- visoka temperatura tijekom injektiranja	- PLA, PLGA, PCL - inicijator: alkoholi	
2.	<i>In situ</i> umreženi sustavi^A	<u>Duromeri</u>	- neprihvatljiva količina otpuštene topline tijekom reakcije - naglo otpuštanje lijeka - toksičnost neizreagiranih monomera	- oligomeri: PLA, PDLLA i PCL - inicijator: polioli - sredstvo za očvršćivanje: peroksidi
		<u>Foto-umreženi gelovi</u>	- skupljanje i lomljivost polimera uslijed visokog stupnja umreživanja	- PGA, PLA, PCL, PEG - inicijator: izvor svjetlosti (laser, UV), eozin boja
		<u>Geliranje potaknuto ionima</u>	- kratak rok uporabe - naglo otpuštanje lijeka - dugo vrijeme razgradnje	- alginat s Ca ²⁺ ionima kao gelirajućim agensom
3.	<i>In situ</i> taloženje polimera^{B,C}	<u>Uklanjanjem otapala</u>	- naglo otpuštanje lijeka	
		<u>Taloženjem</u>	- primjena organskih otapala	
		<u>Temperaturno potaknut prijelaz sol – gel</u>	- stabilnost ulja i čistoća voskova	- NIPAAM, PEG, PLA, PLGA i kitozan
4.	Organogelovi	- izostanak podataka o toksičnosti - fazno razdvajanje	- ulje kikirikija, pčelinji vosak	

^A kao katalizator koristi se kositrov 2-etilheksanoat

^B općeniti nedostatak ovih sustava je naglo otpuštanje lijeka

^C komponente koje se koriste su PDLLA, PCL i PLA, a otapala su dimetil-sulfoksid (DMSO) ili *N*-metil-2-pirolidon (NMP)

Tablica 2. Načini geliranja i pripadajući polimerni sustavi na temelju kitozana.

VRSTA GELIRANJA	SUSTAV	REFERENCE
Geliranje fotopolimerizacijom (UV zračenje)	Kitozan/laktoza/azidne skupine	[11]
Ionsko umreživanje (geliranje)	Kitozan/TPP	[12]
Temperaturom potaknuto geliranje	Kitozan/ β -glicerofosfat	[11]
	Kitozan/NaHCO ₃	[13]
	TOCNF/kitozan/glicerofosfat	[14]
Geliranje izazvano promjenom pH vrijednosti medija	Kitozan/gliceril monooleat	[11]
	<i>N</i> -karboksietil kitozan	[15]

Hidrogelovi na bazi kitozana pronašli su veliku primjenu uslijed jedinstvenih svojstava: biorazgradivost, biokompatibilnost i bioaktivnost. Također, kitozanski hidrogelovi predstavljaju jednostavan pristup pripremi suhih materijala kao što su nosači (engl. *scaffold*), za liječenje rana te sredstva za fiksiranje (učvršćivanje) prijeloma kostiju [3]. Jedan od načina pripreme suhih materijala na temelju kitozana je i liofilizacija.

2.1.2 Liofilizacija

Liofilizacija (engl. *lyophilization* ili *freeze-drying*) je ekološki prihvatljiv postupak dobivanja suhih materijala na nano-razini kao što su aerogelovi, viskeri [16] i čestice [17].

Postupak se temelji na uklanjanju vode iz zaleđenog uzorka procesima sublimacije i desorpcije u vakuumu, a može se podijeliti u tri stupnja. Prvi stupanj je zaleđivanje (engl. *freezing, solidification*). Tijekom ovog stupnja dolazi do hlađenja otopine (suspencije) te stvaranja kristala leda otapala. Mali dio vode (otapala) koji ostane u tekućem stanju (ne zaledi se) naziva se vezana voda. Drugi stupanj je primarno sušenje (engl. *primary drying*) koje se temelji na sublimaciji leda iz zaleđenog materijala. Na kraju ovog koraka stvorena je porozna struktura, a pore odgovaraju prostoru gdje je bio led. Treći, završni, stupanj je sekundarno sušenje (engl. *secondary drying*), odnosno desorpcija nezaleđene vode [17].

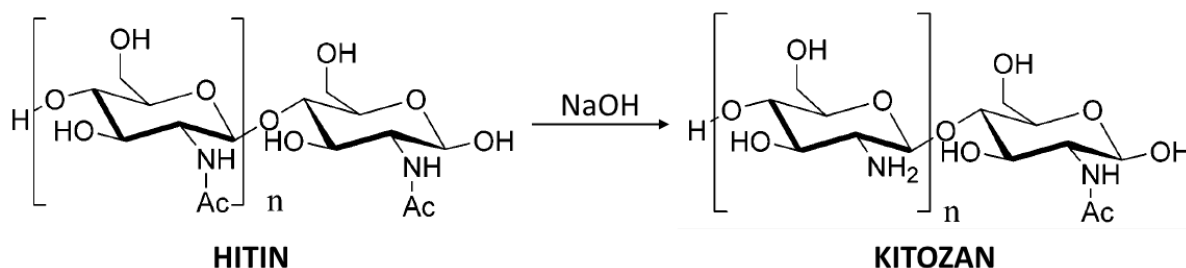
Nedostatak metode je pojava velikih naprezanja tijekom procesa zaleđivanja i sušenja. Također, postupak dobivanja materijala je vremenski (relativno) dugotrajan i skup [17].

Liofilizacija se koristi za poboljšanje stabilnosti različitih farmaceutskih produkata (virusi, peptidi, proteini [18]) te nosača (liposomi, nanočestice, nanoemulzije) [17]. Općenito,

postupak je pogodan za biološke, biokemijske, farmaceutske i prehrambene proizvode koji ne smiju biti izloženi toplini kako bi se uklonila voda iz njihovih struktura, a koja je pogodan medij za razvoj mikroorganizama [19]. Također, ovakav postupak omogućuje pripremu suhih nosača određene strukture i poroznosti koja ostaje stabilna u mokrom okruženju, odnosno u obliku hidrogela.

2.2 Kitozan

Kitozan je prirodni, pozitivno nabijeni polisaharid, monomernih jedinica 2-amino-2-deoksi-D-glukoza međusobno povezanih β -(1 \rightarrow 4) vezama [20] koji se dobiva deacetiliranjem hitina (40 – 50 %-tnom otopinom natrijevog hidroksida; slika 1) [21,22]. Prisutan je u staničnim stijenkama većine gljivičnih biomasa (npr. *Mucorales*), kutikuli insekata i u ljušturama rakova (koji predstavljaju glavni izvor za industrijsku proizvodnju). Topljiv je u razrijeđenim slabim (mravlja, octena, laktidna, jantarna, jabučna kiselina itd. [22]) te nekim razrijeđenim jakim kiselinama (nije topljiv u sumpornoj i fosfornoj kiselini) [5].



Slika 1. Dobivanje kitozana iz hitina [22].

Netoksičan je za stanice sisavaca [22], biokompatibilan i biorazgradivi polimer koji se koristi za biomedicinske primjene kao što su liječenje rana, tkivno inženjerstvo, implantati te u dostavljanju lijekova zahvaljujući biološkoj aktivnosti: antimikrobna, antitumorska i hemostatska aktivnost. Ostala područja primjene kitozana uključuju farmaceutsku i prehrambenu industriju te biotehnologiju. Antimikrobna svojstva omogućuju i primjenu kitozana u zaštiti bilja kao prirodnog dezinficijensa protiv vodenih patogena. Antibakterijska svojstva kitozana temelje se na reakciji polimera sa staničnom stjenkom i membranom mijenjajući njezinu propusnost te izmjenu tvari [20,23]. Osim do sada spomenutih primjena na temelju polikationske prirode, kitozan se još primjenjuje i u pročišćavanju otpadnih voda, keliranju prijelaznih metala, stvaranju koacervata za prihvaćanje stanica te u poljoprivredi za premazivanje sjemena kako bi se poboljšali prinosi [24].

2.2.1 Stupanj deacetilacije i molekulska masa

Stupanj deacetilacije (engl. *degree of deacetylation*, DD) kitozana smatra se važnim svojstvom u određivanju fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava kao što su kristaličnost, hidrofilitnost, razgradnja polimera te sposobnost vezanja bioloških molekula. Definira se kao (jednadžba 1) [25]:

$$DD = \frac{N_{\text{GlcN}}}{N_{\text{GlcN}} + N_{\text{GlcNAc}}} \quad (1)$$

gdje je N_{GlcN} prosječan broj D-glukozaminskih jedinica, a N_{GlcNAc} prosječan broj N-acetilglukozaminskih jedinica. Kao što je već spomenuto, deacetiliranje kitozana može se provesti koristeći otopinu natrijevog hidroksida visoke koncentracije, a konačna vrijednost stupnja deacetilacije kontrolirana je parametrima procesa obrade prirodnog polimera: povećanjem temperature i produženjem vremena reakcije dobiva se veći stupanj deacetiliranog materijala. Stupanj kristalnosti, odnosno uređenost strukture materijala veća je što je stupanj deacetilacije veći. To svojstvo se pripisuje većoj fleksibilnosti polimernih lanaca uslijed manje prisutnosti većih, acetilnih skupina [23].

Molekulska masa polimera prvenstveno ovisi o vrsti iz koje se dobiva (škampi, rakovi, gljivice itd.), kao i mjestu njihovog uzgoja te se može smanjivati u procesu povećanja stupnja deacetilacije. Molekulska masa polimera pokazala se kao važan parametar za kristaličnost i razgradnju polimera te za mehanička svojstva i sadržaj vlage [23].

Ovisno o stupnju deacetilacije i molekulskoj masi polimera, dodatkom metalnih iona mogu se dobiti hidrogelovi definirane strukture. Jedna od potencijalnih metoda pripreme kelata hidrogelova na temelju kitozana je i proces keliranja.

2.2.2 Mehanizmi interakcija između kitozana i metalnih iona

Općeprihvaćeni mehanizmi interakcija između kitozana i metalnih iona su keliranje i elektrostatsko privlačenje. Mehanizmi se temelje na tome da su $-\text{NH}_2$ (amino) skupine glavna reaktivna mjesta za metalne ione, iako sorpciji iona pridonose i $-\text{OH}$ (hidroksilne) skupine (pogotovo na C3 atomu). Ovisno o vrsti metala, pH vrijednosti medija i otopini polimera prevladava određeni mehanizam. Slobodni elektronski par na atomu dušika može vezati metalni kation kada je pH vrijednost medija blizu 7. U suprotnom, protonirana amino skupina ($-\text{NH}_3^+$) u kiselim otopinama polimeru omogućuje da se ponaša kao kation te na taj način privlači metalne anione ili ligande [26].

Kitozan ima vrlo mali afinitet prema alkalijskim i zemnoalkalijskim metalima uslijed izostanka d- i f-orbitala. Međutim, i ti metalni ioni mogu biti sorbirani na derivate kitozana i to kada je fosfatna ili fosfitna skupina cijepljena na polimerni lanac (tzv. ternarni kompleks) [26].

Keliranje

Keliranje ili kompleksiranje (engl. *chelation*) je postupak nastajanja ili postojanja veza (privlačnih interakcija) između dva ili više odvojenih aktivnih mjesta unutar istog liganda i jednog centralnog atoma. Molekulska cjelina u kojoj se odvija keliranje i gdje su prisutne odgovarajuće kemijske vrste, naziva se kelat. Pojam „keliranje“ najčešće je ograničen na postupak s metalnim ionima kao centralnim atomima [27].

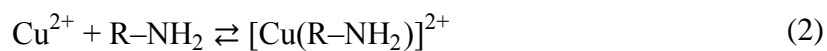
Nastajanje kompleksa kitozan – metal može se opisati Lewisovom kiselo-baznom teorijom. Prema toj teoriji, metalni ioni ponašaju se kao akceptori elektrona. Kad amino skupine nisu protonirane, posjeduju slobodni elektronski par na atomu dušika (elektron-donor) koji može reagirati s tvarima siromašnim elektronima kao što su metali (kationi). Nakon keliranja metalnih iona kitozansom, gustoća pozitivnog naboja povećava se na polimeru čime se povećava broj „mjesta“ za reakcije s (poli)anionima. Zbog toga kelati kitozana i metala imaju veću antimikrobnu aktivnost u usporedbi s „čistim“ polimerom [5,28].

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su bakrovi(II) i cinkovi(II) ioni u procesu keliranja te su na tim primjerima u nastavku teksta navedeni i objašnjeni modeli i pretpostavke vezane za proces keliranja.

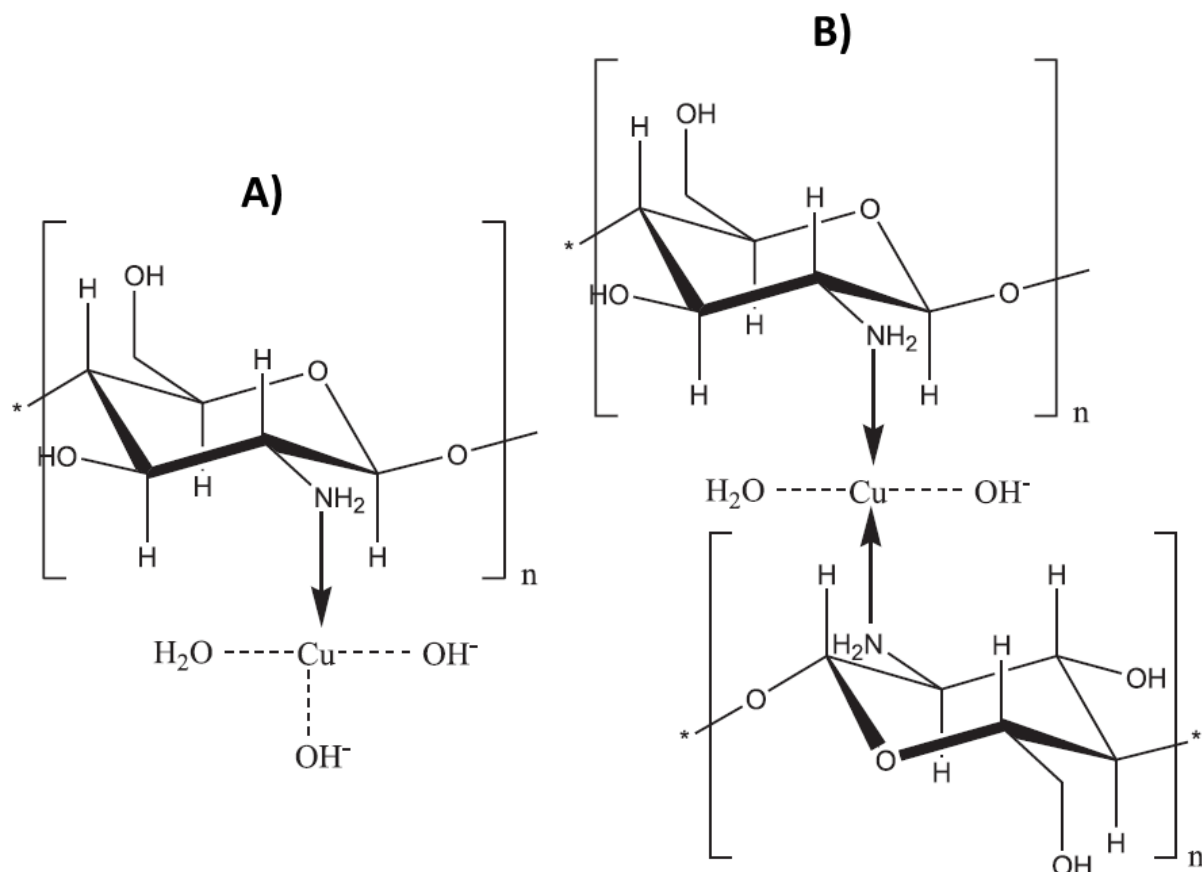
Kelati na temelju kitozana s bakrovim(II) ionima

Najviše istraživanja temeljeno je na keliranju iona bakra kitozansom. Mehanizmi kojima se opisuje keliranje proizlaze iz dvije, kontradiktorne, hipoteze: „model mosta“ (engl. „*bridge model*“) i „model privjeska“ (engl. „*pendant model*“). U „modelu mosta“ metalni ioni vezani su s nekoliko amino skupina istog polimernog lanca ili s različitih lanaca putem inter- i intramolekularnog kompleksiranja. U slučaju „modela privjeska“, metalni ion vezan je za samo jednu amino skupinu, kao privjesak [26].

Na položaj prijelaznih metala tijekom keliranja uglavnom utječe koordinacija s amino skupinama kitozana. Dvije –OH skupine i jedna –NH₂ skupina mogu biti zahvaćene od strane Cu²⁺ iona, dok je četvrto mjesto vjerojatno zauzeto molekulom vode ili s –OH skupinom trećeg ugljikovog atoma. Stoga je pri pH = 5,3 prisutan kelat:

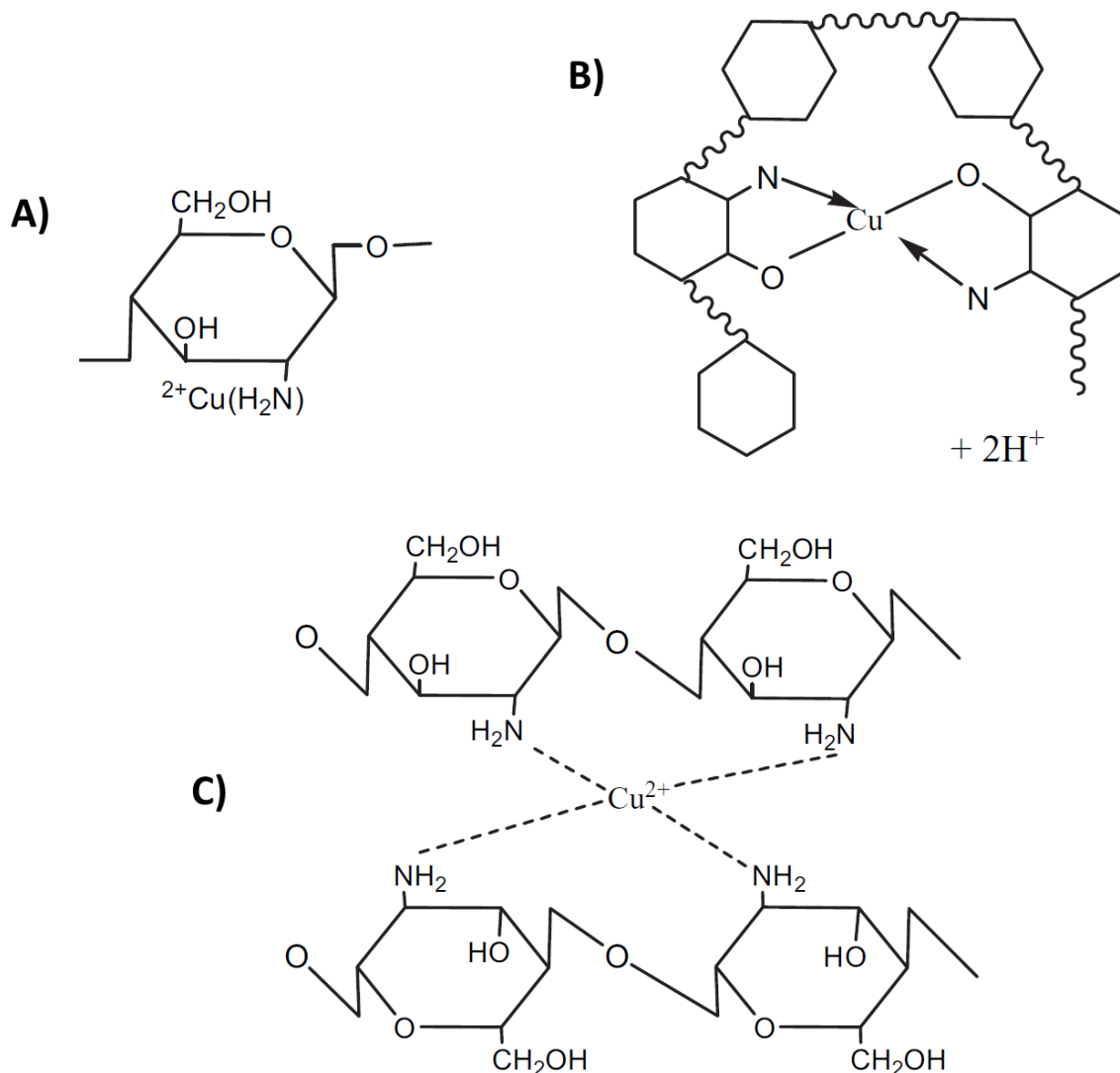


dok kelat $[\text{Cu}(\text{R-NH}_2)_2]^{2+}$ nastaje čim je pH vrijednost medija veća od 5,8 (slika 2) [5,29].



Slika 2. Shematski prikaz kelata kitozan- Cu^{2+} : **A)** $[\text{Cu}(\text{R-NH}_2)]^{2+}$, **B)** $[\text{Cu}(\text{R-NH}_2)_2]^{2+}$ [5].

Koordinacija dvovalentnih (teških) metala s amino skupinama kitozana postiže se u molarnom omjerom 1:1, 1:2 ili 1:4. Na slici 3 prikazane su moguće strukturne formule, odnosno moguće koordinacije bakrovih(II) iona s amino skupinama kitozana [30].

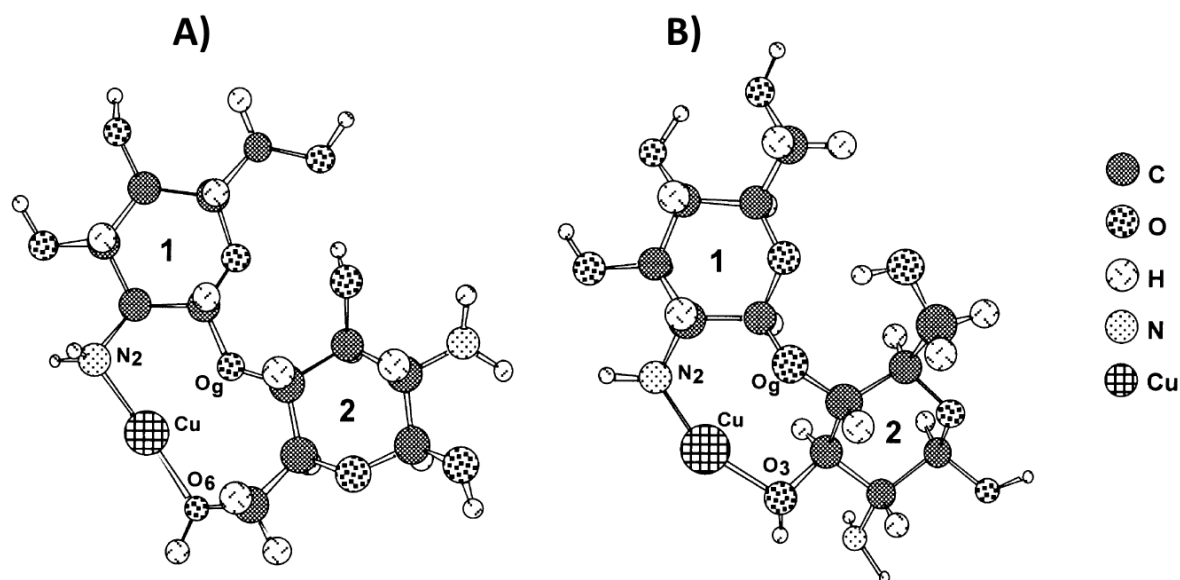


Slika 3. Koordinacija Cu^{2+} iona s $-\text{NH}_2$ skupinama kitozana u molarnom omjeru:

A) 1:1, B) 1:2 i C) 1:4 [30].

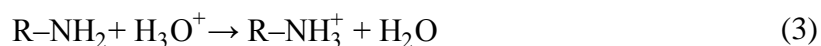
Braier i Jishi [31] uspjeli su primjenom teorije funkcionala gustoće (engl. *density functional theory*, DFT) izračunati duljine veza, odnosno udaljenosti među atomima te su na taj način odredili točnu koordinaciju kelata kitozan – metal. Dobiveni rezultati ukazuju da je bakrov(II) ion smješten u blizini interglikozidnog mosta, odnosno da dolazi do interakcija s atomom kisika iz glikozidnog mosta (O_g). Prema DFT teoriji, dane su dvije strukture (prikazane na slici 4), od kojih struktura A) ima nižu energiju. U strukturi A), atom bakra je 1,87 Å udaljen od atoma dušika (N_2) i atoma kisika (O_6), a 2,24 Å od O_g . Prema tim udaljenostima, autori su zaključili da dolazi do vezanja iona bakra s N_2 i O_6 , te samo do interakcija $\text{Cu}-\text{O}_g$ (bez nastajanja veze). Budući da su koordinacijski kutovi između centralnog bakrovog(II) iona i atoma N_2 i O_6 približno 90° i 180° , predložena je kvadratno

planarna struktura. Zabilježene su i promjene u duljinama veza ugljik – kisik te ugljik – dušik (u odnosu na disaharid kitozana), što upućuje na preraspodjelu pozitivnog naboja kroz divalentni kompleks, kao i prisutnost jakih bakar – dušik i bakar – kisik interakcija. Struktura B) nije planarna uslijed prisutnih steričkih smetnji.



Slika 4. Koordinacija kelata kitozan–Cu²⁺: **A)** interakcije Cu²⁺ s O₆, N₂ i O_g; **B)** interakcije Cu²⁺ s O₃, N₂ i O_g [31].

Nadalje, na položaj metalnih iona utječe i konstanta protoniranja amino skupine ($\log K_p$) koja iznosi 6,3 te je pri pH = 6,9 protonirano više od 20 % amino skupina, odnosno pri pH = 5,0 više od 90 %. Kemijska jednačba protoniranja amino skupine je [29,32]:



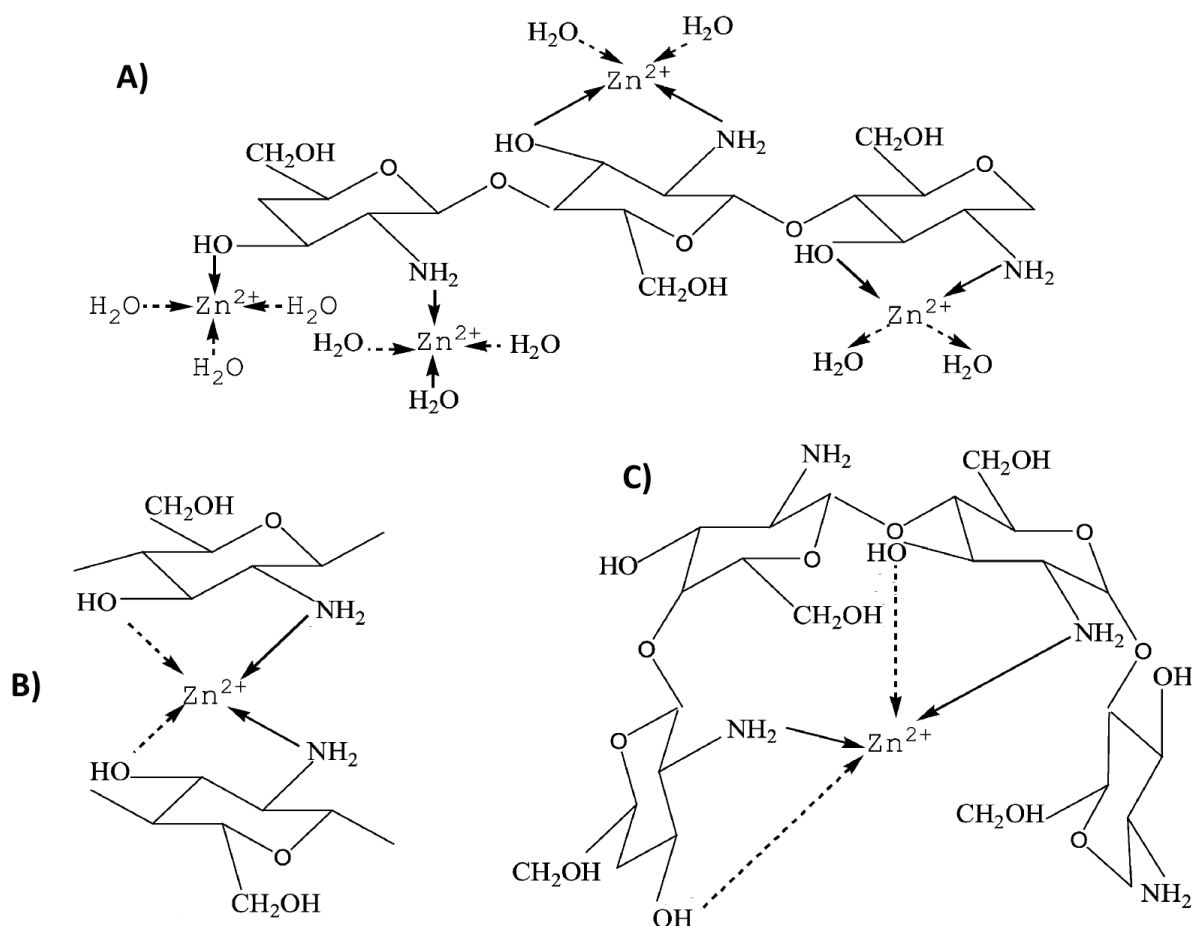
Iako mnogo radova navodi kako hidroksilne skupine sudjeluju u vezanju metala, prema Desbrièresu i Guibalu [5], –OH skupne pomažu samo u stabiliziranju kelata, dok glavno mjesto u vezanju metala pripada amino skupinama. Također, bitnu ulogu u ostvarivanju interakcija između oligomera i Cu²⁺ iona igra i stupanj polimerizacije. Prosječna vrijednost stupnja polimerizacije koja se smatra pragom za uspješno keliranje iznosi 6,5.

Prema istraživanju kojeg su proveli Rhazi i suradnici [33], pretpostavlja se da obje strukture opisane „modelom mosta“ i „modelom privjeska“, postoje istodobno.

Kelati na temelju kitozana s cinkovim(II) ionima

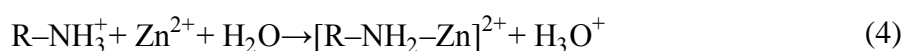
Uz bakar, cink je jedan od metala koji najlakše koordinira s kitozanom. Općenito, ioni cinka imaju prehrambenu značajku važnu za ljudsko zdravlje, a zadnjih godina kelati na temelju kitozana i cinka istražuju se kao lijekovi i hranjive tvari (nutrijenti). Oboje imaju svojstva dezinficijensa i baktericida. Kitozan može atom cinka vezati preko atoma dušika, kisika ili u kombinaciji s oba atoma, pri čemu mogu ostati neki potencijalni donorski atomi slobodni koji povećavaju biološku aktivnost [32].

Cink, koji ima popunjenu d-orbitalu (d^{10}), obično s ligandima tvori tetraedre. Kao i kod kelata na temelju kitozana s bakrom, i za kelate kitozan- Zn^{2+} pretpostavljeno je više različitih molekulskih struktura, ovisno o molarnom omjeru amino skupina i metala. Modeli se također mogu podijeliti na „model privjeska“ gdje je metalni ion vezan na jedan atom dušika (jedna amino skupina), te „model mosta“ gdje je metalni ion vezan na jednu ili više amino i hidroksilnih skupina [32]. Molekulske strukture kelata kitozan – cink za različite molarne omjere prikazane su na slici 5.



Slika 5. Predložene molekulske strukture kelata kitozan–Zn²⁺ za molarni omjer **A)** veći od 1:1, te manji od 1:1 za povezivanje **B)** dva različita lanca, te **C)** istog polimernog lanca [32].

Nadalje, pronađeno je da se pH vrijednost medija smanjuje tijekom procesa keliranja i to brže za kelate s većim sadržajem cinka (isto kao i kod kelata na temelju kitozana s bakrovim(II) ionima). Wang i suradnici [32] objasnili su to na temelju Lewisove kiselo-bazne teorije: cinkovi(II) ioni ponašaju se kao kiselina (akceptor za elektronski par), a kitozan kao baza (elektron-donor). Kemijske jednadžbe koje odgovaraju danoj teoriji su jednadžba 3 (koja odgovara protoniranju amino skuine) i jednadžba 4:



Metode analiza strukture kitozan – metal

Određivanje strukture kelata, odnosno mehanizma interakcija između kitozana i metalnih iona, provodi se primjenom nuklearne magnetske rezonancije (¹³C NMR), pretražnog elektronskog mikroskopa (SEM), diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC), termogravimetrijske analize (TGA), energijski disperzivne rendgenske analize (EDX),

rendgenske fotoelektronske spektroskopije (XPS), ultraljubičaste-vidljive (UV-Vis) spektrofotometrije, intra-crvene spektrometrije (IR), Mössbauerove spektroskopije, masene spektroskopije s elektroraspršenjem, potenciometrije te titracijske kalorimetrije [4,26].

Općenito, određivanje nastale veze između kitozana i metala može biti indirektno i direktno. Indirektnim metodama smatraju se atomska apsorpcijska spektroskopija (AAS), titracije s etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA) itd., dok se direktno određivanje veze metalnog iona s polimerom provodi razgradnjom metalnog kompleksa u koncentriranoj dušičnoj kiselini te mjerenjem koncentracije primjenom AAS-e [4].

Elektrostatsko privlačenje

Elektrostatsko privlačenje (engl. *ion exchange* ili *electrostatic attraction*) kitozana i metalnih iona ovisi prvenstveno o pK_p polimera koji je kontroliran stupnjem deacetilacije i gustoćom naboja. Također, kiselo-bazna svojstva kitozana ovise i o stupnju disocijacije. U literaturi se navodi kako pK_p značajno varira ovisno o parametrima: 6,3 – 7,2 za potpunu disocijaciju, tj. da se pK_p povećava kako se stupanj disocijacije smanjuje. Nadalje, optimalna vrijednost pH medija za ovaj mehanizam interakcija je između 2 i 4. U jako kiselom mediju (pH vrijednost niža od 2 – 3), sorpcija metalnih aniona može biti značajno smanjena zbog konkuriranja više aniona za protonirane amino skupine [5,26].

Svojstvo elektrostatskog privlačenja može se iskoristiti pri geliranju kitozana. Za to se najčešće koriste poli(okso-anioni) i poli(fosfatni-anioni) zbog vrlo učinkovitog stvaranja veza s amino skupinama jednog ili više polimernih lanaca [26].

Adsorpcija

Adsorpcija je posljedica specifičnih interakcija između tvari koja se adsorbira (adsorbat) i tvari na koju se adsorbira (adsorbens). Interakcije značajno ovise o kemijskoj strukturi. Kod kitozana, funkcionalne skupine odgovorne za stvaranje interakcija su hidroksilne i amino skupine. Uslijed mogućnosti protoniranja amino skupina, polimer je polikationske prirode što omogućava elektrostatske interakcije s anionskim komponentama (npr. ionske boje) koje neutraliziraju naboj [5].

Kako Vasconcelos i suradnici [34] navode, kitozan ima kapacitet vezanja toksičnih metala veći od 1 mmol/g što je znatno više za neke metale u odnosu na sposobnost vezanja aktivnog ugljena. Sposobnost adsorpcije metala ovisi o izvoru kitozana, stupnju deacetilacije, prirodi metalnog iona i pH vrijednosti medija.

Kao što je već spomenuto, kitozan posjeduje antibakterijska svojstva koja se dodatkom dvovalentnih metalnih iona (bakra i cinka) mogu dodatno poboljšati. Detaljnije o mehanizmima djelovanja polimera na stanice mikroorganizama, kao i utjecaju keliranja, molekulske mase i stupnja deacetilacije na antimikrobnu aktivnost kitozana, dano je u nastavku.

2.2.3 Antimikrobna aktivnost

Kitozan pokazuje antimikrobnu aktivnost jedino u kiselom mediju. Pri niskim pH vrijednostima, kitozan ima mnogo protoniranih amino skupina (polikationske skupine) koje mogu reagirati s negativno nabijenim supstancama na površini stanice kao što su proteini, fosfolipidi i masne kiseline. Time nastaju polielektroliti pa se na taj način inhibira rast mikroorganizma [28].

Mikrobna aktivnost kitozana opisuje se djelovanjem različitih mehanizama. Prema literaturi predložena su tri mehanizma.

Prvi mehanizam temelji se na polikationskom kitozanu koji ostvaruje interakcije s negativno nabijenom površinom stanične membrane mijenjajući njezinu propusnost. Protonirane amino skupine kitozana mogu ostvariti interakcije s anionskim komponentama kao što su lipopolisaharidi, fosfolipidi te bakterijski površinski proteini, a elektrostatske interakcije između membrane i polimera odvijaju se u dva stupnja. U prvom stupnju dolazi do odvajanja stanične stijenke od stanične membrane, a u drugom do razaranja membrane. Kao primjer mehanizma može se navesti inhibiranje fermentacije pekarskog kvasca određenim kationima kao što su kationi anilina i D-glukozamina koji djeluju na površini kvasca sprječavajući ulazak glukoze (na površini stanice tvore polimernu membranu čime se sprječava ulazak hranjivih tvari u stanicu) [21, 24,35,36].

Drugi mehanizam temelji se na vezanju kitozana s DNA te inhibiranju sinteze proteina i glasničke ribonukleinske kiseline (mRNA). Pretpostavlja se da kada je kitozan oslobođen iz stanične stijenke gljivičnog patogena od strane hidrolitičkog enzima biljnog domaćina, „oslobođeni“ kitozan prodire u jezgru patogena te reagira s mRNA. Organizam može biti oslabljen djelovanjem „svog“ kitozana ili fitoaleksina domaćina izazvanog oslobodenjem kitozana [24,35]. Mnogi autori [32,36] također napominju da samo kitozan niže molekulske mase može ući u stanicu, tj. da veće makromolekule ne mogu proći kroz vanjsku membranu budući da ona djeluje kao učinkovita barijera za velike molekule.

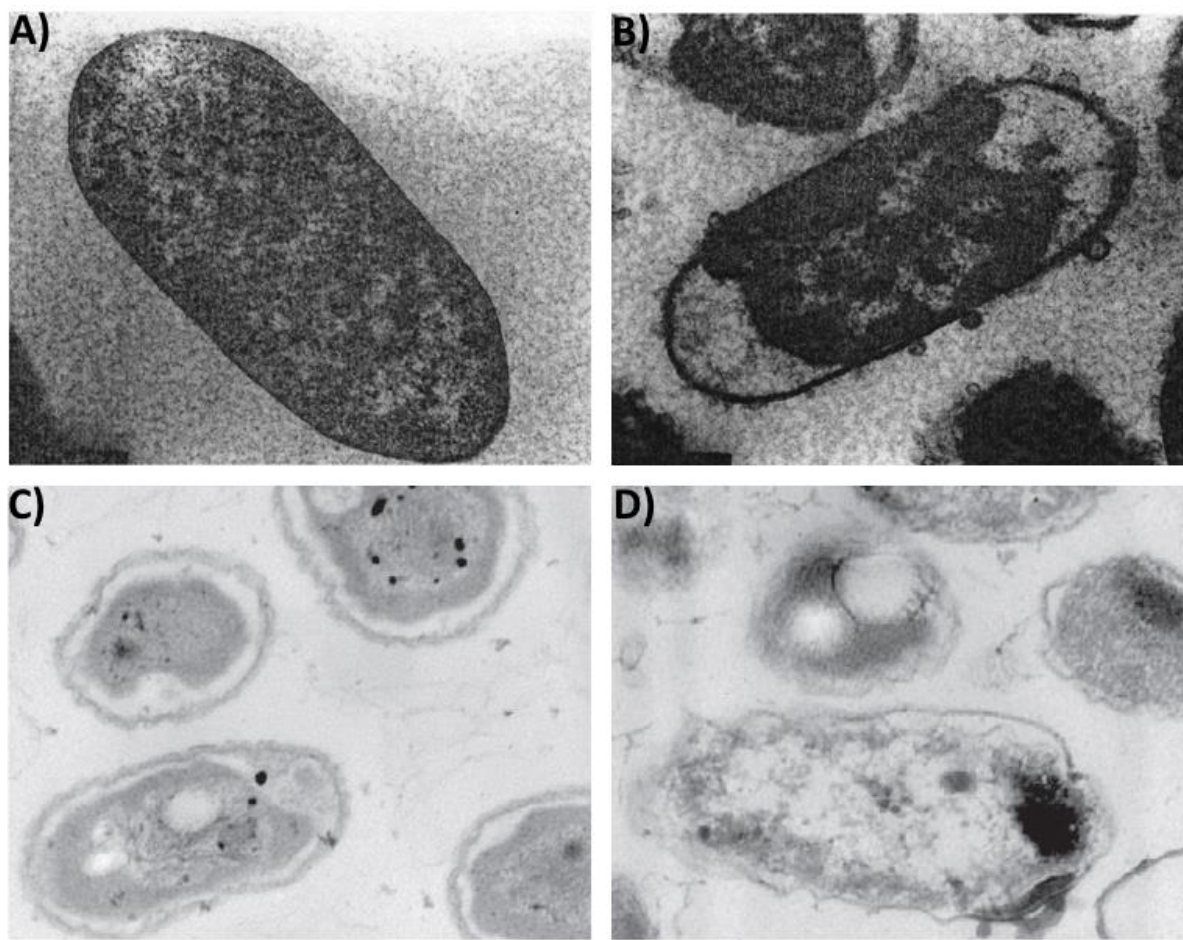
Treći mehanizam temelji se na svojstvu stvaranja kelata kitozan – metal koji dovodi do nedostupnosti metala u tragovima za rast mikroba i proizvodnju toksina [35]. Kako je već

opisano, pozitivni naboj amino skupine na drugom ugljikovom atomu rezultira polikationskom strukturom koja može ostvariti interakcije s anionskim komponentama (lipopolisaharidi, proteini) na površini mikroorganizama. Te interakcije rezultiraju velikom promjenom strukture vanjske membrane što uzrokuje oslobađanje većeg dijela proteinskog materijala iz stanice. Keliranje cinka kitozonom, pojačava pozitivni naboj na amino skupinama, a kao rezultat omogućene su lakše interakcije nastalog kelata s anionskim komponentama na površini stanice. Na taj način poboljšava se inhibitoriska aktivnost polimera [32].

Antimikrobna aktivnost kitozana raste porastom koncentracije polimera, a utvrđeno je da 1 %-tna otopina polimera ima 100 %-tni učinak i za gram-pozitivne i za gram-negativne bakterije. Također, antimikrobna aktivnost je poboljšana smanjenjem molekulske mase polimera za gram-negativne bakterije, dok za gram-pozitivne bakterije raste uz njen porast [21, 36]. Također, veća antibakterijska aktivnost postiže se otapanjem polimera u organskim kiselinama (sa što manjim brojem ugljikovih atoma) u odnosu na anorganske kiseline [37].

Kod gram-pozitivnih bakterija dolazi do vezanja kitozana na teihonsku kiselinu čime se ekstrahiraju lipidi iz membrane, a kod gram-negativnih bakterija kitozan uništava lipopolisaharide što pak dovodi do povećanja propusnosti membrane [35]. Nadalje, uslijed prisutnosti većeg negativnog naboja na površini gram-negativnih bakterija (u odnosu na gram-pozitivne), veća količina polimera adsorbira se na staničnu membranu bakterija te su veće promjene njezine strukture i propusnosti unutarstaničnih tvari (proteina, nukleinskih kiselina, citoplazme itd.) u okolinu. Oba efekta vode ka smrti stanice bakterije, a pri tome ne dolazi do povećanja otpornosti bakterija na djelovanje kitozana [20, 21].

Mikrografije snimljene pomoću transmisijskog elektronskog mikroskopa (slika 6) prikazuju utjecaj kitozana na gram-negativne bakterije: *Escherihia coli* i *Burkholderia pseudomallei*. Na slikama 6A i 6C je prikaz bakterija prije reakcije s kitozonom, a na slikama 6B i 6D nakon djelovanja, tj. adsorpcije polimera.



Slika 6. TEM mikrografije gram-negativnih bakterija:
Escherichia coli **A)** prije i **B)** nakon adsorpcije kitozana [20];
Burkholderia pseudomallei **C)** prije i **D)** nakon adsorpcije kitozana [21].

Provode se mnoga istraživanja kako bi se dodatno poboljšala antimikrobna svojstva kitozana: od strukturne modifikacije polimera do stvaranja kompleksa s drugim antimikrobnim tvarima. Općepoznato je da metali kao što su srebro, bakar i cink tvore skupinu antimikrobnih agensa tj. terapijskih metalnih iona. Budući da je kitozan jak kelatni agens, on lako tvori komplekse upravo s tim metalima. Prednost kelatnih materijala na temelju kitozana je to što se na taj način smanjuje toksičnost uslijed vezanja teških metala. Bolja antimikrobna svojstva kelata kitozan – metal postižu se kada je prisutna veća koncentracija metalnih iona (jače vezanje), a sami terapijski metalni ioni imaju pozitivan utjecaj na obnovu tkiva u interakciji s ciljanim stanicama sisavaca, dok inhibiraju rast prokariota [28,38].

Stupanj deacetilacije i molekulska masa utječu i na antimikrobna svojstva kitozana. Tako je dokazano da pri istim eksperimentalnim uvjetima, veći antimikrobni efekt imaju

kelati kitozan – metal kod kojih je kitozan imao veći stupanj deacetilacije. To se može pripisati prisutnosti većeg broja amino skupina, odnosno većoj gustoći pozitivnog naboja što omogućava lakše reakcije s tvarima iz membrana mikroorganizama te inhibiranje njihovog daljnjeg rasta. Što se tiče utjecaja molekulske mase polimera na antimikrobna svojstva, dokazano je da povećanjem molekulske mase raste antimikrobna aktivnost kelata kitozan-Cu²⁺. Također je dokazano i za oligomere kitozana (čija je molekulska masa manja od 10 kDa) da inhibiraju rast gram-pozitivnih bakterija, ali je inhibicija nešto slabija u odnosu na inhibiranje polimerom [28].

Općenito, jače interakcije s kitozanom imaju bakrovi(II) ioni u odnosu na cinkove(II) ione zbog manjeg radijusa i zbog mogućnosti primanja 4s elektrona. Zbog toga nastali kelati kitozan-Cu²⁺ pokazuju veću antimikrobnu aktivnost, a koja je kao i kod kelata kitozan-Zn²⁺, bolja u odnosu na antigljivična svojstva [28,32]. Također, budući da srebro nije prirodno prisutno u ljudskom tijelu, veću prednost u primjeni imaju kelati na temelju kitozana s bakrovim ili cinkovim onima (u odnosu na kelate kitozan-Ag⁺) [38].

2.2.4 Citotoksičnost materijala na temelju kitozana i metalnih iona

Glavni zahtjev za bilo koju tvar da bi se mogla koristiti kao terapijski agens je da ne smije utjecati na vijabilnost (preživljavanje, životnu aktivnost) stanica sisavaca. Citotoksičnost, u ovom radu, ispituje se primjenom MTT testa koji se temelji na činjenici da metabolički aktivne stanice pretvaraju žuti 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid (MTT) u ljubičasti formazan. Intenzitet boje (pri 570 nm) direktno je proporcionalan broju živih stanica. Prednost metode je što detektira samo žive stanice te je dobiveni signal ovisan o stupnju njihove aktivnosti. Osim citotoksičnosti, metoda se može koristiti i za mjerenje proliferacije te aktivnosti stanica. Također, glavnim prednostima smatraju se brzina i preciznost metode [39-41].

Kako se u literaturi navodi [38], uzorci koji imaju vrijednosti vijabilnosti manje od 50 % (u odnosu na negativnu kontrolu) smatraju se citotoksičnima.

Općenito, kitozan i njegovi derivati imaju nisku (nikakvu) citotoksičnost za stanice sisavaca [42]. S druge pak strane, bakrovi kompleksi pokazali su visoku toksičnost što im sprječava medicinsku primjenu (npr. kao antitumorskog agensa). Stoga se mnoga istraživanja temelje na sintezi kompleksa kitozan – bakar u različitim omjerima kako bi se odredio idealni omjer te smanjila toksičnost metala [43]. Također je poznato da cink potiče proliferaciju osteoblasta i inhibira diferencijaciju osteoklasta, a u istraživanju kojeg su proveli Tripathi i

suradnici [44], indirektnom MTT analizom dokazana je i netoksičnost biokompozitnog nosača kitozan/nanohidroksiapatit s nanočesticama legure Cu-Zn.

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Materijali

U ovom radu korištene su dvije vrste kitozana:

- Kitozan srednje molekulske mase, C1 ($M_W = 190\ 000 - 210\ 000\ \text{g mol}^{-1}$, DD > 75 %; Sigma),
- Kitozan više molekulske mase, C2 ($M_W = 310\ 000 - 375\ 000\ \text{g mol}^{-1}$, DD > 75 %; Sigma).

Za pripremu otopina kitozana korištena je octena kiselina, CH_3COOH (HAc, $\geq 99,8\%$; Sigma-Aldrich). Tijekom postupka *in situ* keliranja korišteni su natrijev hidroksid, NaOH (Gram-Mol d.o.o.), te amonijak, NH_3 (28 %; BDH Prolabo).

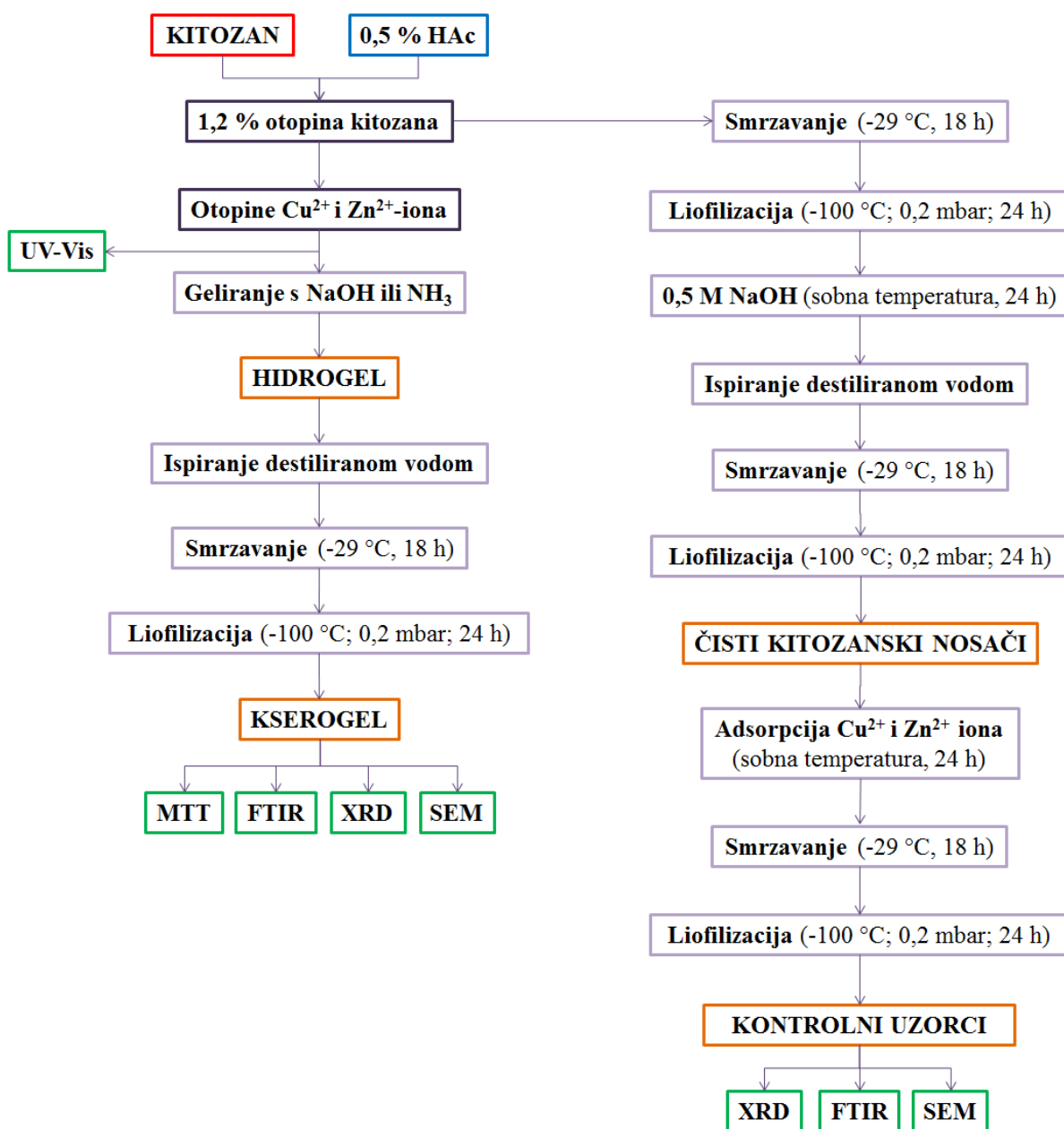
Korištene soli za dobivanje otopina Cu^{2+} i Zn^{2+} iona za postupke *in situ* keliranja te kontrolne uzorke su:

- Bakrov acetat monohidrat, $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times \text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+} ; Carlo Erba Reagents),
- Cinkov acetat dihidrat, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\ \text{H}_2\text{O}$ (Zn^{2+} ; Honeywell).

Svi korišteni reagensi su analitičkog stupanja čistoće.

3.2 Priprema hidrogelova, kserogelova i kontrolnih uzoraka

Shematski prikaz tijeka pripreme uzoraka hidrogela i suhog materijala (kserogela), kao i kontrolnih uzoraka te provedenih analiza dan je na slici 7.



Slika 7. Shematski prikaz tijeka pripreme uzoraka te provedenih analiza.

3.2.1 Postupak *in situ* keliranja metalnih iona kitozanom

Prašak kitozana otopljen je u 0,5 %-tnoj otopini octene kiseline čime je dobivena 1,2 %-tna otopina polimera koja je potom filtrirana pomoću Büchnerovog lijevka. Tako dobivena otopina kitozana (C1 i C2) korištena je u daljnjim postupcima *in situ* keliranja Cu^{2+} i Zn^{2+} iona kitozanom, uz geliranje potpomognuto vodenom otopinom natrijeva hidroksida, odnosno amonijakom.

Različite koncentracije bakrovih(II), odnosno cinkovih(II) iona dodane su otopini kitozana uz snažno miješanje. Konačna koncentracija metalnih iona u otopini kompleksa

iznosila je 0,5; 1; 3; 5; 7, 10 i 12 mmol dm⁻³, što odgovara rasponu molarnih odnosa $n(M^{2+}) : n(-NH_2)$ od 0,009 : 1 do 0,217 : 1. Volumni odnos otopina kitozana/metalnih iona određen je na 7,3 što je dalo približnu koncentraciju kitozana u konačnoj otopini kompleksa od 1 %.

Zbog karakterizacije materijala kitozan – metalni ion pripremljene su i čiste otopine polimera (bez dodatka metalnih iona) te podvrgnute postupku geliranja s NaOH ili NH₃.

In situ keliranje uz geliranje amonijakom

Postupak *in situ* keliranja uz geliranje amonijakom proveden je u staklenoj posudi s poklopcem u zasićenoj atmosferi amonijaka. Pripremljene otopine kompleksa kitozana i metalnih iona stavljene su u mikrotitarske pločice (engl. *24-well plate*, BD Bioscience). Nakon toga je u staklenu posudu stavljen amonijak te je posuda zatvorena. Postupak je proveden tijekom 24 sata pri sobnoj temperaturi. Nakon toga uzorci hidrogelova kitozan–Cu²⁺/Zn²⁺ ispirani su destiliranom vodom tijekom 72 sata, smrznuti te liofilizirani.

In situ keliranje uz geliranje natrijevim hidroksidom

In situ keliranje Cu²⁺ i Zn²⁺ iona kitozanom uz geliranje natrijevim hidroksidom provedeno je u staklenoj posudi bez poklopca. Pripremljene otopine polimera s metalnim ionima stavljene su u mikrotitarske pločice. Zatim je pažljivo dodana 10 %-tna vodena otopina NaOH (dodani volumen znatno veći od volumena kelata kako bi se koncentracija OH⁻ iona mogla smatrati konstantnom), te je postupak geliranja praćen tijekom 24 sata. Nakon toga su uzorci hidrogela kitozan–Cu²⁺/Zn²⁺ ispirani destiliranom vodom tijekom 72 sata, smrznuti i liofilizirani.

3.2.2 Priprema kontrolnih uzoraka

Kontrolni uzorci pripremljeni su adsorpcijom Cu²⁺ i Zn²⁺ iona na već pripravljene porozne strukture kitozana (nosače). Porozne strukture dobivene su primjenom metode toplinski inducirane fazne separacije (liofilizacije).

Pripremljena 1,2 %-tna otopina kitozana smrznuta je u mikrotitarskim pločicama pri -29 °C tijekom 18 sati. Smrznuti uzorci potom su izloženi postupku liofilizacije (pri temperaturi -100 °C i tlaku 0,2 mbar) idućih 24 sata, nakon čega su uronjeni u 0,5 mol dm⁻³ otopinu NaOH naredna 24 sata. Potom su isprani destiliranom vodom, smrznuti te ponovno liofilizirani čime su dobivene konačne porozne strukture.

Zatim su pripremljene otopine Cu^{2+} i Zn^{2+} iona koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ otapanjem soli (bakrov acetat monohidrat i cinkov acetat dihidrat) u destiliranoj vodi.

Pripremljeni kitozanski nosači (C1 i C2) uronjeni su u otopine metalnih dvovalentnih iona tijekom 24 sata pri sobnoj temperaturi uz 100 okr/min. Uzorci su potom izvađeni iz medija, zaleđeni, liofilizirani te karakterizirani primjenom XRD-a, FTIR-a i SEM-a. Dio uzoraka prije zaleđivanja ispiran je u destiliranoj vodi tijekom 72 sata. Sva mjerenja provedena su u triplikatima, a promjene pH vrijednosti medija prije i nakon adsorpcije bile su neznatne.

3.3 Metode karakterizacije

3.3.1 Mjerenje pH vrijednosti medija

pH vrijednosti pripremljenih otopina prije i nakon analiza određene su pomoću pH-metra Schott CG 842 uz staklenu elektrodu BlueLine 14 s preciznošću od 0,01 i mogućnosti mjerenja temperature *in situ*.

3.3.2 Ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija

Primjenom ultraljubičaste-vidljive (UV-Vis) spektroskopije snimljeni su apsorpcijski spektri otopina kompleksa kitozan – metalni ion u rasponu od 200 do 800 nm. Korišten je Varian Cary 1E UV-Visible Spectrophotometer i kvarcne kivete širine 1 cm. Mjerenja su provedena pri sobnoj temperaturi.

3.3.3 Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama i difuzna refleksija infracrvenog zračenja

Infracrvena spektroskopska analiza s Fourierovim transformacijama (FTIR) i difuzna refleksija infracrvenog zračenja (DRIFT) korištene su za identifikaciju ispitivanih uzoraka te određivanje stupnja deacetilacije prašaka kitozana te poroznih struktura. Analize su provedene pomoću instrumenta Bruker Vertex 70. Raspon mjernog područja je od 4000 do 600 cm^{-1} , a snimanje je provedeno 24 puta pri zadanom apsorpcijskom režimu uz rezoluciju od 4 cm^{-1} i temperaturu od $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Za DRIFT analizu uzorci praška kitozana pomiješani su s kalijevim bromidom (KBr) tako da je udio ispitivanog uzorka u smjesi iznosio 5 %.

3.3.4 Rendgenska difrakcijska analiza

Kristalnost i sastav ispitivanih uzoraka analizirani su primjenom kvalitativne rendgenske difrakcijske analize (XRD) koristeći Shimadzu XRD-6000 uz $\text{Cu}_{K\alpha}$ zračenje. Mjerni raspon kutova, 2θ , iznosio je od $5 - 70^\circ$, a brzina snimanja $0,2^\circ/\text{s}$.

3.3.5 Pretražna elektronska mikroskopija

Primjenom pretražnog elektronskog mikroskopa (SEM) snimana je mikrostruktura ispitivanih uzoraka za što je korišten mikroskop TESCAN Vega3SEM Easyprobe, energije elektronskog snopa 10 keV.

Prije snimanja uzorci su izloženi utjecaju plazme paladija i zlata 120 sekundi.

3.4 Citotoksičnost kserogela kitozan – metalni ion

Analiza citotoksičnosti ispitana je na ljudskim embrionalnim stanicama HEK293, ekstraktom kserogela namakanog u biološkom mediju. Analiza je provedena u triplikatima. Prethodno etanolom sterilizirani uzorci materijala isprani su dva puta sterilnom otopinom fosfatnog pufera (PBS). Potom, uzorci s koncentracijom 1 mg/mL namakani su tijekom 48 sati u biološkom mediju (DMEM, engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) nadopunjenim s 10 % goveđeg seruma i 1 % penicilina/streptomicina pri temperaturi od 4°C . Dobiveni ekstrakt korišten je za hranjenje stanica.

U međuvremenu, HEK293 stanice nasađene su u mikrotitarskoj pločici s 96 bunarića u gustoći od 3×10^3 stanica/bunarić te hranjene DMEM medijem nadopunjenim s 10 % goveđeg seruma i 1 % penicilina/streptomicina u atmosferi zraka s 5 % CO_2 pri 37°C .

Nakon 48 sati inkubacije, medij je zamijenjen s ekstraktom materijala te su stanice inkubirane naredna 24 i 48 h u atmosferi zraka s 5 % CO_2 pri 37°C . Nakon određenog vremena, medij je uklonjen te je dodano 200 mL MTT boje (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol bromid) (Sigma-Aldrich, SAD) u svaki bunarić s koncentracijom od 0,5 mg/mL. Nakon 4 sata inkubacije pri 37°C , MTT je uklonjen te su kristali nastalog formazana otopljeni dodatkom 170 mL DMSO po bunariću. Nakon 1 sata pri sobnoj temperaturi, 100 mL otopine prebačeno je u čistu mikrotitarsku pločicu te je mjerenje provedeno na čitaču mikrotitarskih pločica ThermoLabSystems MultiskanEX Microplate Reader pri valnoj duljini od 570 nm. Kao negativna kontrola citotoksičnosti uzet je standardni biološki medij te je vijabilnost stanica izračunata u odnosu na netretirane stanice.

3.5 Statistička obrada podataka

Rezultati mjerenja prikazani su kao srednja vrijednost korigirana sa standardnim odstupanjem ($n = 3$). Za provedbu statističke obrade podataka korištena je ANOVA analiza uz značajnu razliku $p < 0,05$.

4 REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu pripremljeni su hidrogelovi na temelju kelata kitozan – dvovalentni metalni ion. Otopine kelata podvrgnute su UV-Vis spektroskopskoj analizi, dok su dobiveni hidrogelovi postupkom liofilizacije prevedeni u kserogelove (nosače). Dobiveni nosači okarakterizirani su infracrvenom spektroskopskom analizom s Fourierovim transformacijama (FTIR) i kvalitativnom rendgenskom difrakcijskom analizom (XRD). Stupanj deacetilacije početnih prašaka kitozana srednje (C1) i visoke (C2) molekulske mase određen je primjenom difuzne refleksije infracrvenog zračenja (DRIFT analize). Morfologija i mikrostruktura svih uzoraka istražena je pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa (SEM), dok je citotoksičnost materijala ispitana MTT testom.

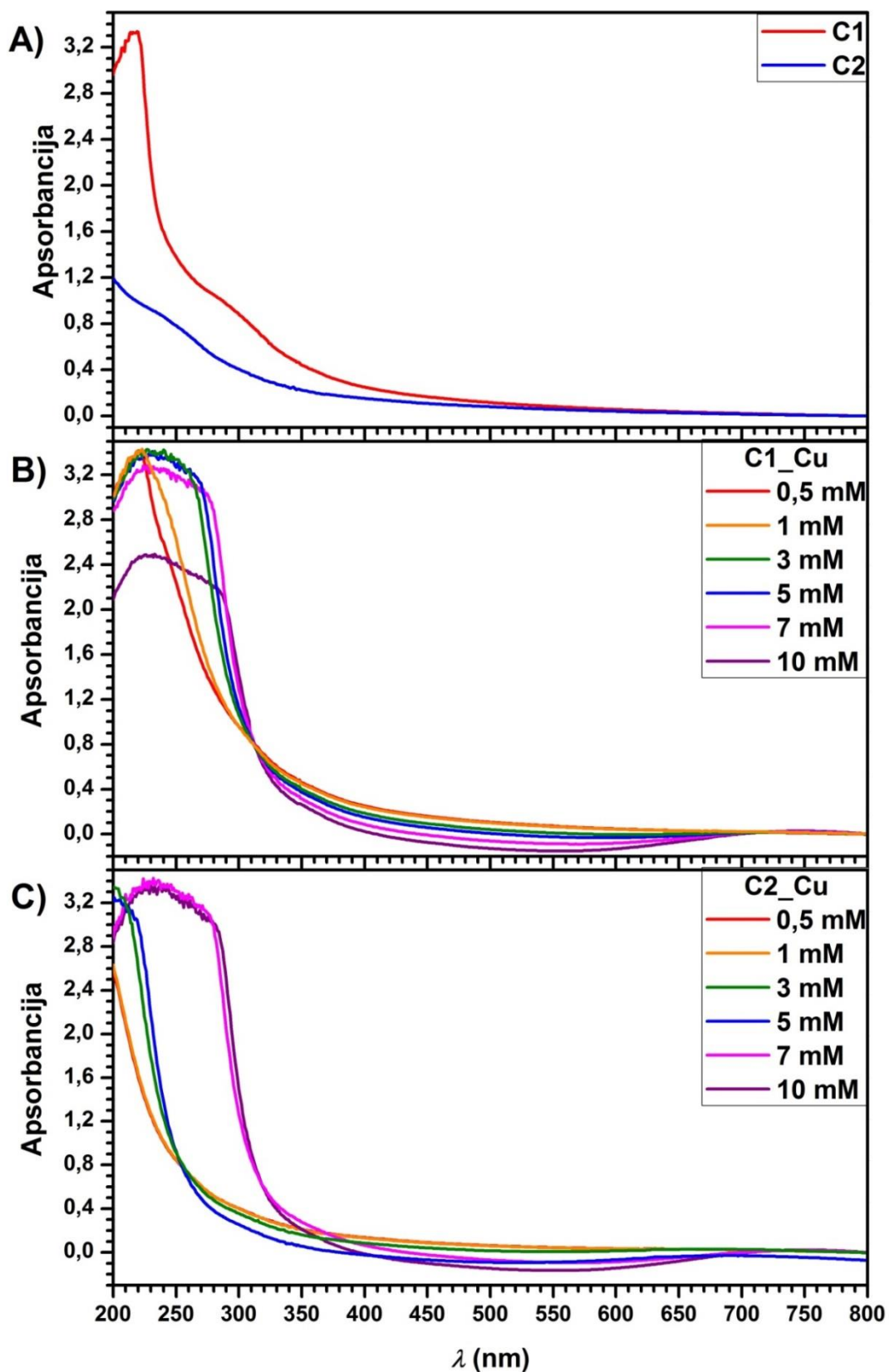
4.1 UV-Vis spektroskopija

Ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija korištena je kako bi se ukazalo na stvaranje kelata kitozan – metalni ion, odnosno kako bi se uočile promjene elektronske strukture polimera dodatkom metalnih iona. Na slici 8 prikazani su dobiveni spektri za otopine kitozana srednje (C1) i visoke (C2) molekulske mase, te otopine kelata polimera s različitim koncentracijama bakrovih(II) iona.

Za polimernu otopinu srednje molekulske mase (C1) zabilježena je apsorpcijska vrpca pri 216 nm, koja se dodatkom bakrovih(II) iona proširila te maksimum vrpce pomaknuo na 238 nm. Za kitozan visoke molekulske mase (C2) maksimum pri 216 nm nije zabilježen, ali također dodatkom metalnih iona dolazi do pojave široke vrpce na 232 nm. Kod uzoraka C1 s dodatkom Cu^{2+} iona vidljivo je da porastom koncentracije metalnih iona u otopini polimera dolazi do smanjenja apsorpcije, za razliku od kelata C2-Cu^{2+} gdje su one podjednake. Prema literaturnim podacima [33], za pH vrijednosti medija između 5 i 5,8 na valnoj duljini od 257 nm prisutna je široka apsorpcijska vrpca koja se tumači kao prijelaz prijenosa naboja (engl. *charge transfer transition*, CT) između elektronskog sustava polimera i centra (jezgre) Cu^{2+} iona. Taj CT prijelaz od liganda prema metalu podupire $d - d$ prijelaz, a dolazi od doprinosa kelata $[\text{Cu}(-\text{NH}_2)]^{2+}$ prisutnih u otopini pri toj pH vrijednosti. Za pH vrijednosti medija koje su veće od 5,8 navodi se pojava dvaju vrpca (na 246 nm i 270 nm), što se objašnjava djelovanjem još jednog atoma dušika, druge amino skupine. U tom slučaju pretpostavlja se prisutnost kelata u obliku $[\text{Cu}(-\text{NH}_2)_2]^{2+}$. Pomak vrpca u ovom istraživanju u odnosu na literaturne podatke može biti uslijed značajnije razlike u stupnju deacetilacije

ispitivanih polimera (u literaturi DD = 96 %), tj. uslijed znatno manje količine $-NH_2$ skupina dostupnih za keliranje s metalnim ionima.

Maksimum pri 750 nm vezan je uz Cu^{2+} ione, a nastaje uslijed $d-d$ prijelaza elektrona. d -orbitale slobodnog bakrovog iona imaju istu energiju, a prisutnost elektronskog dubleta oko metalnog iona povećava degeneraciju što vodi ka prijelazu koji apsorbira u vidljivom dijelu svjetlosti. Taj prijelaz odgovoran je i za dobivene specifične boje otopina [6,33].



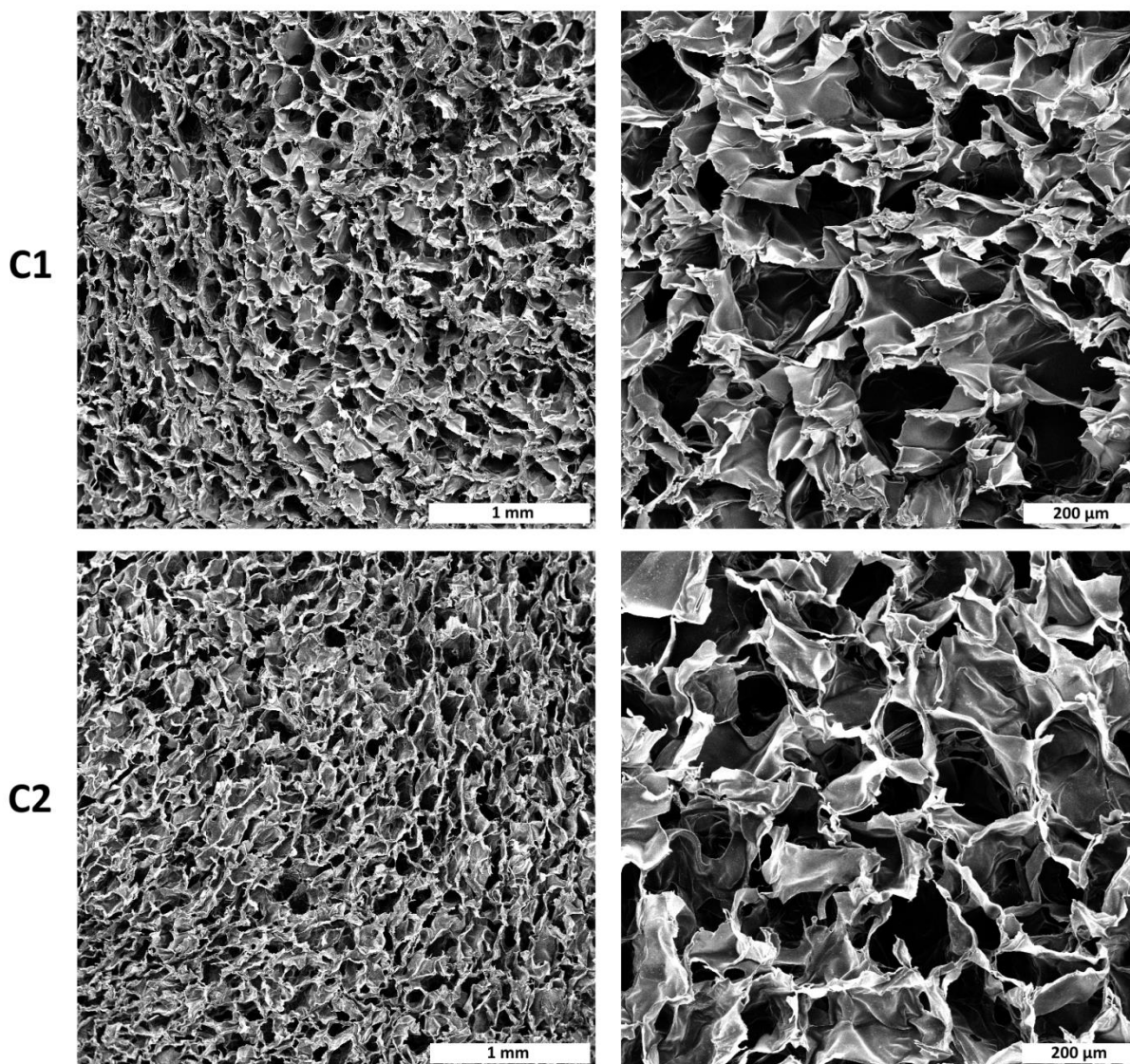
Slika 8. UV-Vis spektri: **A)** otopina kitozana srednje (C1) i visoke (C2) molekulske mase; te pripremljenih kelata različitih koncentracija bakrovih(II) iona i **B)** kitozana srednje molekulske mase te **C)** kitozana visoke molekulske mase.

4.2 Mikrostruktura materijala

Kitozan postaje polielektrolit uslijed protoniranja $-NH_2$ skupine, a otopina polimera prelazi u oblik hidrogela kada dođe u kontakt s lužinom uslijed fizikalnog umreženja, odnosno neutralizacije. Smanjenje gustoće pozitivnog naboja lanaca kitozana posljedično smanjuje elektrostatsko odbijanje makromolekula što olakšava stvaranje fizikalnih umreženja ostvarenih vodikovim vezama. Uslijed visoke koncentracije hidroksidnih iona, stvaranje gela napreduje s vremenom zbog difuzije OH^- iona iz područja više u područje niže koncentracije [3].

Uobičajeni postupak pripreme suhih poroznih struktura kitozana, koje u mokrom okruženju prelaze u hidrogel, je već spomenuta metoda liofilizacije. Općenito, porozne polimerne strukture (nosači) koriste se u tkivnom inženjerstvu gdje služe kao potpora za rast i razvoj tkiva koje se obnavlja. Stoga je poroznost nosača definirana njegovom primjenom. Poroznošću materijala primjenom liofilizacije može se manipulirati tijekom postupka hlađenja, odnosno brzinom i temperaturom hlađenja [45].

U ovom radu nosači kitozana pripremljeni su uz pomoć liofilizacije, za usporedbu s hidrogelovima dobivenima *in situ* keliranjem uz geliranje. Mikrografije na slici 9 prikazuju površinu pripremljenih uzoraka čistih polimera (C1 i C2). Za obje vrste kitozana može se uočiti homogena, visokoporozna struktura čije su pore međusobno dobro povezane. Veličine pora oba nosača kreću se oko 150 – 200 μm , te nema značajne razlike u veličini i obliku pora između nosača.

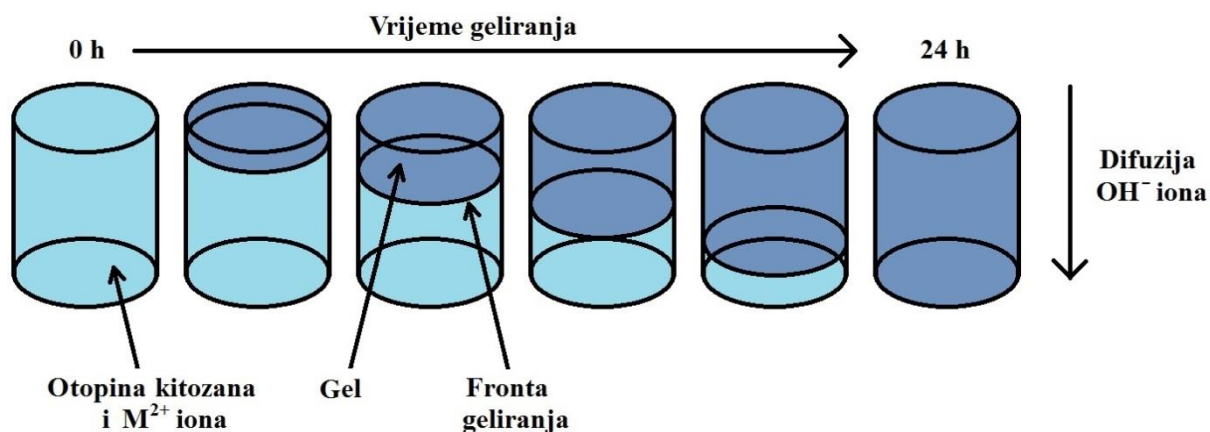


Slika 9. SEM mikrografije površine nosača kitozana srednje (C1) i visoke (C2) molekulske mase dobivenih metodom liofilizacije pri različitom uvećanju.

4.2.1 Hidrogelovi kelata kitozan – metalni ion

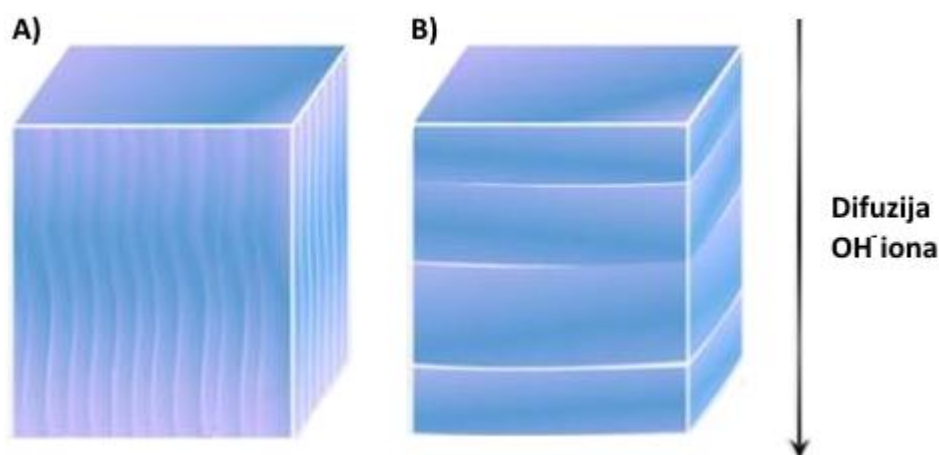
U istraživanju kojeg su proveli Nie i suradnici [3], za dobivanje hidrogelova kao izvor OH^- iona korištena je koncentrirana otopina NaOH . Također, praćene su i promjene strukture pripremljenih kelata promjenom koncentracije Cu^{2+} iona.

U ovom radu, kao izvor OH^- iona korištene su koncentrirana otopina natrijevog hidroksida te zasićena atmosfera amonijaka. Shematski prikaz procesa geliranja polimera uz keliranje metalnim ionima (Cu^{2+} i Zn^{2+}) dan je na slici 10.



Slika 10. Shematski prikaz procesa geliranja kelata kitozan- M^{2+} uz OH^- ione.

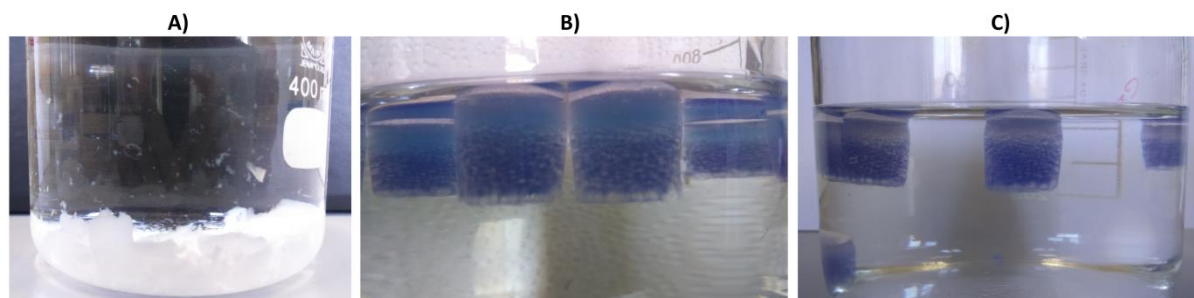
Nie i suradnici [3] zabilježili su da povećanjem koncentracije metalnih iona u sustavu, osim povećanja mehaničke čvrstoće pripremljenih kelata, dolazi i do promjene strukture hidrogelova: iz orijentirane tubularne u slojevitou strukturu (slika 11). Smatra se da je razlog tome ionsko umreživanje Cu^{2+} iona i polimera. Za razliku od pripreme hidrogelova čistog polimera gdje su autori nastanak višeslojne strukture objasnili teorijom Liesegangovih prstena, za nastanak višeslojne strukture kelata kitozan – metalni ion, teorija se ne može primijeniti budući da nije zabilježena pojava taloga bakrovih ili cinkovih spojeva. Iz toga proizlazi pretpostavka da metalni ioni direktno utječu na ponašanje makromolekula.



Slika 11. Shematski prikaz pripremljenih struktura hidrogelova: **A)** orijentirana tubularna struktura, **B)** višeslojna struktura [3].

Pretpostavka o dodatnom umreživanju kitozana uz bakrove(II) ione također je vizualno utvrđena stabilnošću hidrogelova kelata nakon geliranja s NaOH i NH_3 . Primijećeno je da hidrogelovi kelata ostaju stabilni i nakon 72 sata ispiranja destiliranom vodom što se nije

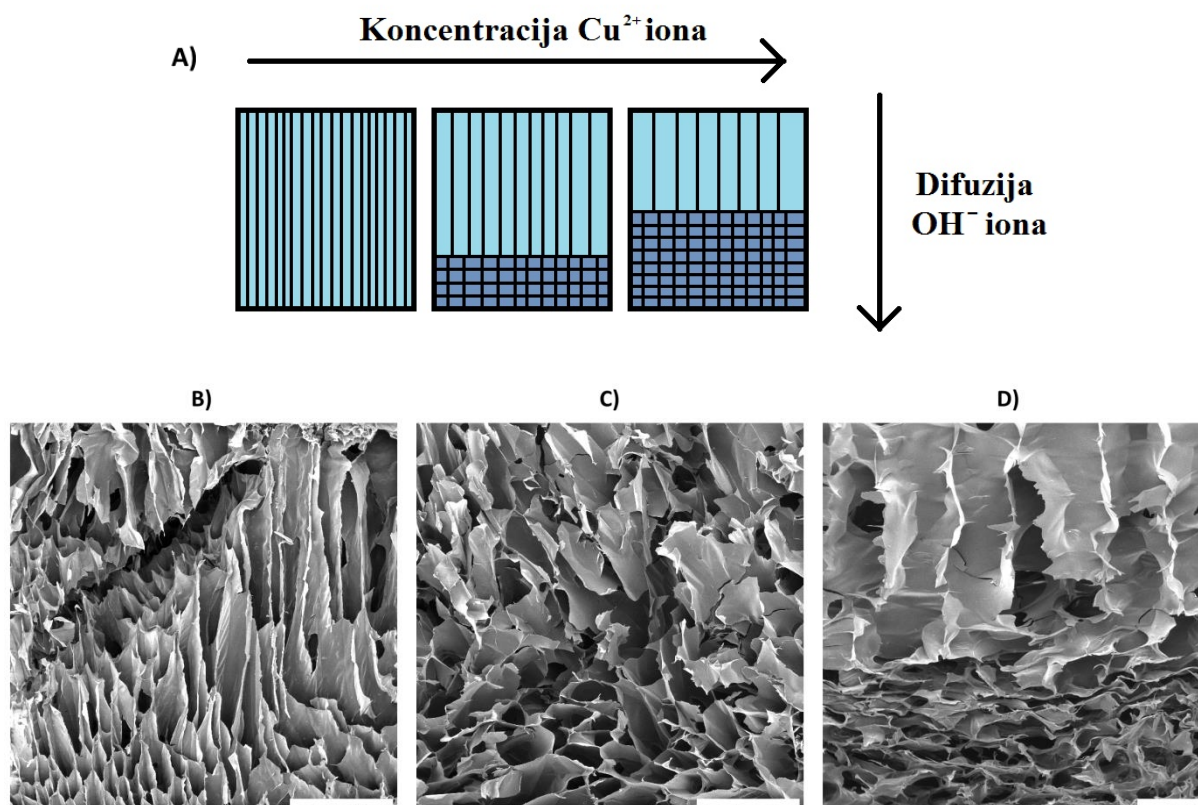
moglo potvrditi za hidrogelove čistih kitozana pripremljenih istim postupkom geliranja. Na slici 12 prikazani su hidrogelovi čistog kitozana (C2), te kelata kitozan-Cu²⁺ na početku ispiranja u destiliranoj vodi i nakon 72 sata. Slične strukture kelata dobivene su i korištenjem kitozana srednje molekulske mase (C1).



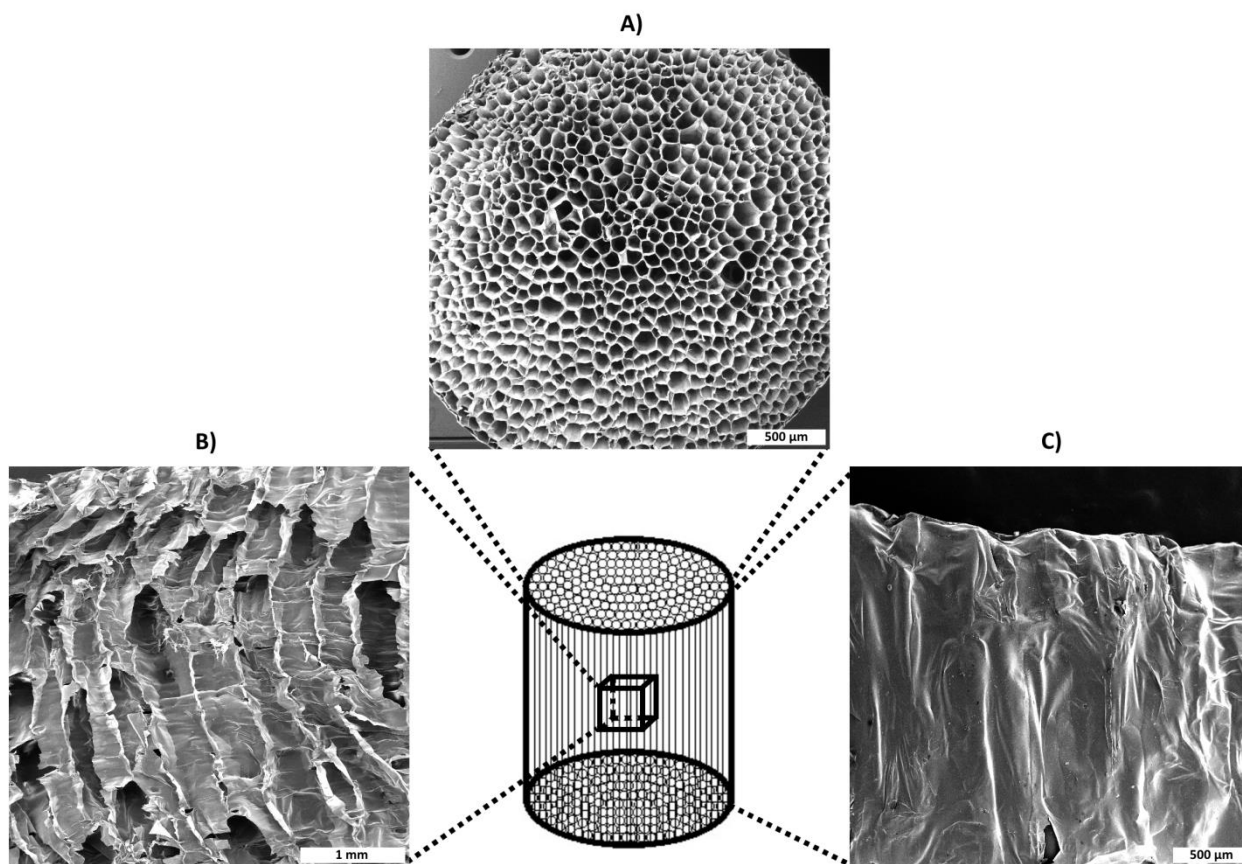
Slika 12. Pripremljeni hidrogelovi: **A)** čisti kitozan visoke molekulske mase, **B)** kelat C2-Cu²⁺ na početku ispiranja, **C)** kelat C2-Cu²⁺ nakon 72 sata ispiranja u destiliranoj vodi.

Iako se neutralizacijom kitozana postiže fizikalno umreživanje uslijed deprotoniranja amino skupina, to umreživanje nije bilo dovoljno za održavanje stabilnosti hidrogela kitozana tijekom i nakon vađenja iz kalupa (slika 12a). Ovakvo ponašanje može ukazati da su kompleksne interakcije između bakrovih(II) iona i liganda (glukozamino jedinica kitozana) zaslužne za bolje umreživanje kitozanskih lanaca.

Mehanizmi keliranja ovise o molarnom odnosu metalnog iona i liganda [46]. U spomenutom istraživanju [3], uočena je promjena veličine pora hidrogelova kelata s koncentracijom Cu²⁺ iona: s povećanjem koncentracije bakrovih(II) iona dolazi do povećavanja promjera pora. Također, smični modul kelata raste s porastom koncentracije bakrovih(II) iona što može ukazati na veći udio umreženih mjesta. Rezultati analize mikrostruktura kelata hidrogelova u ovom radu u skladu su s navedenim istraživanjem [3], pri čemu je zamijećena promjena mikrostrukture s koncentracijom Cu²⁺ iona te porast veličine „tunela“ (slika 13).



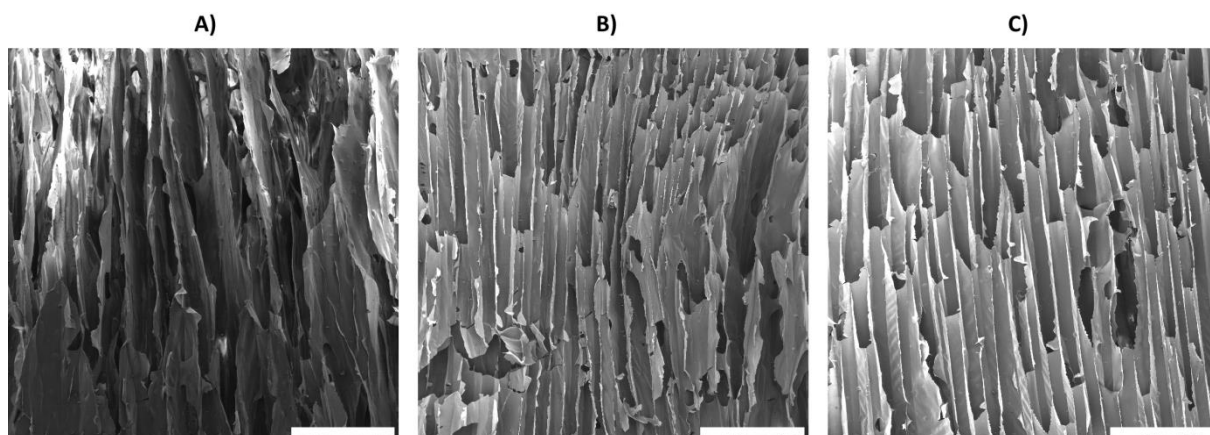
Na slici 14 dan je shematski prikaz kao i mikrostruktura kserogela kitozana srednje molekulske mase (C1) uz geliranje s NH₃ u kojem je koncentracija Zn²⁺ iona iznosila 12 mmol dm⁻³. Može se uočiti visokoporozna struktura s pravilnim, homogenim tunelima, kao i to da je plašt uzorka neporozan. Nadalje, dobiveni hidrogelovi kelata bili su znatno mekši u odnosu na kelate s istom koncentracijom bakrovih(II) iona. Ako se uspoređi struktura hidrogela kelata jednake koncentracije bakrovih(II) iona, može se zaključiti da vrsta metalnog iona uvelike utječe na mehanizam kompleksiranja što u konačnici definira mikrostrukturu hidrogela.



Slika 14. SEM mikrografije i shematski prikaz kserogela kelata C1–Zn²⁺:

A) površina, B) presjek, C) plašt uzorka.

Promjenom koncentracije cinkovih(II) iona nije uočena promjena u veličini „tunela“ hidrogela kelata C1–Zn²⁺, prikazanih na mikrografijama (slika 15). Također, hidrogelovi kelata pripremljeni s koncentracijama $c(\text{Zn}^{2+})$ nižim od 5 mmol dm^{-3} nisu bili dovoljno stabilni što može ukazati na kritičnu koncentraciju Zn²⁺ iona potrebnu za umreživanje kitozana. Veća stabilnost hidrogelova kelata s bakrovim(II) ionima je u skladu s prethodnim istraživanjem [47]. Ovisno o molarnom omjeru metalnih iona i amino skupina, može prevladavati „model privjeska“, „model mosta“ ili pak oba postoje istovremeno. Ovisno o mehanizmu koji prevladava, dobiva se različita konformacija makromolekula što naposljetku može imati utjecaj na difuziju OH⁻ iona te brzinu geliranja [3].

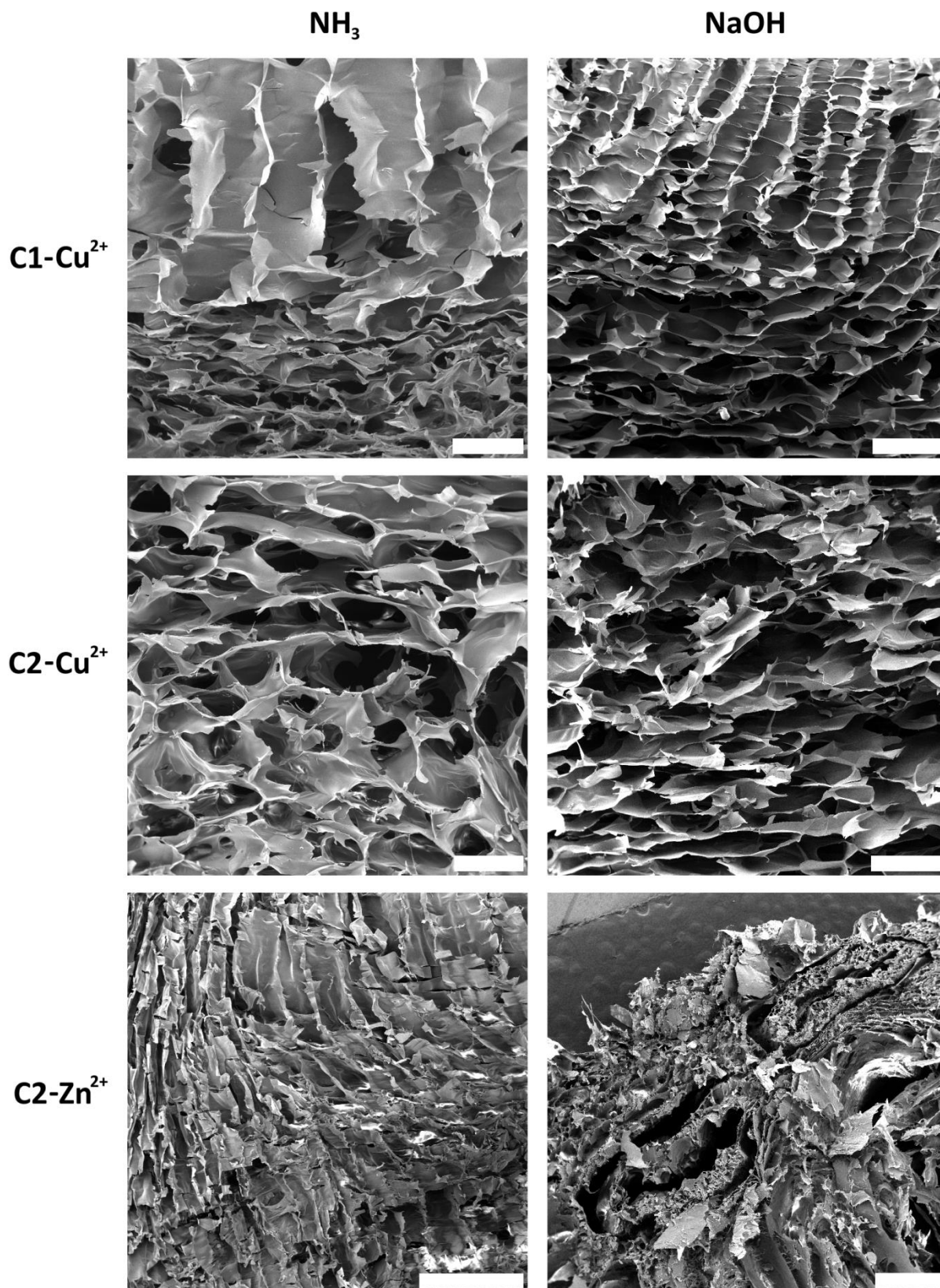


Slika 15. SEM mikrografije presjeka kserogelova kelata kitozana srednje molekulske mase pripremljenih geliranjem s NH_3 u kojima je: **A)** $c(\text{Zn}^{2+}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, **B)** $c(\text{Zn}^{2+}) = 7 \text{ mmol dm}^{-3}$ i **C)** $c(\text{Zn}^{2+}) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$. Oznaka skale odgovara 1 mm.

Budući da su u ovom radu korištena dva izvora hidroksidnih iona, uočeno je da bitan utjecaj na dobivenu mikrostrukturu i stabilnost hidrogelova ima neutralizirajući agens. Za razliku od stabilnih hidrogelova kelata kitozan- Cu^{2+} dobivenih uz geliranje s NaOH , kelati kitozana s Zn^{2+} ionima nisu bili stabilni. S druge strane, uzorci dobiveni uz geliranje amonijakom dali su stabilnije i dobro definirane strukture. Ovakvo ponašanje može biti posljedica stabilizacije kompleksne strukture NH_4^+ ionima koji nastaju nakon otapanja plina u vodenom mediju. S obzirom da Cu^{2+} i Zn^{2+} ioni imaju veliki afinitet prema amino skupini, pretpostavlja se da NH_4^+ ioni potpomažu reakcijama kompleksiranja.

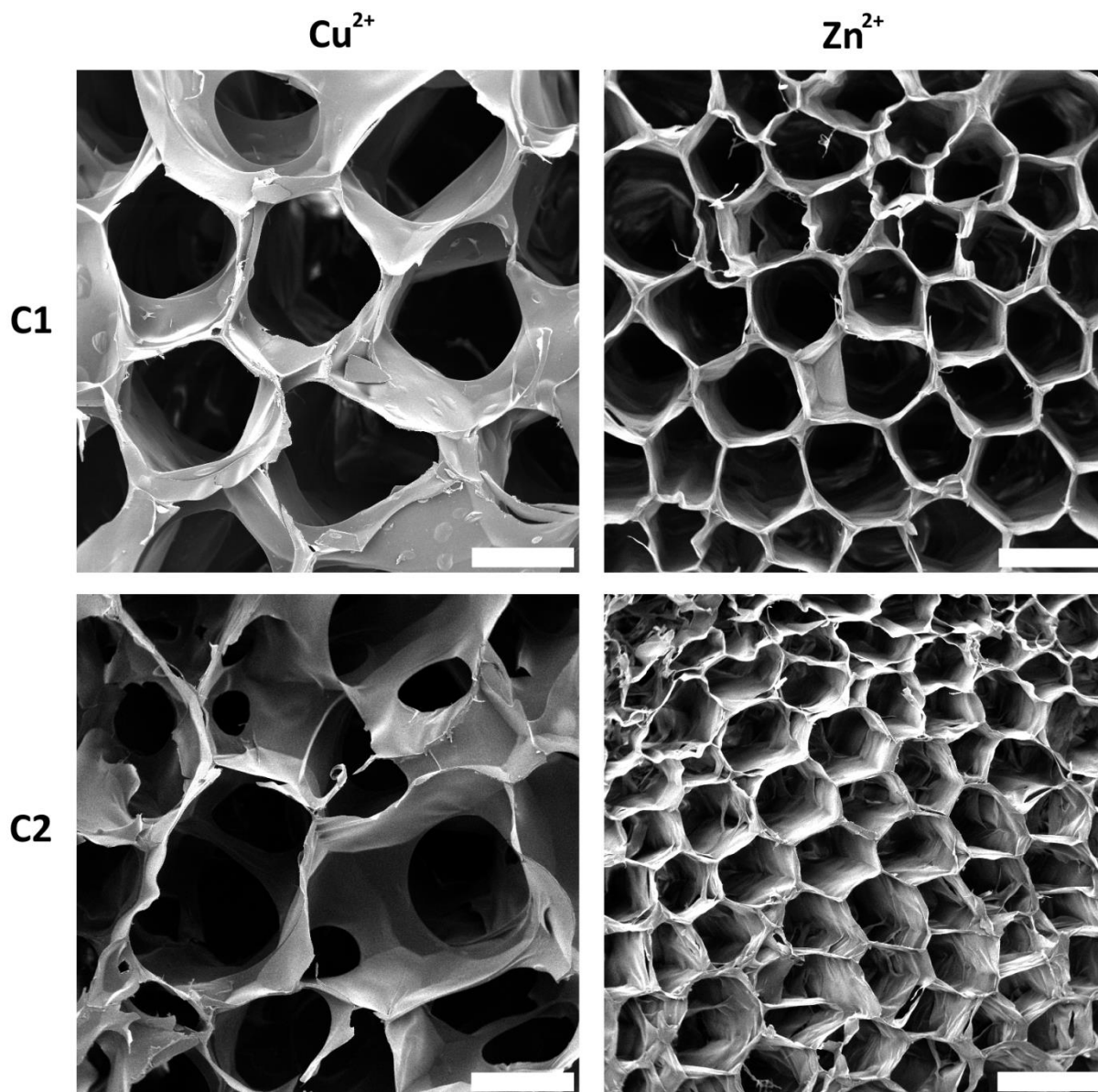
Na slikama 16 i 17 prikazani su presjeci i površine kserogelova pripremljenih kelata u kojima je koncentracija metalnih iona iznosila 12 mmol dm^{-3} . Mikrografije presjeka uzoraka (slika 16) ukazuju na manje promjene u strukturi kserogelova kelata s bakrovim(II) ionima s obzirom na neutralizirajući agens, dok su promjene značajnije ovisno o molekulskoj masi polimera. Ovakve promjene mogu biti posljedica većeg broja glukozaminskih jedinica u kitozanu C2.

Međutim, hidrogelovi kelata s cinkovim ionima gelirani s NaOH ukazali su na važnost molekulske mase kitozana u reakcijama kompleksiranja pri čemu su C2- Zn^{2+} hidrogelovi (visoka molekulska masa) zadržali nedefiniranu strukturu u odnosu na dezintegraciju C1- Zn^{2+} hidrogelova (srednja molekulska masa). Također, vidljivo je da je amonijak kao neutralizirajući agens pogodniji za stabilnost hidrogela kelata s cinkovim ionima.



Slika 16. SEM mikrografije presjeka kserogela kelata kitozana srednje (C1) i visoke (C2) molekulske mase te Cu^{2+} i Zn^{2+} iona. Oznaka je 1 mm.

Mikrografije površina kserogela kelata ukazuju na neznatne promjene između dvije korištene vrste kitozana (slika 17). Za kelate C1–Cu²⁺ uočene su pravilno raspoređene pore, u odnosu na kelate s kitozanom visoke molekulske mase. Slično ponašanje vidljivo je i kod C1–Zn²⁺ i C2–Zn²⁺ kelata uz vizualno manji promjer pora za kitozan veće molekulske mase. Nadalje, veće pore snimljene su za uzorke kelata polimera s bakrovim(II) ionima, u odnosu na one s cinkovima.

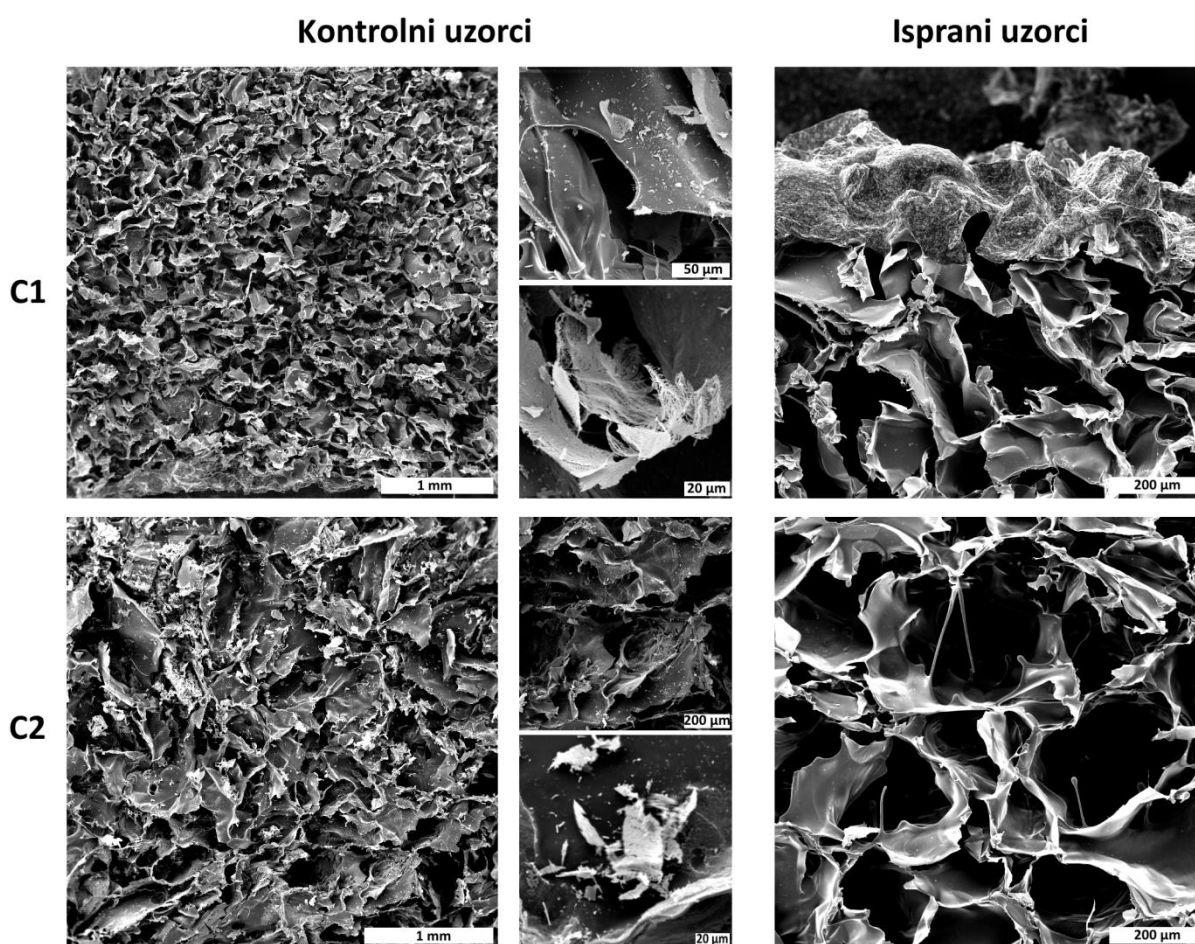


Slika 17. SEM mikrografije površine kserogela kelata kitozana srednje (C1) i visoke (C2) molekulske mase s Cu²⁺ i Zn²⁺ iona (geliranje s NH₃) koncentracije od 12 mmol dm⁻³.

Skala je 500 μm.

4.2.2 Kontrolni uzorci

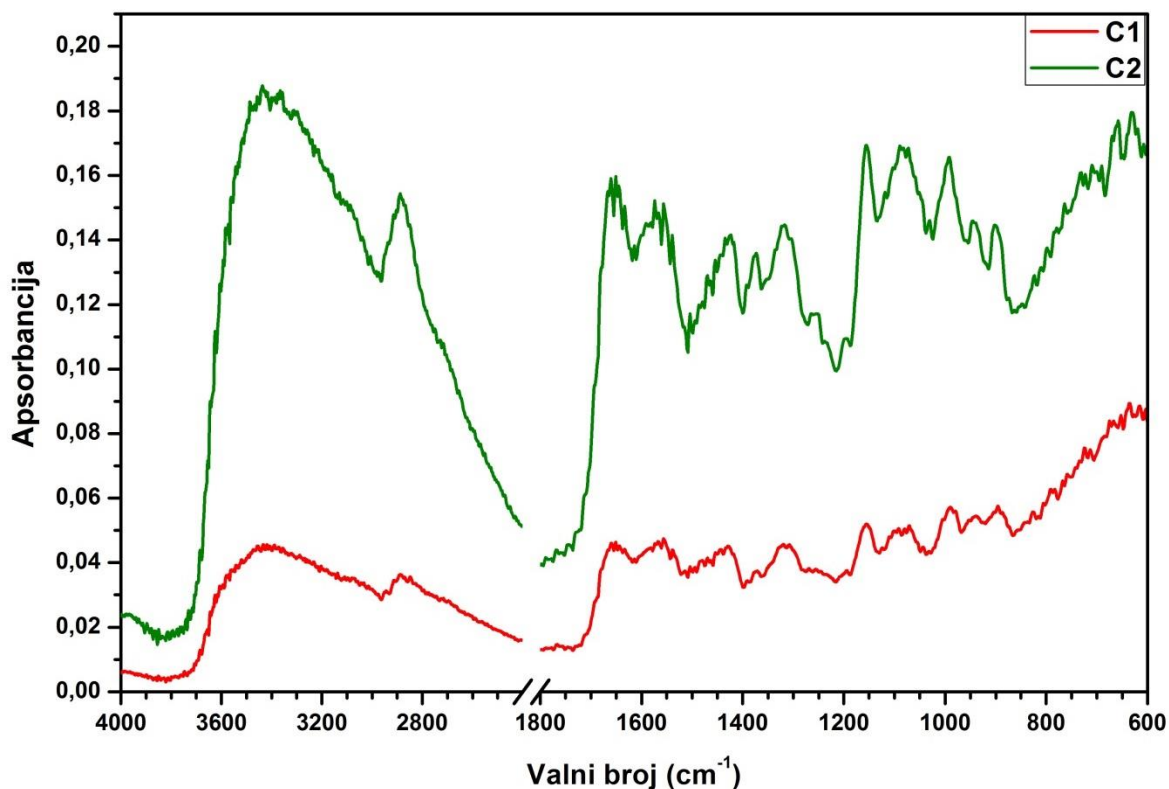
Na SEM mikrografijama (slika 18) može se vidjeti površina uzoraka nosača nakon adsorpcije bakrovih(II) iona tijekom 24 sata. Na kontrolnim uzorcima vidljiva je pojava anorganskih kristalnih faza, kojih nema nakon ispiranja uzoraka destiliranom vodom. Međutim, prisutna je pojava „hrapave“ površine nosača te prisutnost manjih čestica koje bi mogle ukazati na taloženje bakrovih spojeva. Također, može se uočiti da adsorpcijom metalnih iona nije promijenjena struktura liofiliziranih nosača.



Slika 18. SEM mikrografije površine kontrolnih uzoraka nakon adsorpcije Cu^{2+} iona.

4.3 DRIFT analiza

Primjenom difuzne refleksije infracrvenog zračenja (DRIFT analize) snimljeni su spektri obje vrste prašaka kitozana (C1 i C2) kako bi im se procijenio stupanj deacetilacije (slika 19).



Slika 19. DRIFT spektri prašaka kitozana C1 i C2.

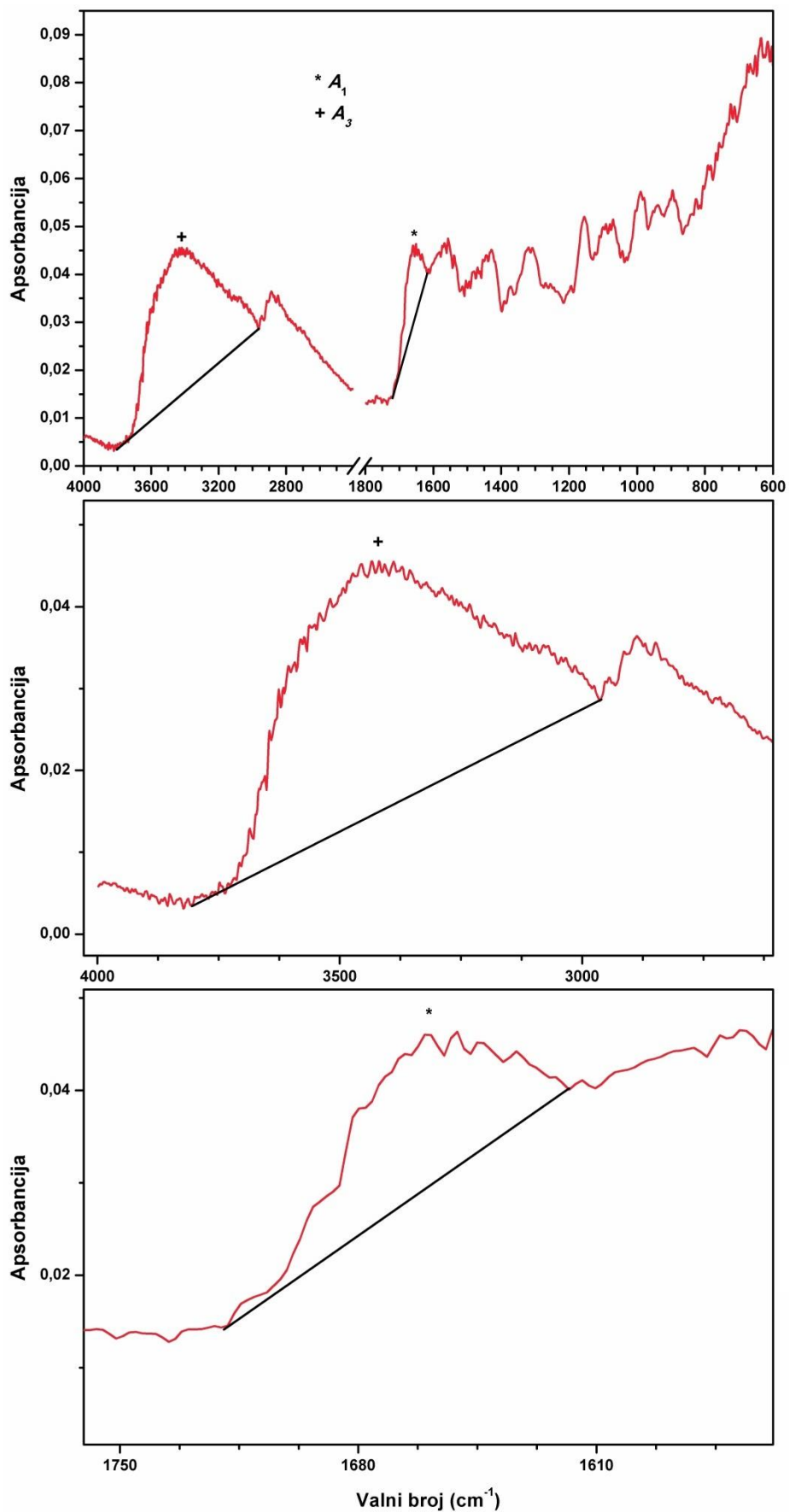
Stupanj deacetilacije prašaka izračunat je primjenjujući sljedeću jednadžbu [25]:

$$DD [\%] = \left(1 - \frac{A_1}{1,33 \cdot A_3} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

gdje A_1 odgovara apsorbanciji vrpce na valnom broju 1647 cm^{-1} , a A_3 apsorbanciji vrpca u rasponu od 3804 cm^{-1} do 2959 cm^{-1} (računato od bazne linije). Vrijednosti stupnja deacetilacije dobivene koristeći jednadžbu 5, korigirane su primjenom korekcijskog faktora (0,8510) čija je vrijednost određena prema polimeru točno poznatog stupnja deacetilacije. Stoga su procijenjene vrijednosti stupnja deacetilacije za obje vrste kitozana:

- $DD = (73,13 \pm 4,42) \%$, za kitozan srednje molekulske mase (C1), te
- $DD = (77,61 \pm 4,67) \%$, za kitozan više molekulske mase (C2).

Na slici 20 prikazan je način određivanja baznih linija kojeg su koristili Duarte i suradnici [48], a koji je primijenjen i u ovom radu.



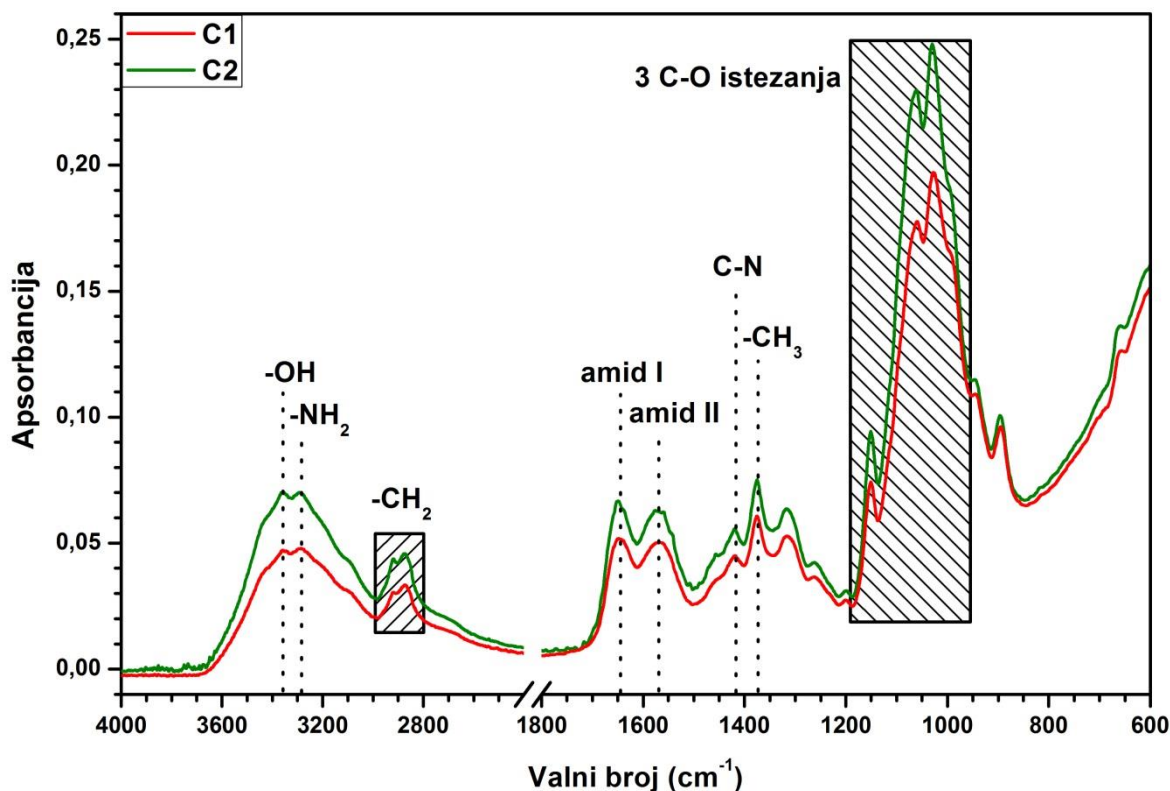
Slika 20. Određivanje baznih linija na primjeru praška kitozana C1.

S obzirom da oba kitozana posjeduju sličan stupanj deacetilacije, odnosno jednaki odnos amino i amidnih skupina koje sudjeluju u reakcijama kompleksiranja, može se zaključiti da molekulska masa polimera ima većinski utjecaj na keliranje te konačnu strukturu materijala, kao što je utvrđeno SEM analizom.

4.4 FTIR analiza

Na slikama 21 – 24 prikazani su FTIR spektri pripremljenih nosača oba kitozana, kao i spektri kserogelova kelata kitozana i bakrovih(II), odnosno cinkovih(II) iona.

Apsorpcijske vrpce, tj. valni brojevi funkcionalnih skupina za kitozan (srednje i visoke molekulske mase) određeni su na FTIR spektrima prikazanima na slici 21. Karakteristične vrpce, koje mijenjaju svoje intenzitete ovisno o stupnju deacetilacije, odgovaraju istezanju karbonilne (C=O) skupine (amid I) i savijanju –NH (amid II), a nalaze se na valnim brojevima 1649 cm^{-1} i 1567 cm^{-1} . Vrpca od 3361 cm^{-1} do 3283 cm^{-1} odgovara preklapanju vrpce hidroksilne (–OH) i amino (–NH₂) skupine uslijed vibracijskog istezanja, te međusobnih interakcija vodikovim vezama. Valni brojevi 2919 cm^{-1} i 2873 cm^{-1} odgovaraju simetričnom i asimetričnom istezanju –CH₂ skupina. Vrpce na 1419 cm^{-1} i 1375 cm^{-1} pripadaju skupinama C–N i –CH₃ iz acetilne skupine. Tri istezanja ugljik–kisik skupina nalaze se na valnim brojevima 1151 , 1061 i 1027 cm^{-1} . Intenzitet prve vrpce pripada asimetričnom istezanju glikozidne veze koju čini kisikov atom iz mosta i ugljikov iz prstena. Vrpca na 1061 cm^{-1} nastaje uslijed istezanja C–O veze trećeg ugljikovog atoma (sekundarna –OH skupina), dok vrpca na 1027 cm^{-1} odgovara istezanju C–O veze C6 (primarna –OH skupina) [35,49].



Slika 21. FTIR spektri nosača kitozana C1 i C2.

Na slikama 22 – 24 prikazani su FTIR spektri dobivenih uzoraka kitozana srednje (C1) i visoke (C2) molekulske mase pripremljenih neutralizacijom s natrijevim hidroksidom ili amonijakom, te kserogelova kelata kitozan– $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$.

Prema literaturi [28,32], tijekom procesa keliranja metalnih iona (Cu^{2+} i Zn^{2+}) kitozonom dolazi do pomaka široke vrpce kitozana koja odgovara istezanju $-\text{NH}_2$ i $-\text{OH}$ skupine prema nižim valnim brojevima. Također, vrpčama koje odgovaraju amid II skupini ($-\text{NH}$, na 1567 cm^{-1}) te savijanju (sekundarne) $-\text{OH}$ skupine (na 1061 cm^{-1}) se smanjuje intenzitet. Te promjene ukazuju na sudjelovanje amino i hidroksilnih skupina u keliranju metalnih iona polimerom. Također, može se zaključiti da dodatak metalnih iona značajno utječe na vibracijske frekvencije različitih skupina ($-\text{OH}$, $-\text{NH}$, $-\text{NH}_2$) kitozana [49-51]. Wang i suradnici [28] navode i pojavu nove apsorpcijske vrpce na $1620 - 1630\text{ cm}^{-1}$ što smatraju karakterističnim za asociiranje kitozana i metala, no ta vrpca nije zabilježena u ovom radu.

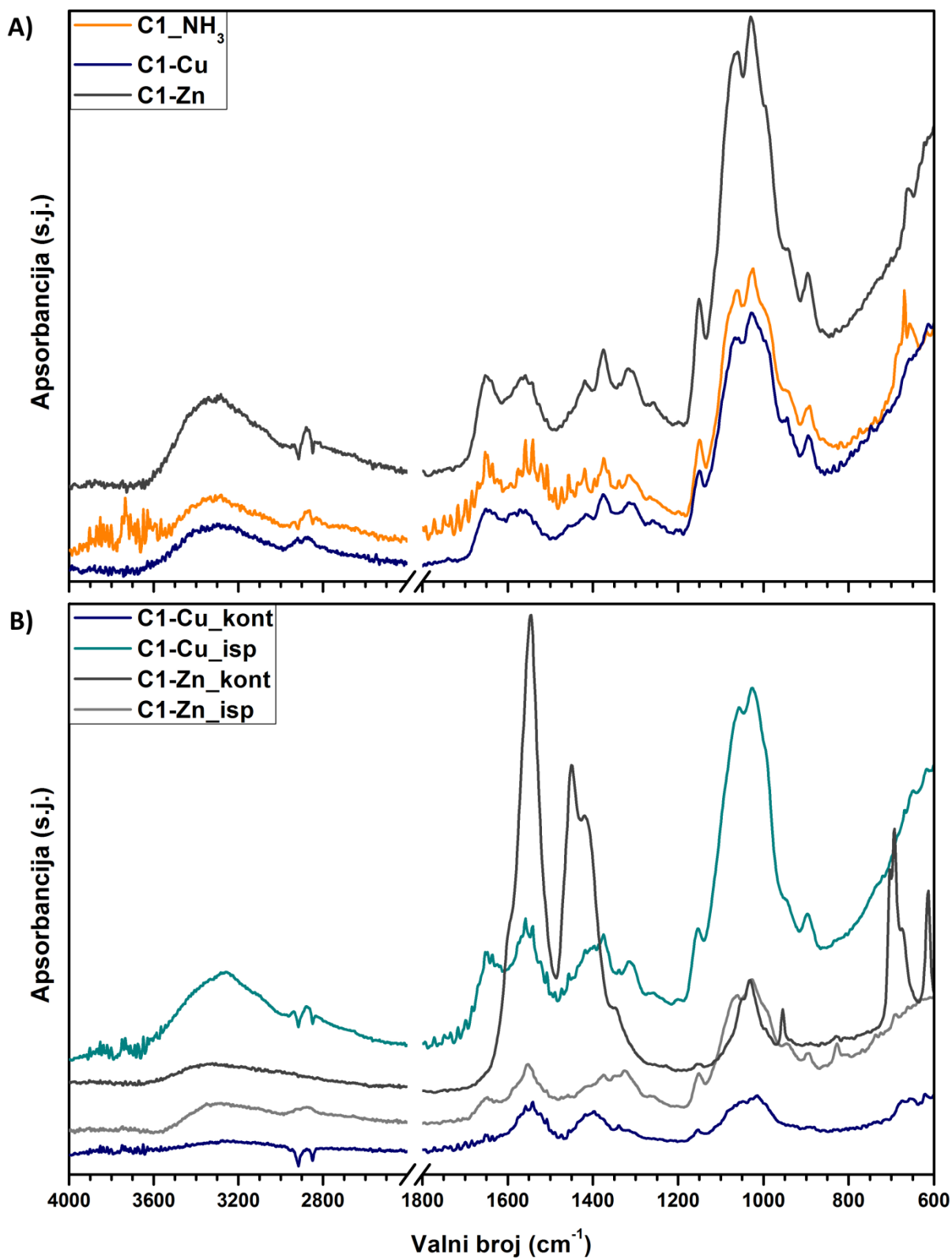
Gritsch i suradnici [38] su u svom istraživanju kelata kitozana s različitim omjerima Cu^{2+} iona i $-\text{NH}_2$ skupina zabilježili slične promjene u strukturi kitozan – metalni ion primjenom ATR-FTIR analize, kao što su nađene u ovom radu. Također, nisu uočili značajnije promjene u spektrima uzoraka s različitim koncentracijama bakra.

Budući da u ovom radu na FTIR spektrima nije uočena pojava novih vrpca, može se zaključiti da između polimera i metalnih iona nije nastala kovalentna veza, već samo dolazi do elektrostatskih interakcija.

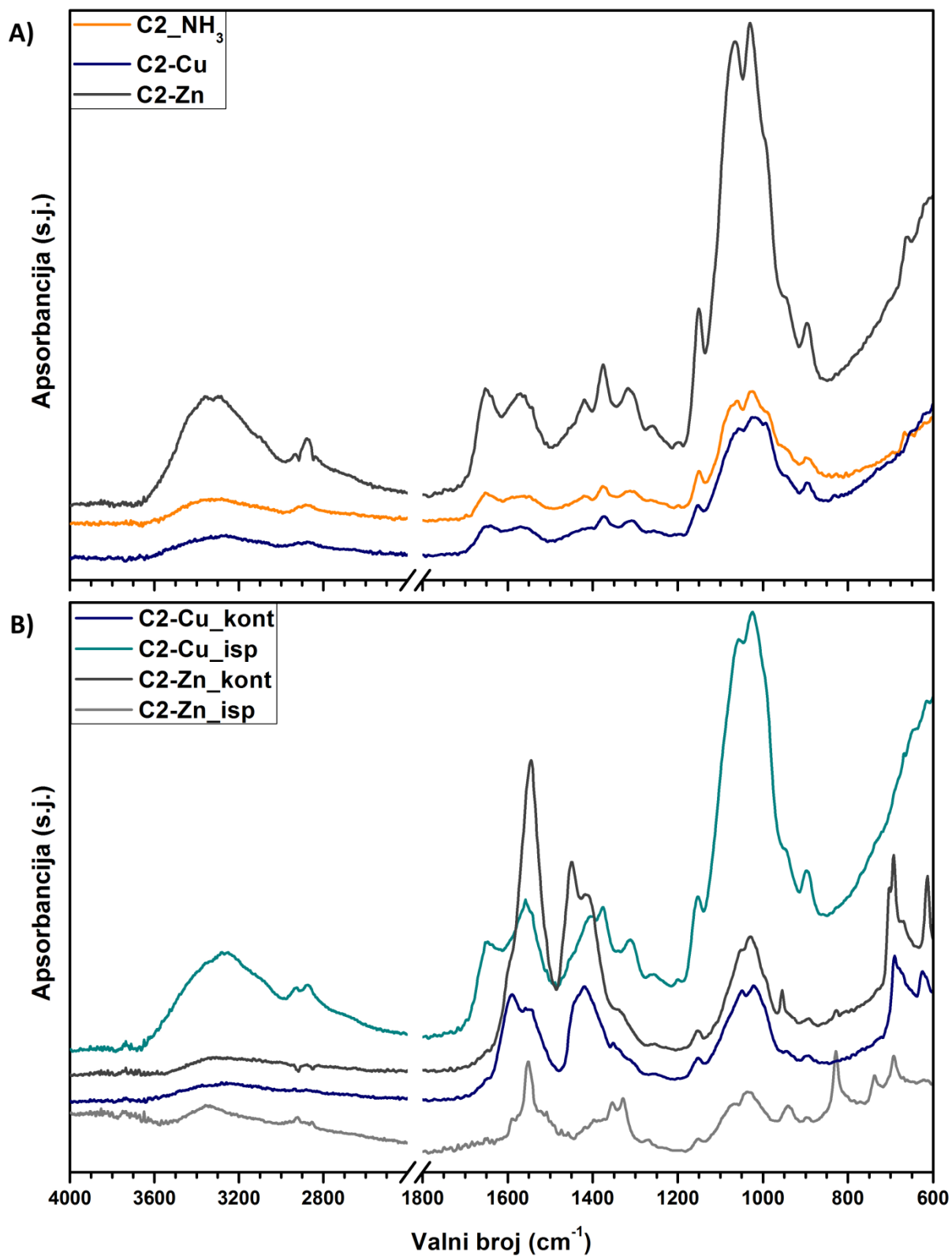
Prema literaturnim podacima [38], „model mosta“ podupiru uočene promjene u vrpca na valnom broju $\sim 1100\text{ cm}^{-1}$, a koja odgovara glikozidnoj vezi (u ovom radu vrpca se pojavljuje na 1151 cm^{-1}). To ukazuje na Cu–koordinirano umreživanje između polimernih lanaca, tj. da je metalni ion most između amino skupina dva različita polisaharidna lanca. Također, predloženo je i da različiti oblik vrpce može biti zbog povećanja duljine glikozidne veze uslijed steričkih smetnji zbog iona unutar matrice koji su u interakciji s okolnim polimernim lancima.

Uspoređujući utjecaj molekulske mase kitozana te izvor hidroksidnih iona za geliranje, nisu pronađene dodatne promjene drugih apsorpcijskih vrpca.

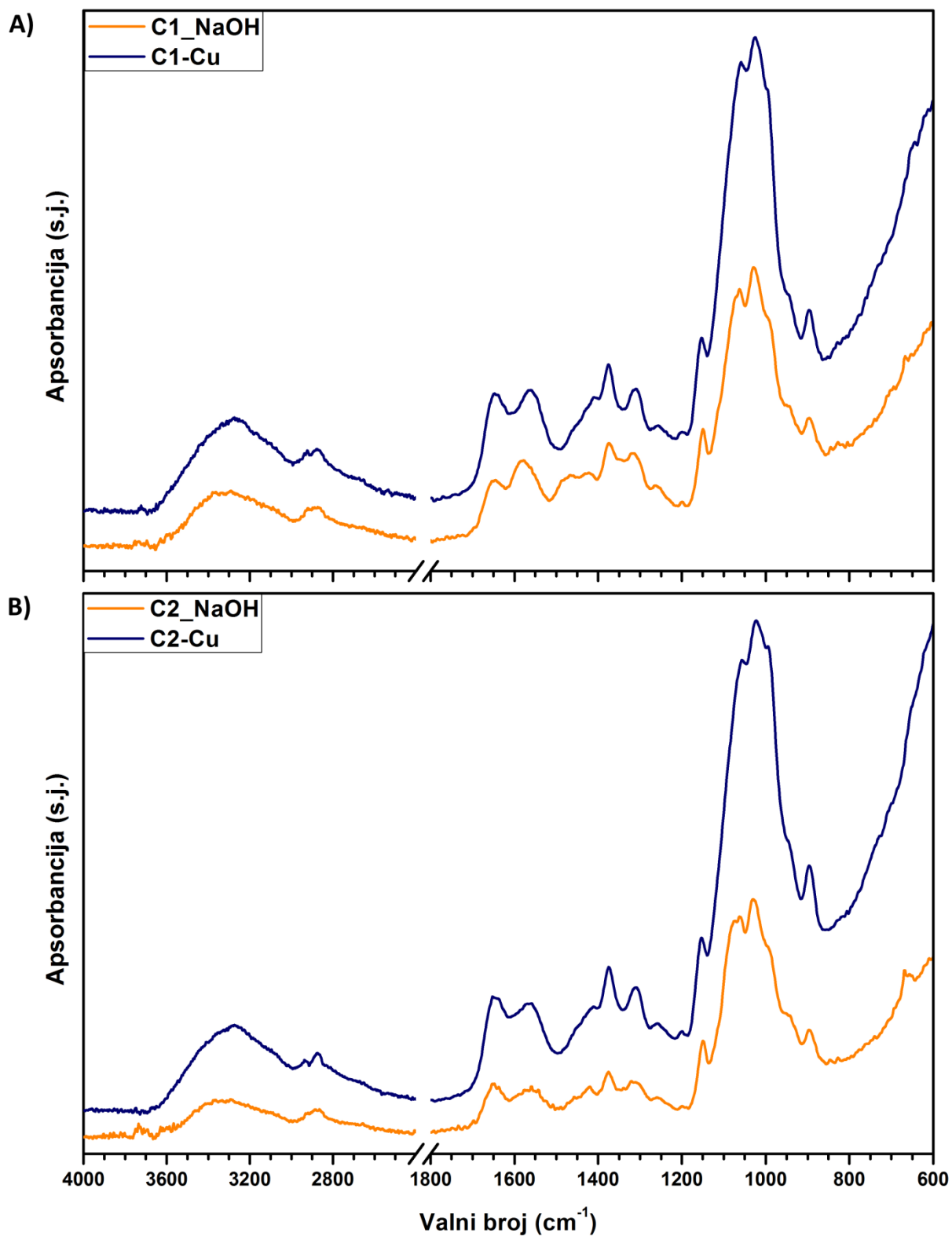
Nasuprot *in situ* dobivenih hidrogelova kelata, kontrolni uzorci dobiveni adsorpcijom metalnih iona pokazali su prisutnost acetatnih grupa iz metalnih prekursora zaostalih čak i nakon ispiranja destiliranom vodom.



Slika 22. FTIR spektri: **A)** uzoraka kelata kitozana srednje molekulske mase i Cu²⁺/Zn²⁺ iona dobivenih uz geliranje amonijakom, te **B)** kontrolni uzorci.



Slika 23. FTIR spektri: **A)** uzoraka kelata kitozana visoke molekulske mase i Cu²⁺/Zn²⁺ iona dobivenih uz geliranje amonijakom, te **B)** kontrolni uzorci.

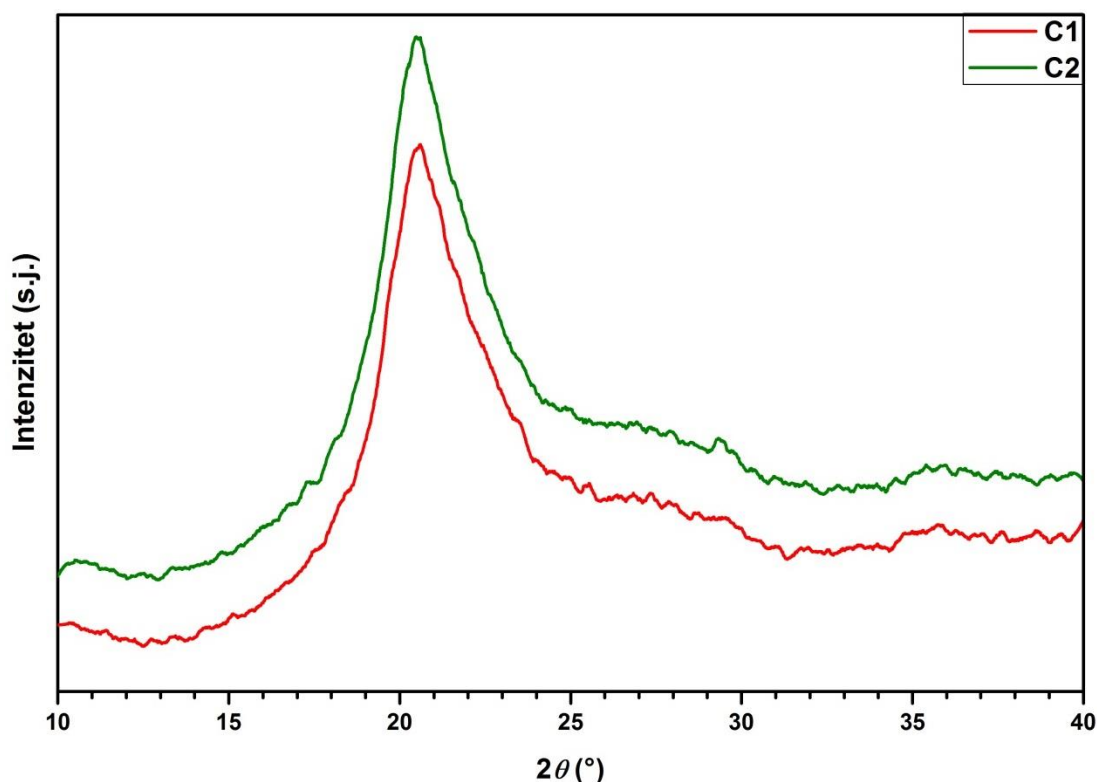


Slika 24. FTIR spektri uzoraka kitozana **A)** srednje i **B)** visoke molekulske mase dobivenih geliranjem s natrijevim hidroksidom te uz keliranje Cu^{2+} iona.

4.5 Rendgenska difrakcijska analiza

Difraktogrami čistih prašaka kitozana i kserogelova kelata kitozan–Cu²⁺/Zn²⁺ prikazani su na slikama 25 – 27.

Na difraktogramima prašaka kitozana srednje i visoke molekulske mase (slika 25) vidljiv je karakteristični maksimum na $2\theta = 20,5^\circ$ koji odgovara kristalnoj domeni nastaloj uslijed inter- i intra-molekulskih vodikovih veza. Nakon reprecipitacije kitozana amonijakom i NaOH, karakteristični maksimum kitozana smanjuje se, te se pojavljuje novi maksimum na $10,5^\circ$ koji odgovara hidratiziranom L-2 polimorfu kitozana [52]. Difrakcijski maksimum kitozana smanjuje se zbog pucanja vodikovih veza uslijed restrukturiranja pravilno raspoređene strukture u praškastom stanju. Također, smanjenje broja vodikovih veza vodi ka širenju polimernog lanca [28,35].



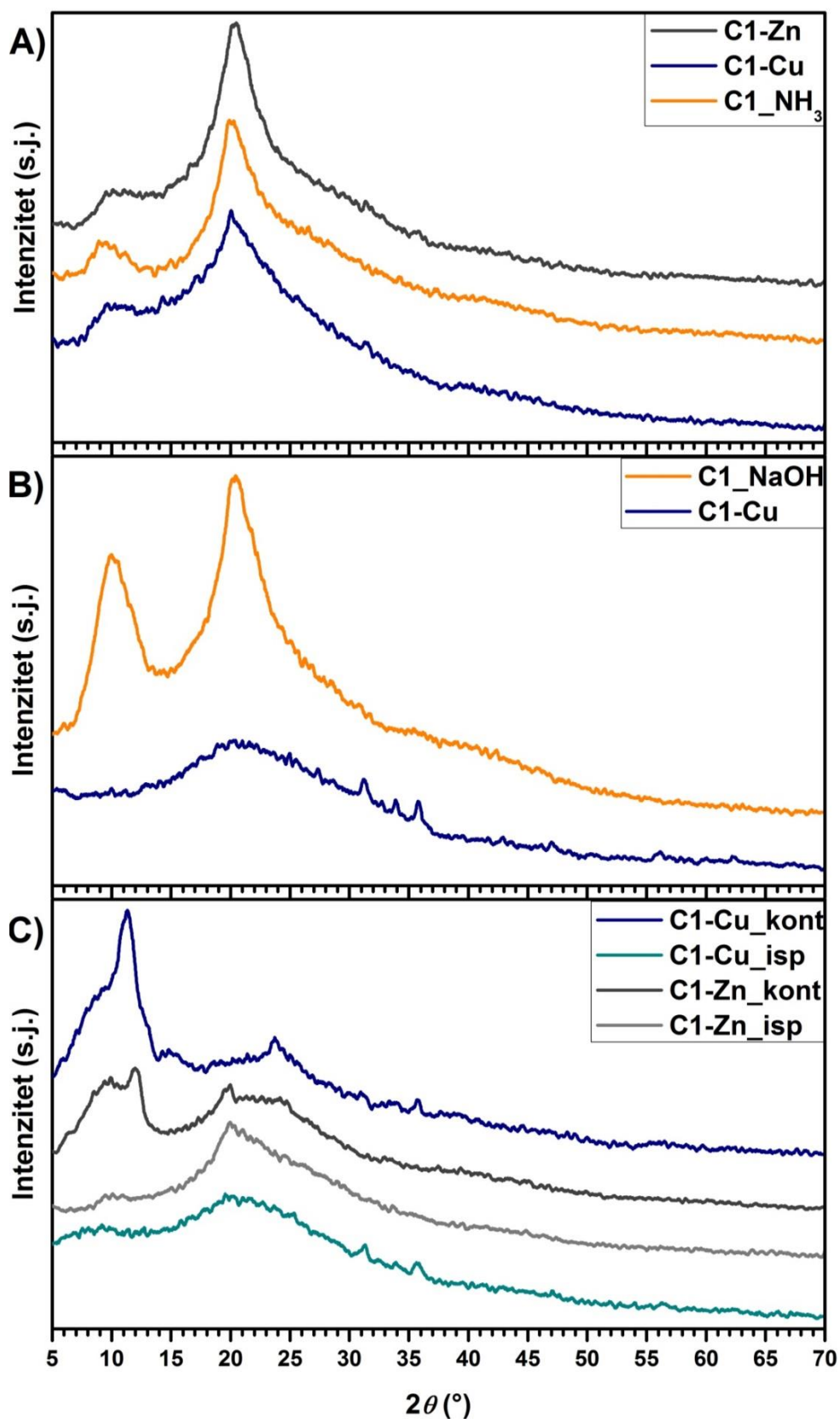
Slika 25. Difraktogrami prašaka kitozana srednje (C1) i visoke (C2) molekulske mase.

Difraktogrami kelata kitozana srednje molekulske mase dobivenih geliranjem uz NH₃ pokazuju samo difrakcijske maksimume kitozana što ukazuje na izostanak bakrovih i cinkovih spojeva. Također, izostanak značajnije razlike u difrakcijskom maksimumu na $2\theta = 20,5^\circ$ ukazuje na to da nije došlo do promjene u jediničnoj ćeliji kitozana u prisutnosti

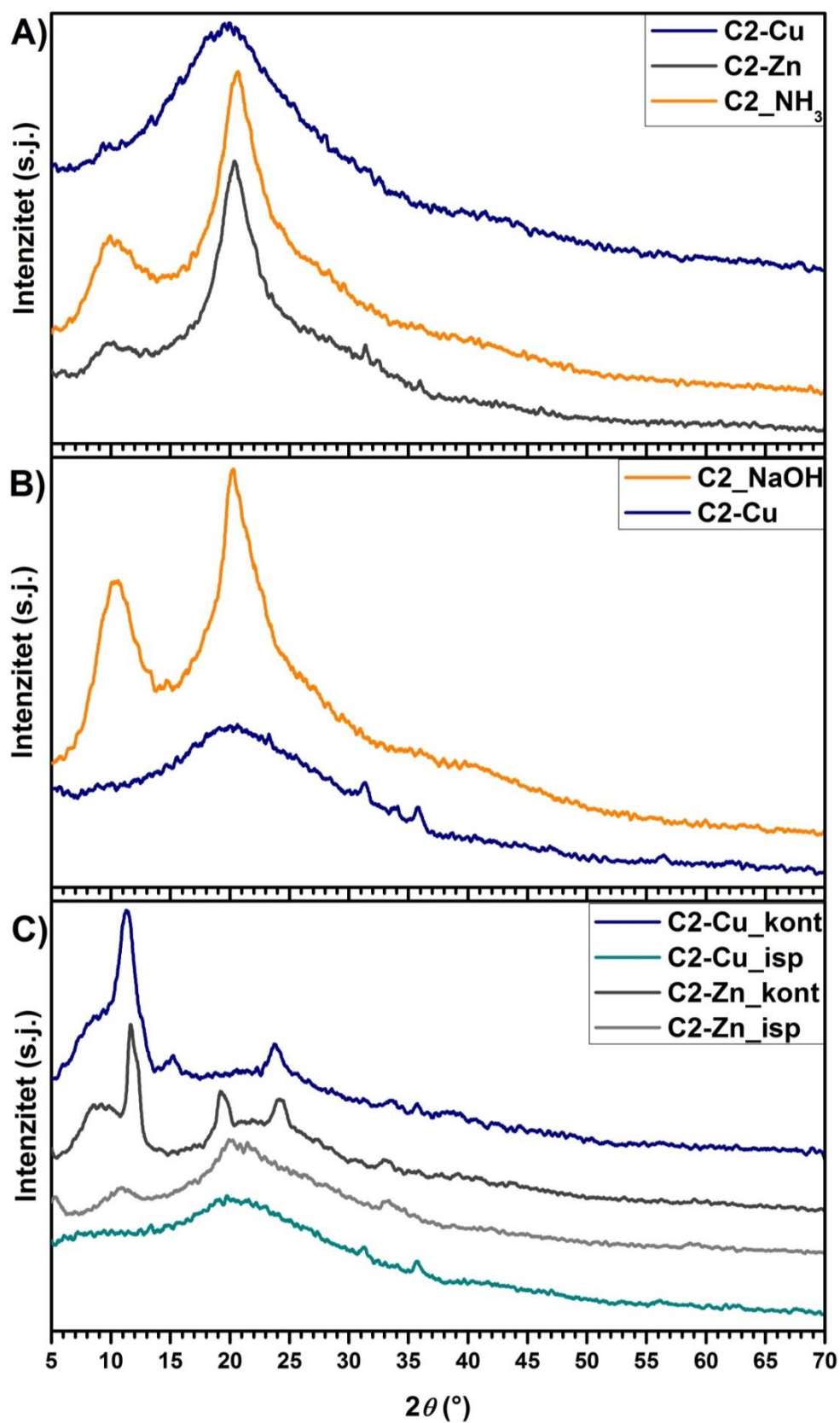
Zn^{2+} iona, dok je sa Cu^{2+} ionima primijećeno značajnije širenje glavnog difrakcijskog maksimuma. Međutim, kada je geliranje provedeno s NaOH došlo je do pojave novih kistalnih faza bakrovih iona koje odgovaraju Cu_3O_4 , CuO i Cu_2O [53].

Nasuprot kelatima s C1, kelati s kitozonom visoke molekulske mase dobiveni geliranjem uz NH_3 pokazuju prisutnost cinkovog oksida u kelatu C2- Zn^{2+} . Zaključno, kontrolni uzorci i kelati dobiveni geliranjem s NaOH pokazuju slično ponašanje kao i kelati s kitozonom visoke molekulske mase. Kao što je pretpostavljeno, molekulska masa ima značajan utjecaj na mehanizme kompleksiranja što u konačnici određuje sastav i strukturu kserogela.

Kontrolni uzorci dobiveni adsorpcijom bakrovih(II) i cinkovih(II) iona potvrdili su indikacije FTIR analize o zaostatku metalnih prekursora nakon ispiranja vodom. Štoviše, u istim uzorcima uočena je prisutnost bakrovih, odnosno cinkovog oksida [54].



Slika 26. Difraktogrami uzoraka kitozana srednje molekulske mase (C1): **A)** dobivenih geliranjem s amonijakom s $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ ionima; **B)** dobivenih geliranjem s NaOH s Cu^{2+} ionima; **C)** kontrolni uzorci dobiveni adsorpcijom metalnih iona.



Slika 27. Difraktogrami uzoraka kitozana visoke molekulske mase (C2): **A)** dobivenih geliranjem s amonijakom s $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ ionima; **B)** dobivenih geliranjem s NaOH s Cu^{2+} ionima; **C)** kontrolni uzorci dobiveni adsorpcijom metalnih iona.

4.6 MTT test

Dobiveni rezultati MTT testa na uzorcima kelata kitozan–Cu²⁺ i kitozan–Zn²⁺ geliranih amonijakom prikazani su na slici 28. Vijabilnost stanica prikazana je u odnosu na negativnu kontrolu citotoksičnosti (netretirane stanice) te vijabilnost iznad 50 % ukazuje na necitotoksičnost materijala.

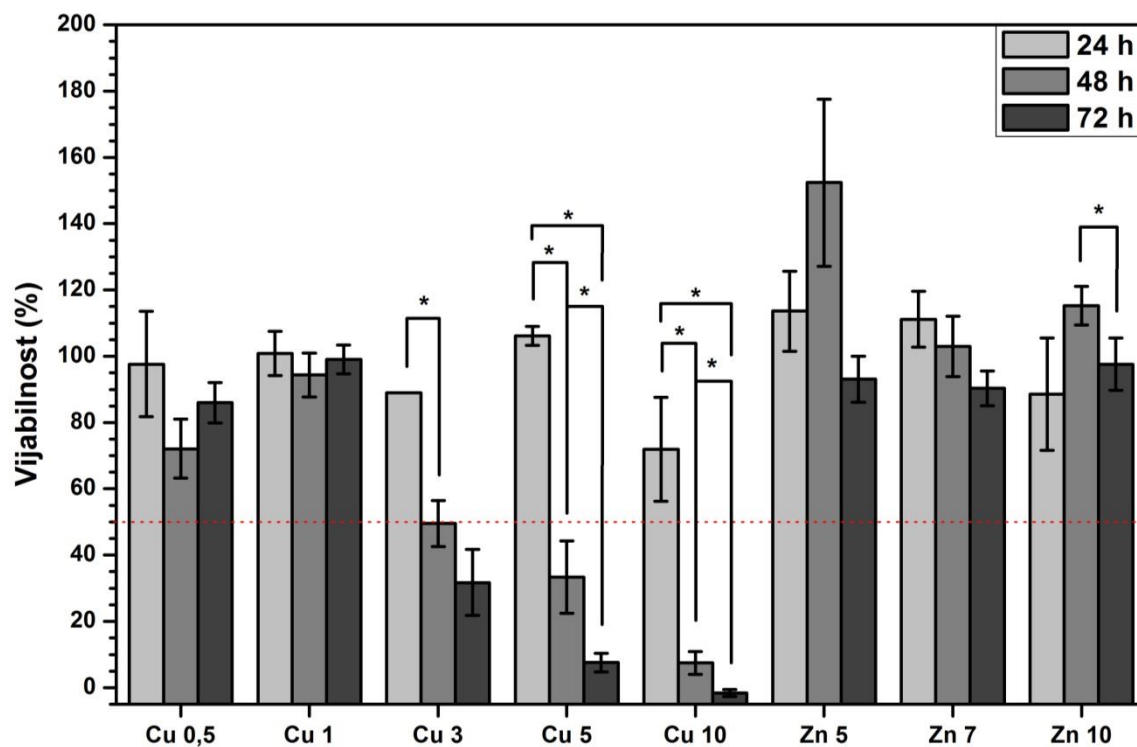
In vitro test citotoksičnosti pokazuje da su uzorci kitozana s bakrovim(II) ionima koncentracije veće od 1 mmol dm⁻³ toksični za ljudske embrionalne stanice Hek293 nakon 48 sati inkubacije. Također, citotoksičnost je sve izraženija porastom koncentracije bakrovih(II) iona. Prema literaturi [43,55], kompleksi bakra mogu reagirati s DNA što vodi ka pucanju kemijskih veza unutar nje, a što se može primijeniti u djelovanju protiv tumorskih stanica. Budući da je metal jako toksičan, kompleksiranjem bakrovih iona kitozonom može se smanjiti toksičnost metala. Nadalje, bakar je osnovni element za normalan rast i razvoj (ljudskog i životinjskog) kostura. Potiče angiogenezu stabiliziranjem faktora HIF (engl. *hypoxia-inducible factors*) i VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) koji utječu na smanjenje dostupnosti kisika za stanice. Uslijed niske cijene i visoke stabilnosti, usporediv je sa skupim faktorima rasta [56,57]. Međutim, primjena bakrovih iona u biomedicinske svrhe ograničena je njegovom koncentracijom koja može uzrokovati toksičnost i mutacije stanica. Stoga je bitno točno definirati granice toksičnosti bakrovih iona.

Nasuprot kelatima s bakrovim(II) ionima, uzorci s cinkovim(II) ionima za ispitivane koncentracije ne pokazuju citotoksična svojstva: vrijednosti vijabilnosti stanica veće od 100 % upućuju na to da je utjecaj ispitivanih materijala bolji od utjecaja samog čistog medija.

Cink je drugi po zastupljenosti metal u ljudskoj krvi, odmah nakon željeza. Tijekom procesa zgrušavanja, Zn²⁺ ione oslobađaju aktivirani trombociti, a općenito im se koncentracija povećava u blizini tromba. To ukazuje da su cinkovi(II) ioni bitni za koagulaciju i trombozu [58]. Također, Zn²⁺ ioni važni su u inženjerstvu tkiva i kosti budući da je cink potreban za proliferaciju stanica. Smatra se da cink sudjeluje u mineralizaciji osteoblasta kroz proteine koji skladište cinkove ione te ih tako transportiraju. Nadalje, cink inhibira diferencijaciju osteoklasta, a potiče aktivnost osteoblasta kao i stvaranje kosti [44].

Prema slici 28 može se primijetiti neznatan pad vijabilnosti stanica s obzirom na vrijeme inkubacije, a ispitivani kelat kitozan–Zn²⁺ s 10 mmol dm⁻³, u odnosu na kelat s bakrovim(II) ionima iste koncentracije, ukazuje na 100 % veće preživljavanje stanica nakon 48 i 72 h. Ovakav rezultat upućuje da kelati s cinkovim(II) ionima nisu citotoksični. Također, promjena koncentracije cinkovih iona nije narušila staničnu vijabilnost.

Iako su bakar i cink slični po kemijskim i fizikalnim svojstvima, pretpostavlja se da je polovično popunjena d-orbitala bakrovih(II) iona odgovorna za jača oksidacijska svojstva bakra u odnosu na cink.



Slika 28. MTT test vijabilnost Hek293 stanica uzgojenih ekstraktom kserogelova kelata kitozan- M^{2+} tijekom 72 h pri 37 °C. Značajna razlika između dvije grupe definirana se s vrijednosti $p < 0,05$ (*).

5 ZAKLJUČAK

Kitozan je vrlo učinkoviti sorbens za metalne katione uslijed keliranja pri neutralnoj pH vrijednost medija, odnosno za metalne anione u kiselom mediju uslijed elektrostatskog privlačenja protoniranih amino skupina. Ovisno o molarnom omjeru metalnih iona i amino skupina, postoje dva mehanizma interakcija: „model privjeska“ te „model mosta“. Ovisno o mehanizmu koji prevladava, dolazi do različite konformacije makromolekula te konačne strukture materijala.

U ovom radu korištene su dvije vrste kitozana: srednje i visoke molekulske mase, kao i dva izvora hidroksidnih iona: koncentrirana otopina natrijevog hidroksida i zasićena atmosfera amonijaka. Kao metalni prekursori korištene su soli acetata bakra (Cu^{2+}) i cinka (Zn^{2+}).

Primjenom difuzne refleksije infracrvenog zračenja procijenjeni su stupnjevi deacetilacije korištenih kitozana: DD kitozana srednje molekulske mase iznosi ($73,13 \pm 4,42$) %, a kitozana više molekulske mase ($77,61 \pm 4,67$) %.

Umreživanje polimernih lanaca uslijed deprotoniranja amino skupina OH^- ionima nije dalo stabilne hidrogelove, za razliku od hidrogelova kelata kitozana s metalnim ionima (Cu^{2+} i Zn^{2+}). Iz toga se može zaključiti da su interakcije između centralnih (metalnih) iona i liganda (glukozaminskih jedinica kitozana) zaslužne za bolje umreživanje polimernih lanaca.

Primjenom UV-Vis spektroskopije potvrđeno je nastajanje kelata kitozan – metalni ion.

SEM mikrografije kserogelova prikazuju promjene mikrostrukture kelata kitozan– Cu^{2+} iz tubularne (usmjerene) u slojevitu strukturu povećanjem koncentracije metalnih iona. Za razliku od kelata kitozan– Cu^{2+} , promjenom koncentracije Zn^{2+} iona nisu zabilježene promjene u strukturi kelata kitozan– Zn^{2+} .

Na snimljenim FTIR spektrima kelata kitozan– $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ mogu se uočiti promjene na vrpama koje odgovaraju amino i hidroksilnim skupinama, a što ukazuje na sudjelovanje tih skupina u procesu keliranja metalnih iona. Budući da nisu uočene pojave novih vrpca, zaključuje se da između polimera i metalnih iona nije nastala kovalentna veza, već samo dolazi do elektrostatskih interakcija. Uspoređujući utjecaj molekulske mase kitozana te izvor hidroksidnih iona za geliranje, nisu pronađene dodatne promjene drugih apsorpcijskih vrpca.

Za razliku od difraktograma kelata kitozana srednje molekulske mase dobivenih geliranjem uz NH_3 koji ne pokazuju pojavu anorganskih kristalnih faza, geliranjem uz NaOH dobiveni su različiti bakrovi oksidi (Cu_3O_4 , CuO i Cu_2O). Kelati s kitozansom visoke molekulske mase dobiveni geliranjem uz NH_3 pokazuju prisutnost cinkovog oksida.

In vitro test citotoksičnosti (MTT test) pokazuje da su uzorci kitozana s bakrovim(II) ionima koncentracije veće od 3 mmol dm^{-3} citotoksični, dok uzorci s cinkovim(II) ionima za ispitivane koncentracije ne pokazuju citotoksična svojstva.

6 POPIS SIMBOLA

DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
PLA	poli(mliječna kiselina), polilaktid
PLGA	poli(mliječna- <i>co</i> -glikolna kiselina),
PCL	poli(ϵ -kaprolakton)
PDLLA	poliD,L-laktid
PGA	poli(glikolna kiselina)
PEG	poli(etilen-glikol)
NIPAAM	poli(<i>N</i> -izopropil-akrilamid)
DMSO	dimetil-sulfoksid
NMP	<i>N</i> -metil-2-pirolidon
TPP	natrijev tripolifosfat
NaHCO ₃	natrijev hidrogenkarbonat
TEMPO	2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil radikal
DD	stupanj deacetilacije (engl. <i>degree of deacetylation</i>)
DFT	teorija funkcionala gustoće (engl. <i>density functional theory</i>)
¹³ C NMR	nuklearna magnetna rezonancija
SEM	pretražna elektronska mikroskopija (engl. <i>scanning electron microscopy</i>)
DSC	diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. <i>differential scanning calorimetry</i>)
TGA	termogravimetrijska analiza
EDX	energijski disperzivna rendgenska analiza (engl. <i>energy-dispersive X-ray spectroscopy</i>)
XPS	rendgenska fotoelektronska spektroskopija (engl. <i>X-ray photoelectron spectroscopy</i>)
UV-Vis	ultraljubičasta-vidljiva spektrofotometrija
IR	infracrvena spektrometrija (engl. <i>infrared spectroscopy</i>)
AAS	atomska apsorpcijska spektroskopija
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
TEM	transmisijnska pretražna mikroskopija (engl. <i>transmission electron microscopy</i>)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid
C1	kitozan srednje molekulske mase

C2	kitozan više molekulske mase
M_w	molekulska masa
HAc	octena kiselina
NaOH	natrijev hidroksid, otopina natrijevog hidroksida
NH ₃	amonijak
FTIR	infracrvena spektroskopska analiza s Fourierovim transformacijama (engl. <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>)
XRD	kvalitativna rendgenska difrakcijska analiza (engl. <i>X-ray diffraction</i>)
DRIFT	difuzna refleksija infracrvenog zračenja (engl. <i>diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy</i>)
KBr	kalijev bromid
HEK293	ljudske embrionalne stanice (engl. <i>human embryonic kidney cells</i>)
PBS	otopina fosfatnog pufera
DMEM	biološki medij (engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
ATR	tehnika prigušene totalne refleksije (engl. <i>attenuated total reflectance</i>)
HIF	hipoksija inducirajući transkripcijski faktor (engl. <i>hypoxia-inducible factor</i>)
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>)

7 LITERATURA

- [1] Yahyaei, M., Mehrnejad, F., Naderi-manesh, H., Rezayan, A. H., Protein adsorption onto polysaccharides: Comparison of chitosan and chitin polymers, *Carbohydrate Polymers* **191** (2018) 191-197.
- [2] Hoven, V. P., Tangpasuthadol, V., Angkitpaiboon, Y., Vallapa, N., Kiatkamjornwong, S., Surface-charged chitosan: Preparation and protein adsorption, *Carbohydrate Polymers* **68** (2007) 44-53.
- [3] Nie, J., Wang, Z., Hu, Q., Chitosan Hydrogel Structure Modulated by Metal Ions, *Scientific reports* **6** (2016) 1-8.
- [4] Varma, A. J., Deshpande, S. V., Kennedy, J. F., Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review, *Carbohydrate Polymers* **55** (2004) 77-93.
- [5] Desbrières, J., Guibal, E., Chitosan for wastewater treatment, *Polym Int* **67** (2017) 7-14.
- [6] Sugunana, A., Thanachayanont, C., Dutta, J., Hilborn, J. G., Heavy-metal ion sensor using chitosan capped gold nanoparticles, *Sciences and Technology of Advanced Materials* **6** (2005) 335-340.
- [7] Gulrez, S. K. H., Al-Assaf, S., Phillips, G. O., Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications, u: Carpi, A. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering*, Rijeka, InTech (2011) 117-150.
- [8] Wu, T., Huang, J., Jiang, Y., Hu, Y., Ye, X., Liu, D., Chen, J., Formation of hydrogels based on chitosan/alginate for the delivery of lysozyme and their antibacterial activity, *Food Chemistry* **240** (2018) 361-369.
- [9] Vignesh, S., Sivashanmugam, A., Mohandas, A., Janarthanan, R., Iyer, S., Nair, S. V., Jayakumar, R., Injectable deferoxamine nanoparticles loaded chitosan-hyaluronic acid coacervate hydrogel for therapeutic angiogenesis, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **161** (2018) 129-138.
- [10] Hatefi, A., Amsden, B., Biodegradable injectable *in situ* forming drug delivery systems, *Journal of Controlled Release* **80** (2002) 9-28.
- [11] Ta, H. T., Dass, C. R., Dunstan, D. E., Injectable chitosan hydrogels for localised cancer therapy, *Journal of Controlled Release* **126** (2008) 205-216.
- [12] Fan, W., Yan, W., Xu, Z., Ni, H., Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **90** (2012) 21-27.

-
- [13] Liu, L., Tang, X., Wang, Y., Guo, S., Smart gelation of chitosan solution in the presence of NaHCO₃ for injectable drug delivery system, *International Journal of Pharmaceutics* **414** (2011) 6-15.
- [14] Nguyen, T. H. M., Abueva, C., Ho, H. V., Lee, S.-Y., Lee, B.-T., *In vitro* and *in vivo* acute response towards injectable thermosensitive chitosan/TEMPO-oxidized cellulose nanofiber hydrogel, *Carbohydrate Polymers* **180** (2018) 246-255.
- [15] Qu, J., Zhao, X., Ma, P. X., Guo, B., pH-responsive self-healing injectable hydrogel based on *N*-carboxyethyl chitosan for hepatocellular carcinoma therapy, *Acta Biomaterialia* **58** (2017) 168-180.
- [16] Cao, Y., Feng, J., Wu, P., Preparation of organically dispersible graphene nanosheet powders through a lyophilization method and their poly(lactic acid) composites, *Carbon* **48** (2010) 3834-3839.
- [17] Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., Fessi, H., Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations, *Advanced Drug Delivery Reviews* **58** (2006) 1688–1713.
- [18] Randolph, T. W., Phase Separation of Excipients during Lyophilization: Effects on Protein Stability, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **86** (1997) 1198-1203.
- [19] Millman, M. J., Liapis, A. I., Marchello, J. M., An Analysis of the Lyophilization Process Using a Sorption-Sublimation Model and Various Operational Policies, *AIChE Journal* **31** (1985) 1594-1604.
- [20] Chung, Y. C., Su, Y. P., Chen, C. C., Jia, G., Wang, H. L., Wu, J. C., Lin, J. G., Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall, *Acta Pharmacologica Sinica* **7** (2004) 932-936.
- [21] Kamjumphol, W., Chareonsudjai, P., Chareonsudjai, S., Antibacterial activity of chitosan against *Burkholderia pseudomallei*, *Wiley MicrobiologyOpen* **7** (2018) 1-8.
- [22] Rabea, E. I., Badawy, M. E.-T., Stevens, C. V., Smagghe, G., Steurbaut, W., Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action, *Biomacromolecules* **4** (2003) 1457-1465.
- [23] Yuan, Y., Chesnutt, B. M., Haggard, W. O., Bumgardner, J. D., Deacetylation of Chitosan: material Characterization and *in vitro* Evaluation via Albumin Adsorption and Pre-Osteoblastic Cell Cultures, *Materials* **4** (2011) 1399-1416.
- [24] Sudarshan, N. R., Hoover, D. G., Knorr, D., Antibacterial action of chitosan, *Food Biotechnology* **6** (1992) 257-272.
-

- [25] Czechowska-Biskup, R., Jarosińska, D., Rokita, B., Ulański, P., Rosiak, J. M., Determination of degree of deacetylation of chitosan - Comparison of methods, Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives **17** (2012) 5-20.
- [26] Guibal, E., Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review, Separation and Purification Technology **38** (2004) 43-74.
- [27] <http://goldbook.iupac.org/html/C/C01012.html> (pristup 18. svibnja 2018.)
- [28] Wang, X., Du, Y., Fan, L., Liu, H., Hu, Y., Chitosan-metal complexes as antimicrobial agent: Synthesis, characterization and Structure-activity study, Polymer Bulletin **55** (2005) 105-113.
- [29] Wu, F.-C., Tseng, R.-L., Juang R.-S., Role of pH in Metal Adsorption from Aqueous Solutions Containing Chelating Agents on Chitosan, Ind. Eng. Chem. Res. **38** (1999) 270-275.
- [30] Wu, F.-C., Tseng, R.-L., Juang, R.-S., A review and experimental verification of using chitosan and its derivatives as adsorbents for selected heavy metals, Journal of Environmental Management **91** (2010) 798-806.
- [31] Braier, N. C., Jishi, R. A., Density functional studies of Cu²⁺ and Ni²⁺ binding to chitosan, Journal of Molecular Structure (Theochem) **499** (2000) 51-55.
- [32] Wang, X., Du, Y., Liu, H., Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex, Carbohydrate Polymers **56** (2004) 21-26.
- [33] Rhazi, M., Desbrières, J., Tolaimate, A., Rinaudo, M., Vottero, P., Alagui, A., Contribution of the study of the complexation of copper by chitosan and oligomers, Polymer **43** (2002) 1267-1276.
- [34] Vasconcelos, H. L., Camargo, T. P., Gonçalves, N. S., Neves, A., Laranjeira, M. C. M., Fávere, V. T., Chitosan crosslinked with a metal complexing agent: Synthesis, characterization and copper(II) ions adsorption, Reactive and Functional Polymers **68** (2008) 572-579.
- [35] Bakshi, P. S., Kadirvelu, S. K., Kumar, N. S., Comparative study on antimicrobial activity and biocompatibility of *N*-selective chitosan derivatives, Reactive and Functional Polymers **124** (2018) 149-155.
- [36] Zheng, L. Y., Zhu, J. F., Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights, Carbohydrate Polymers **54** (2003) 527-530.
- [37] Chung, Y.-C., Wang, H.-L., Chen, Y.-M., Li, S.-L., Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens, Bioresource Technology **88** (2003) 179-184.

- [38] Gritsch, L., Lovell, C., Goldmann, W. H., Boccaccini, A. R., Fabrication and Characterization of Copper(II)-Chitosan Complexes as Antibiotic-free Antibacterial Biomaterial, *Carbohydrate Polymers* **179** (2018) 370-378.
- [39] Mosmann, T., Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *Journal of Immunological Methods* **65** (1983) 55-63.
- [40] Thaya, R., Malaikozhundan, B., Vijayakumar, S., Sivakamavalli, J., Jeyasekar, R., Shanthi, S., Vaseeharan, B., Ramasamy, P., Sonawane, A., Chitosan coated Ag/ZnO nanocomposite and their antibiofilm, antifungal and cytotoxic effects on murine macrophages, *Microbial Pathogenesis* **100** (2016) 124-132.
- [41] <https://www.atcc.org/~media/DA5285A1F52C414E864C966FD78C9A79.ashx> (pristup 20. svibnja 2018.)
- [42] Braz, E. M. A., Silva, S. C. C. C., da Silva, D. A., de Amorim Carvalho, F. A., Barreto, H. M., Júnior, L. S. S., da Silva Filho, E. C., Modified chitosan-based bioactive material for antimicrobial application: Synthesis and characterization, *International Journal of Biological Macromolecules* **117** (2018) 640-647.
- [43] Zheng, Y., Yi, Y., Qi, Y., Wang, Y., Zhang, W., Du, M., Preparation of chitosan-copper complexes and their antitumor activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **16** (2006) 4127-4129.
- [44] Tripathi, A., Saravanan, S., Pattnaik, S., Moorthi, A., Partridge, N. C., Selvamurugan, N., Bio-composite scaffolds containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-copper-zinc for bone tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecules* **50** (2012) 294-299.
- [45] Madihally, S. V., Matthew, H. W. T., Porous chitosan scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials* **20** (1999) 1133-1142.
- [46] Guibal, E., Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: a review, *Progress in polymer Science* **30** (2005) 71-109.
- [47] Hernandez, R. B., Reyes Yola, O., Ramalho Merce, A. L., Chemical equilibrium in the complexation of first transition series divalent cations Cu^{2+} , Mn^{2+} and Zn^{2+} with chitosan, *Journal of the Brazilian Chemical Society* **18** (2007) 1388-1396.
- [48] Duarte, M. L., Ferreira, M. C., Marvao, M., R., Rocha, J., An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy, *International Journal of Biological Macromolecules* **31** (2002) 1-8.

-
- [49] Brunel, F., Gueddari, N. E. E., Moerschbacher, B. M., Complexation of copper(II) with chitosan nanogels: Toward control of microbial growth, *Carbohydrate Polymers* **92** (2013) 1348-1356.
- [50] Milosavljević, N. B., Ristić, M. Đ., Perić-Grujić, A. A., Iliović, J. M., Štrbac, S. B., Rakočević, Z. Lj., Kalagasidis Krušić, M. T., Removal of Cu^{2+} ions using hydrogels of chitosan, itaconic and methacrylic acid: FTIR, SEM/EDX, AFM, kinetic and equilibrium study, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **388** (2011) 59-69.
- [51] Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., Zou, X., Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles, *Carbohydrate Research* **339** (2004) 2693-2700.
- [52] Ogawa, K., Effect of heating an aqueous suspension of chitosan on the crystallinity and polymorphs, *Agricultural Biology and Chemistry* **55** (1991) 2375-2379.
- [53] Bellini, J. V., Machado, R., Morelli, M. R., Kiminami, R. H. G. A., Thermal, Structural and Morphological Characterisation of Freeze-dried Copper(II) Acetate Monohydrate and its Solid Decomposition Products, *Materials Research* **5** (2002) 453-457.
- [54] Demir, M. M., Munoz-Espi, R., Lieberwirth, I., Wegner, G., Precipitation of monodisperse ZnO nanocrystals via acid-catalyzed esterification of zinc acetate, *J. Mater. Chem.* **16** (2006) 2940-2947.
- [55] Fiedler, J., Kolitsch, A., Kleffner, B., Henke, D., Stenger, S., Brenner, R. E., Copper and silver ion implantation of aluminium oxide-blasted titanium surfaces: proliferative response of osteoblasts and antibacterial effects, *Int J Artif Organs* **34** (2011) 882-888.
- [56] Rodriguez, J. P., Rios, S., Gonzalez, M., Modulation of the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells by copper, *Journal of cellular biochemistry* **85** (2002) 92-100.
- [57] Romero-Sánchez, L. B., Marí-Beffa, M., Carrillo, P., Medina, M. A., Díaz-Cuenca, A., Copper-containing mesoporous bioactive glass promotes angiogenesis in an *in vivo* zebrafish model, *Acta Biomaterialia* **68** (2018) 272-285.
- [58] Pan, M., Tang, Z., Tu, J., Wang, Z., Chen, Q. Xiao, R., Liu, H., Porous chitosan microspheres containing zinc ion for enhanced thrombosis and hemostasis, *Materials Science & Engineering C* **85** (2018) 27-36.

ŽIVOTOPIS

Andrea Lončarević [REDACTED] Medicinsku školu u Osijeku, smjer farmaceutska tehničarka, pohađala je od 2008. do 2012. godine, nakon čega upisuje preddiplomski studij *Kemija i inženjerstvo materijala* na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski studij *Kemija i inženjerstvo materijala* upisuje 2016. godine.

Od akademske godine 2014./2015. na Fakultetu je demonstratorica na laboratorijskim vježbama iz kolegija *Fizikalna kemija I* i *Fizikalna kemija II*, na Zavodu za fizikalnu kemiju.

U svibnju 2017. godine sudjeluje na radionici Polimeri iz perspektive kemičara i strojaru izlaganjem na temu *Enzimska razgradnja prirodnog polimera pri fiziološkim uvjetima*.

Tijekom lipnja i srpnja 2018. sudjeluje u programu stručne prakse *Coke Summership*, koju je organizirala Coca-Cola HBC Hrvatska.

Koautorica je znanstvenog članka: Andrea Lončarević, Marica Ivanković, Anamarija Rogina (2017) Lysozyme-Induced Degradation of Chitosan: The Characterization of Degraded Chitosan Scaffolds. *Journal of Tissue Repair and Regeneration* - 1(1):12-22 (URL: <https://openaccesspub.org/jtrr/article/657>).