Sinteza kitozanskih nanočestica

Šimunović, Marta

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:732979

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Marta Šimunović

Sinteza kitozanskih nanočestica

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji

Osijek, 2018

SADRŽAJ

1. Uvod ... 1
2. Opći dio ... 2
   2.1. Nanotehnolgija ... 2
      2.1.1. Svojstva nanočestica ... 3
      2.1.2. Omjer broja atoma na površini i unutrašnjosti čestica ... 3
   2.2. Primjena nanotehnologije ... 4
      2.2.1. Nanotehnologija u medicini i farmaciji ... 4
      2.2.2. Polimerni nosači ... 6
   2.3. Kitozan ... 6
      2.3.1. Općenito o kitozanu ... 6
      2.3.2. Svojstva kitozana ... 7
      2.3.3. Sinteza nanočestica kitozana ... 7
      2.3.4. Ionotropska gelacija ... 8
   2.4. Metode obrade nanočestica kitozana ... 8
      2.4.1. Transmisijski elektonski mikroskop (TEM) ... 9
      2.4.2. Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS) ... 10
3. Eksperimentalni dio ... 12
   3.1. Materijali i metode ... 12
      3.1.1. Materijali ... 12
      3.1.2. Metode ... 12
   3.2. Uvjeti i opažanja izvođenja eksperimenta ... 12
      3.2.1. Sinteza kitozanskih nanočestica ... 12
      3.2.2. Karakterizacija sintetiziranih kitozanskih nanočestica ... 13
4. Rezultati i rasprava ... 14
   4.1. DLS mjerenja ... 14
   4.2. TEM karakterizacija ... 17
5. Zaključak ... 23
6. Popis literature ... 24

Sažetak

Tema je ovoga rada sinteza kitozanskih nanočestica, a izbor teme vezan je uz zanimljivost primjenljivosti kitozana na brojnim poljima znanosti. Svrha završnoga rada je optimalizirati način dobivanja nanočestica kitozana u laboratorijskim uvjetima. Brojne su metode priprave nanočestica, metode za pripravu kitozanskih su *ionotropic gelation, microemulsion method, emulsification solvent difusion method, polyelectrolyte complexes, reverse micellar method*. U ovom završnom radu koristili smo metodu ionotropske gelacije (ionotropic gelation), ova metoda temelji se na povezivanju pomoću elektrostatskih interakcija između protonirane amino skupine kitozana i polianiona. Polimeri su spojevi velike molekulske mase, koji su načinjeni od osnovnih građevnih jedinica monomera koje se međusobno povezuju. Polimeri mogu biti prirodni, polusintetski i sintetski, primjeri prirodnih polimera su proteini, celuloza, škrob, nukleinske kiseline, a među polusintetske spada i kitozan koji se dobiva iz hitina. Hitin se može naći u nekim biljkama, ali u velikim količinama nalazi se u egzoskeletu člankonožaca i ljušturama školjaka. Kitozan je polimer koji se sastoji od dva monomera N-acetil-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoza i 2-amino-2deoksi-D-glukopiranoza, koje su međusobno povezane β-(1→4) glikozidnom vezom. Kitozan se za komercijalne potrebe najčešće dobiva postupkom deacetilacije hitina, koji se dalje koristi za razne potrebe od farmacije, medicine, poljoprivrede, sve do zaštite okoliša. Postupak deacetilizacije je najčešće odvija uz lužinu, kao što je natrijeva ili kalijeva hidroksida pri određenoj temperaturi. Fine čestice kitozana koje su potrebne za različite aplikacije u medicini ili farmaciji često imaju dimenzije manje od 500 nm. Nanočestice su korisne jer imaju posebna svojstva, koja se mogu razlikovati i od istih četica većih dimenzija, upravo zbog svojih malih dimenzija povećava se aktivna površina čestica. Odnosno razlog za promjenu svojstva kako kemijski tako i fizikalnih jest omjer površine i volumena čestice, odnosno omjer broja atoma koji se nalaze na površini čestice i unutar čestice. U nekim slučajevima nanočestica veći dio atoma može se naći na površini čestica nego u unutrašnjosti. Pomoću dobivenih rezultata ovoga rada mogu se sintetizirati nanočestice kitozana određene veličine pomoću preciznog modeliranja, odnosno preciznog odabira koncentracije i molarne mase kitozana te omjera kitozana i TPP(tripolifosfat).

Ključne riječi: nanotehnologija, nanočestice, kitozan, nanonosači lijekova

Abstract

The topic of this paper is the synthesis of chitosan nanoparticles, the theme selection is related to the interestingness of chitosan applicability in many fields of science. The purpose of the thesis is to optimize the method of obtaining chitosan nanoparticles in laboratory conditions. Numerous methods of preparation of nanoparticles exists, for chitosan nanoparticles preparation methods are: *ionotropic gelation, microemulsion method, emulsification solvent diffusion method, polyelectrolyte complexes, reverse micellar method*. In this thesis we have used the ionotropic gelation method, this method is based on the linkage by electrostatic atrractive forces between the chitosans protonated amino group and the polyanion. Polymers are compounds of high molecular weight which are made of the basic building blocks of monomers that are interconnected. Polymers can be natural, semi-synthetic and synthetic, examples of natural polymers are proteins, cellulose, starch, nucleic acid, and between polysynthetic and chitosan derived from the chitin. Chitin can be found in some plants, but in large quantities it is found in the exoskeleton of arthropods and shellfish shells. Chitosan is a polymers consisting of two monomers of N-acetyl-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose and 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose which are mutually linked to the β- (1 → 4) glycosidic linkage. Chitosan for commercial needs is most often obtained by the deacetylation process of chitin, which is further used for various purposes from pharmacy, medicine, agriculture to environmental protection. The deacetylation process is most commonly carried out with a base such as sodium or potassium hydroxide at a certain temperature. Fine chitosan particles required for different applications in medicine or pharmacy often have dimensions less than 500 nm. The nanoparticles are useful because they have special properties, which can be different from the large particles made of same material, because of their small dimensions, the active surface increases. The reason for the change of both the chemical and physical properties is that ratio of the surface and the volume of particles, or the ratio of the number of atoms located on the surface of the particle and within the particle. In some cases, most of the atoms can be found on the surface of the particles rather than in the interior. By means of the results obtained in this work,we can synthesize chitosan nanoparticles of a desired size by precise modeling, ie precise concentration and chitosan molecular mass selection, and chitosan to TPP (tripolyphosphate) ratios.

Key words: nanotechnology, nanoparticles, chitosan, drug nanoparticles

1. UVOD

Pomoću nanotehnologije dolazi do stvaranja novih i funkcionalnih materijala i naprava s kojima se unaprjeđuje cjelokupni tehnološki razvoj suvremenoga svijeta. Primjena nanomaterijala je sve veća pogotovo u područjima kao što su medicina i farmacija. Povezivanjem nanotehnologije, medicine i farmacije znanost ostvaruje veliki tehnološki napredak u 21.st. Nanotehnologija pomaže u sintetiziranju novih materijala pomoću namjerne i kontrolirane manipulacije na nivou atoma pri čemu nastaju materijali na nanoskali s fundamentalno novim svojstvima i funkcijama. Cilj je suvremene medicine i farmacije proizvesti lijekove koji liječe najteže bolesti kao, npr. karcinom, a da pritom imaju što manje neželjene nuspojave.

Biorazgradiv polimer kitozan ima veliki potencijal stupanja u reakciju s tkivima, organima, a da pritom ne izaziva neželjenu imunološku reakciju organizma i zbog toga ima veliku primjenjivost u razvoju nanonosača potrebnih za razvoj „pametnih“ lijekova. Pri tome je važno naglasiti kako je kitozan prirodni spoj koji se nalazi u brojnim živim organizmima i lagano ga možemo izdvojiti iz prirode. Upravo zbog svojih svojstava i dostupnosti postao je polimer koji se sve više istražuje i primjenjuje.

Cilj je ovoga rada sintetizirati nanočestice kitozana veličine od 10 do 150 nm koje bi učinkovito vršile ulogu nanonosača kao i izvršiti njihovu karakterizaciju. Sintetiziranje je provedeno pomoću ionotropske gelacije, koja se temelji na spontanom procesu povezivanja pomoću elektrostatskih interakcija između različito nabijenih iona, pozitivnih protoniranih amino grupa na kitozanu i negativnih polianiona. Svrha je ove metode dobiti nanočestice kitozane određene veličine koje su stabilne i koje se mogu koristiti kao učinkoviti nanonosači.

2. OPĆI DIO

2.1. Nanotehnolgija

Jedna je od brojnih definicija nanotehnologije osmišljavanje, karakterizacija, proizvodnja i primjena materijala, naprava i sustava kontrolom oblika i veličine na nanorazini (Kraljevska inženjerska akademija, Velika Britanija). Riječ nanotehnologija dolazi od grč. riječi nano što označava patuljak, a drugo značenje riječi nano potiče iz međunarodnih sustava jedinica za označavanje milijarditog dijela mjerne jedinice odnosno 10^{-9} . Nanotehnologija konvergira s drugim tehnologijama, osobito s biotehnologijama i informatičkim tehnologijama. Cilj nanotehnologije jest razviti nove proizvode i tehnologije koji će unaprijediti život ljudi u različitim područjima [1]. Nanotehnologija je važna jer je primjenjiva u mnogim dijelovima ljudske djelatnosti poput medicine, farmacije, zaštite okoliša, agrokulture, a sve u svrhu poboljšanja kvalitete života. Povijest je nanomaterijala vrlo stara, koristi se već tisuće godina iako nanotehnologija nije tako dugo poznata jer u to doba nije mogla biti shvaćena. Prvi nanomaterijali su se vjerojatno koristili u starom Egiptu pri izradi tinte, zatim je nehotično došlo do primjene nanotehnolgije u staklarstvu u Rimskom Carstvu. U srednjem vijeku za izradu stakla u boji koristila se nanotehnologija boja, koja ovisi o veličini i obliku čestica. Male i sferične nanočestice daju staklu crvenu boju dok izdužene čestice daju staklu ljubičastu ili plavu boju. U 16. stoljeću liječnik i kemičar Paracelsus pripravljao je lijekove od zlatnih nanočestica. U 19. stoljeću škotski botaničar Robert Brown bavio se gibanjima sitnih glinenih čestica u tekućem mediju i sitnim peludnim zrncima u zraku. Oko 1820. pomoću ultramikroskopa utvrđeno je da čestice peluda raspršene u tekućini neprekidno nasumce gibaju amo-tamo. Ta je pojava po njemu nazvana Brownovo gibanje. Ona je izravan dokaz kinetičke teorije plinova. Prema toj teoriji molekule fluida neprestano se nasumce gibaju, udaraju u čestice koje se vide mikroskopom i potiskuju ih amo-tamo. Što su veće te čestice, manja je razlika između broja molekula koje su se sudarile s česticama pojedinih strana i to se manje ističe njihovo Brownovo gibanje [1]. 1905. Albert Einstein formulirao je teoriju kojom je objasnio Brownovo gibanje. Razvojem tehnologije mikroskopa dolazi do naglog razvoja i same nanotehnologije. Početkom 21. stoljeća počinju se pojavljivati proizvodi bazirani na nanotehnologiji, npr. 2002. proizvedene su nanohlače, prvi nanoproizvod za široku potrošnju. Vrlo brzo se na tržištu pojavljuju i drugi komadi odjeće koji zahvaljujući sloju nanovlakana, odbijaju mrlje, tekućinu, a potom i drugi nanoproizvodi [2]. Nanotehnologija je tehnologija budućnosti, iako je učinak tih materijala gotovo posve

neistražen i postoje razlozi za zabrinutost zbog moguće akumulacije nanočestica u tlu ili vodi što za posljedicu može imati utjecaj na ljudsko zdravlje.

2.1.1. Svojstva nanočestica

Nanočestice su čvrste čestice s veličinom u području 1-100 nm, a pojavljuju se kao kristalične i amorfne. Kristalične se dijele na monokristale ili polikristale. Monokristalne čestice do 100 nm nazivaju se nanokristalima. *Cluster* ili nanoskupine obično se smatraju skupine atoma ili molekula do 50 jedinica iako se stručnjaci ne slažu oko broja 50 jedinica. Zbog svoje veličine nanočestice imaju različita svojstva od istovrsnog materijala u makroskali, može doći do promjene samo jednog svojstva, a može se više svojstva promijeniti. Osnovne razlike između nanočestica i makromaterijala:

1. različita elektronska struktura
2. nanočestice se ponašaju po pravilima kvantne mehanike dok makromaterijali klasične mehanike
3. nanočestice imaju znatno veći omjer površine i volumena u odnosu na makromaterijale
4. gravitacijska sile manje je važna, prevladavaju termokinetičke sile, a nasumično gibanje čestica ima veću važnost [3].

2.1.2. Omjer broja atoma na površini i unutrašnjosti čestica

Osnovni razlog zbog kojeg smanjenjem dimenzija čestica u nanopodručje dolazi do promjene kemijskih i fizikalnih svojstva jest promjena odnosa površine i volumena, tj. omjera atoma na površini i unutrašnjosti čestica. Omjer atoma na površini i unutrašnjosti vrlo je velik na nanoskali, odnosno veći broj atoma nalazi se na površini nego u unutrašnjosti čestice. Atomi u unutrašnjosti kristala ostvaraju sve moguće kemijske veze, dok atomi na površini nemaju tu mogućnosti. Što za posljedicu ima da atomi na površini imaju slobodne valenciju i veću energiju od atoma u unutrašnjosti. Energija kristalne rešetke jednaka je zbroju svih kemijskih veza, a kako nanočestice imaju veći dio atoma na površini dolazi do povećanja energije u odnosu na isti materija na makroskali.

2.2. Primjena nanotehnologije

2.2.1. Nanotehnologija u medicini i farmaciji

Nanotehnologija je postala široko znanstveno područje i brzo se razvija, stoga zahtijeva uključivanje raznih znanosti poput biologije, medicine kemije i drugih. Brojne su mogućnosti primjene nanomaterijala posebice u medicini i farmaciji. Primjenom novih spoznaja dolazi do preventivnog i ranog otkrivanja karcinoma, genetskih, infektivnih i drugih bolesti. Korištenje nanoobjekata u farmaciji omogućuje bolju učinkovitost lijeka i ciljanu dostavu samo na oboljela mjesta. U idealnim uvjetima nosači lijekova, a posebice u liječenju karcinoma, moraju imati određena benefitna svojstva. Moraju imati sposobnost prodiranja u stanice tumora sa što manjim gubitkom aktivne supstance lijeka tijekom cirkulacije. Zatim, moraju imati veliku selektivnost razaranja stanica tumora, a da pri tomu ne oštećuju zdrave stanice. Ovakav pristup liječenju utječe na kvalitetu života i pridonosi uspješnosti liječenja. Da bi liječenje bilo uspješno važno je da nanočestice ostanu u krvotoku, tj. da ne dođe do eliminacije iz organizma, a to ovisi o veličini i površini nanočestice. Veličina nanočestice mora biti dovoljno velika kako već na početku ne bi došlo do razaranja u krvotoku, a dovoljno mala kako bi mogla ući u maligne stanice. Idealna veličina ovisi o vrsti tkiva za koji je namijenjen lijek. Uz idealnu veličinu, nanočestica bi trebala imati odgovarajuću hidrofilnu površinu kako bi mogla „pobjeći“ obrambenom sustavu organizma. Osim toga, postoje i druge brojne mogućnosti primjene kao što su tkivno inženjerstvo, biosenzori i dr.

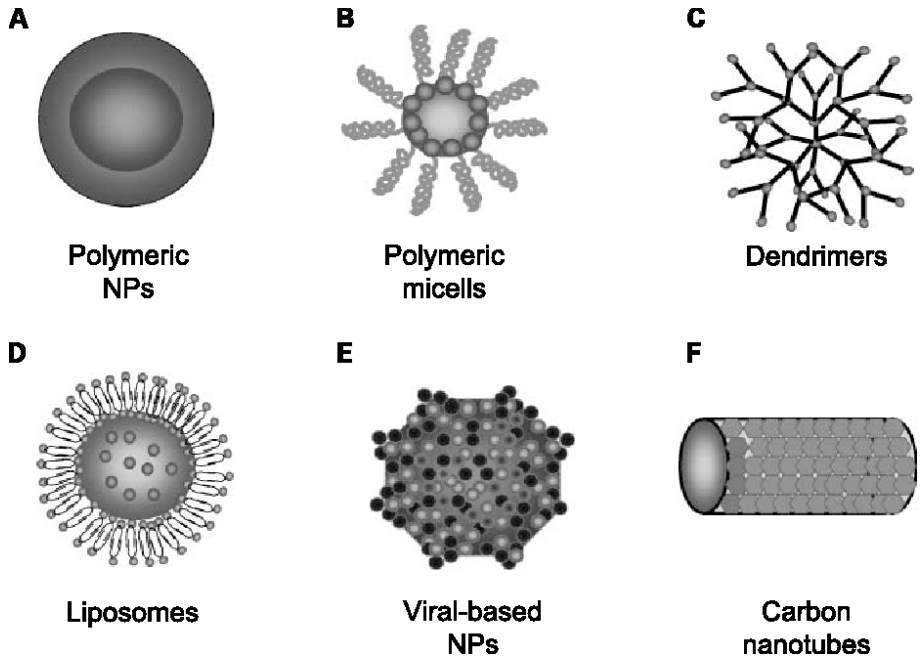
Učinkovitost brojnih lijekova limitirana je nemogućnošću dosega oboljelog mjesta. Konvencionalni lijekovi su neučinkoviti zbog smanjenje sposobnosti da se u potpunosti apsorbiraju na oboljelo mjesto, nego se većina lijeka oslobodi u cijelom tijelu i oštećuje zdrave stanice organizma. Stoga je cilj osmisliti način dostave lijeka na ciljano mjesto u organizmu sa što manjim toksičnim učinkom na ostatak organizma. U ostvarivanju toga cilja u medicini i farmaciji otvara se put upravo području nanotehnologije koja bi mogla ostvariti željeni učinak. U svemu tomu ključno je pronaći odgovarajući nanonosač lijekova (eng.drug nanocarrier) koji mora imati odgovarajuća svojstva:

- jednostavna sinteza i karakterizacija
- cijena proizvodnje
- biokompatibilnost
- biorazgradivost

- netoksičnost
- topivost u vodi [4]

Postoje različiti tipovi nanonosača, a svaki od njih ima svoje posebnosti:

- polimerni nanonosači
- polimerne micele
- dendrimer
- liposomi
- ugljikove nanocjevčice [5]



Slika 1. Prikaz različitih oblika nanonosača [5].

Osnovna se svojstva polimernih micela temelji na amfipatskim kopolimerima, koji se samouređenjem spajaju u jedinstvenu nanostrukturu u vodenoj otopini. Njezina se struktura sastoji od dvaju dijelova, hidofobnoga i hidrofilonga dijela. Dio koji je hidrofoban služi kao skladište za lijekove, dok hidrofilian dio okrenut je prema vodi i stabilizira cijelu strukturu i čini je topivom u vodi. Postoje dvije mogućnosti kako se lijek može ugraditi u ovu strukturu, prvi je način fizički, putem kapsule, a drugi vezanjem kovalentnom vezom.

Dendrimeri su sintetski makromolekularni polimeri nanoveličine, sastoje se od brojnih razgranatih monomera koji se radijalno šire iz centra. Svojstveno im je da su topivi u vodi, različite valencije, posjeduju šupljine u strukturu koje mogu služiti za prijenos lijeka.

Liposomi su slični organelu stanice koji može endocitozom ući u stanicu. Građen je od fosfolipida identičnih s fosfolipidima stanične membrane. Stvara se u laboratoriju dodavanjem vodene otopine fosfolipidnomu gelu. U liposome koji se unose u tijelo mogu se ugraditi različiti lijekovi i druge tvari (vitamini, kozmetički preparati, antigeni, enzimi, hormoni, virusi, genski materijal) [1].

Ugljikove nanocjevčice su molekule izgrađene samo od ugljikovih atoma, cilindričnog oblika. Od njihovog otkrića pa sve do danas predmet su zanimanja znanstvenika u području sinteze i primjene. Zbog svojih specifičnih svojstava poput električnih, mehaničkih i toplinskih, istraživanja idu u različitim smjerovima kao, npr. nanoelektronike, nanobiotehnologije. Problem je netopivost u svim otapalima, što može izazvati neka zdravstvena oštećenja organizma i toksičnosti. Ipak njihova primjena je moguća uz određene kemijske modifikacije.

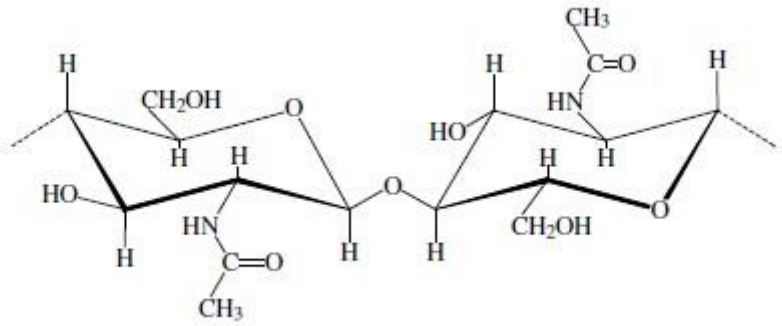
2.2.2. Polimerni nosači

Polimeri koji se koriste za izradu ovakvih nosača mogu biti prirodni ili sintetski. Prirodni polimeri poput albumina, kitozana i heparina mogu se koristiti kao prijenosnici brojnih tvari u organizmu, npr. proteina, DNA, nukleotida, a i lijekova. Brojna su pozitivna svojstva koja utječu na to da su dobri prijenosnici u organizmu, kao npr. topivosti u vodi, netoksičnosti, biorazgradivost, mogućnost modifikacije površine.

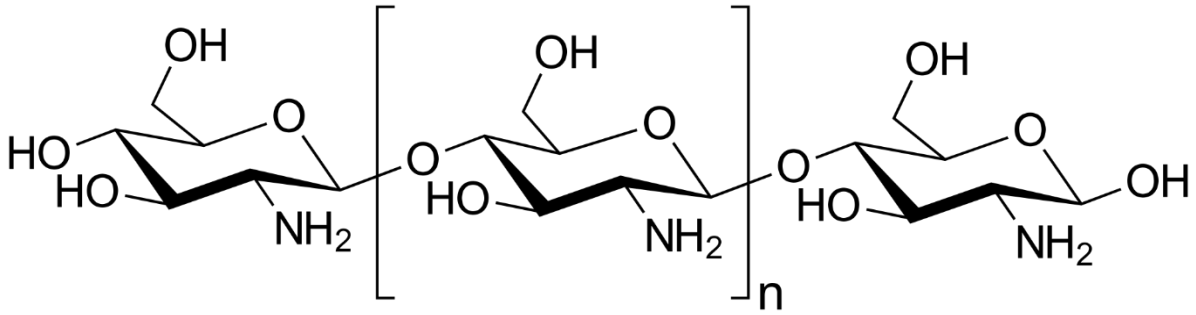
2.3. Kitozan

2.3.1. Općenito o kitozanu

Kitozan i hitin su polimeri dugih lanaca koji imaju molekularnu masu i do nekoliko milijuna Daltona. Kitozan je derivat hitina koji se dobiva N-deacetilacijom, hitin kao prirodni polimer može se pronaći u mekuščima, egzoskeletu člankonožaca. Hitin kao takav nije upotrebljiv jer je kemijski inertan, te se mora dodatno obraditi u kitozan. Tako dobiveni kitozan je reaktivniji i može biti u različitim oblicima poput paste, praha, filma. Kitozan je modificirani biokompatibilni polisaharid koji se sastoji od linearno povezanih monosaharida β-(1→4) glikozidnom vezom, sličan celulozi, no velika je razlika u tome što kitozan ima acetoamidne skupine, odnosno građen je od 2-amino-2-deoksi-b-D-glukoze. Za razliku od drugih prirodnih polimera kitozan ima pozitivan površinski naboj zbog kojeg ima veliku primjenu.



Slika 2. Kemijska struktura hitina.



Slika 3. Kemijska struktura kitozana.

2.3.2. Svojstva kitozana

Komercijalno dobiven kitozan ima molekularnu masu između 3800 i 300 000 Daltona, a stupanj deacetilacije iznosi između 66% i 95% [6]. Kitozan u neutralnom ili bazičnom pH nema pozitivan naboj, odnosno ne nalazi se u obliku kationa i ima slobodnu amino grupu zbog čega je netopiv u vodi. Dodatkom kiseline, amino skupina se protonira i kitozan postaje topiv u vodi. Brojna su kemijska svojstva kitozana, a jedno od njih je posjedovanje reaktivne amino skupine, dodatne slobodne hidroksilne skupine. Osim kemijskih, kitozan ima posebna biološka svojstva, kao što su biokompatibilnost, prirodan je polimer, siguran i netoksičan, biorazgradiv, sposoban da regenerira vezno tkivo čovjeka, ubrzava rast i obnovu kosti, ima antitumorska svojstva i brojan druga pozitivna svojstva. [7].

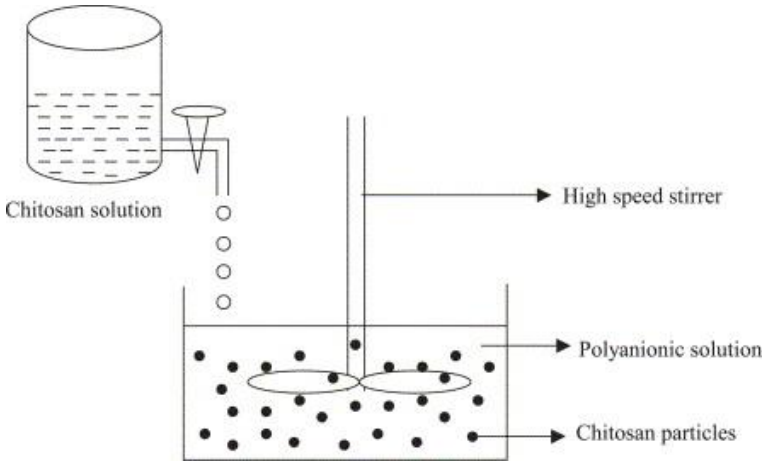
2.3.3. Sinteza nanočestica kitozana

Kitozanske nanočestice prvi puta bile su opisane 1994., napravljene su pomoću procesa emulzifikacije i *crosslinkinga.* Nakon toga, osmišljene su dodatne metode, kao što su *ionotropic gelation, microemulsion method, emulsification solvent difusion method, polyelectrolyte complexes, reverse micellar method* [8]. Ove metode spadaju u metode

molekularnog samouređenja ili samoorganizacije, koje karakterizira spontano stvaranje nanočestica iz solvatiranih molekula. Radi se o skupinama molekula koje sadrže relativno slabe molekulske interakcije, zbog toga mogu stvarati nanostrukture pri sobnoj temperaturi [3]. Najveće napore u prilagodbi i primjeni ovih tehnika ulaže farmaceutska industrija i proizvođači katalizatora, koji zahtijevaju vrlo specifične i čiste proizvode, kako bi se to moglo postići polazni materijali moraju imati što veću topivost i kemijsku reaktivnost. Stoga je bitno da svi procesi budu strogo kontrolirani.

2.3.4. Ionotropska gelacija

Ovu metodu prvi je osmislio P. Calvo (1997.). Priprema polimernih nanočestica u ovoj metodi temelji se na međusobnom povezivanju (*crosslinking*) elektostatskim silama kitozana sa svojom amino (-NH_2) skupinom koja je pozitivno nabijena i polianiona poput tripolifosfat(TPP) [9]. Ova se reakcija događa spontano pri sobnoj temperaturi i mehaničkom miješanju [8]. Odlučujući faktori koji utječu na karakteristike nanočestica jesu koncentracija kitozana, omjer TPP/kitozan, molekulska masa kitozana, pH i ionska jakost medija. Također je ustanovljeno kako dodatkom soli, poput NaCl dolazi do stabilizacije nanočestica, a uzrok tomu su dodatne elektrostatske veze iona soli i amino skupine kitozana jer na taj način ne dolazi do odbijanja između kostura kitozana i amino skupine. Time se povećava fleksibilnost polimera, a time se povećava i stabilnost [10]. Prilikom spontanog povezivanja molekule se međusobno reverzibilno vežu slabim međumolekulskim vezama, odnosno dolazi do spontane pojave krute strukture.



Slika 4. Shematski prikaz priprave nanočestica kitozana pomoću metode ionska gelacija [6].

2.4. Metode obrade nanočestica kitozana

U proizvodnji nanočestica bitno je karakterizirati svojstva dobivenog materijala, poput dimenzije, oblika, hrapavosti, pukotine, pore, moguće kristalne strukture i same deformacije u

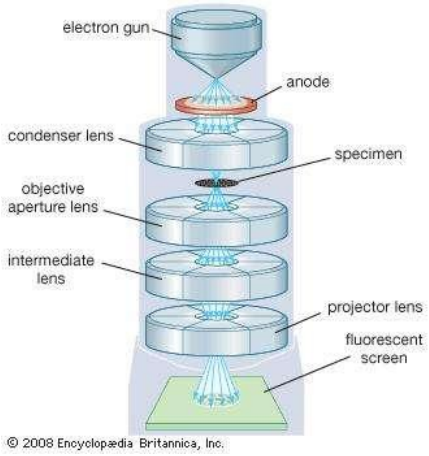
kristalnoj strukturi itd. Kako bi se mogla odrediti svojstva na nanoskali potrebnu su instrumenti koji mogu pratiti promjene u svojstvima poput veličine čestice, apsorpcije, emisije ili difrakcije zračenja, dok je primarna potreba za karakterizacijom na nanoskali mogućnosti vizualizacije samih nanočestica. Instrumenti poput elektronskih mikroskopa, transmisijski elektronski mikroskop (TEM), pretražni elektronski mikroskop (SEM), sondni mikroskop, pretražni tunelirajući mikroskop (STM) i mikroskop atomskih sila (AFM), omogućuju vizualizaciju nanočestica.

2.4.1. Transmisijski elektonski mikroskop (TEM)

TEM je jedan od najčešće korištenih instrumenata za nanokarakterizaciju jer može dati stvarnu sliku strukture materijala. U ovoj metodi karakterizacije elektronske zrake prolaze kroz uzorak i upravo zbog toga omogućuje detekciju strukture materijala i detalja unutar strukture materijala [11]. O debljini uzorka ovisi i transmisija, ako je uzorak dovoljno tanak elektroni djelomično prolaze kroz uzorak, ako je uzorak predebeo kroz njega neće moći proći ništa ili vrlo malo elektrona. Također ukoliko je uzorak pretanak kroz uzorak može proći previše elektrona. U prvome slučaju dolazi do pretamne slike, a u drugome do presvijetle slike. Osim o debljini propusnost elektrona, propusnost ovisi i o lokalnoj elektronskoj gustoći uzorka, što je elektronska gustoća manja to će više elektrona proći kroz uzorka i obrnuto. Više će elektrona proći kroz područja s lakšim elementima te će na mikrografiji ta područja biti svjetlija, dok će područja s težim elementima biti tamnija [3]. Transmisijski elektronski mikroskop (TEM) sličan je svjetlosnom mikroskopu, no razlikuju se u izvoru svjetla i leći. Izvor svjetla u svjetlosnome je vidljivo svjetlo, dok se u TEM koriste elektroni. U svjetlosnim mikroskopima koriste se staklene leće, dok se u elektronskim mikroskopima koriste elektromagnetske leće za kontrolu elektronskog snopa.

TEM se može podijeliti na tri područja: sustav osvjetljavanja, držač uzorka i sustav dobivanja slike. Izvor snopa elektrona je, tzv. elektronski top ili pištolj. Kontrola i poravnanje elektronskog pištolja ključni su za osiguranje zadovoljavajućeg rada [12]. Elektroni se iz katode izbijaju žarenjem ili bombardiranjem pozitivnim ionima, katoda je najčešće od volframa koji se koristi zbog svojih svojstva jer katoda bude jako zagrijana. Emitirane elektrone privlači pozitivno nabijena anoda, razlika potencijala između katode i anode vrlo je velika između 20 i 100 kV [3]. Brzina elektrona određena je upravo tim naponom, što znači da je u TEM poželjno da napon bude što veći kako bi elektroni bili brži i mogli lakše prolaziti kroz uzorak. Anoda ubrzava elektrone i propušta ih kroz središnji otvor i na taj se način stvara snop elektrona koji ima istu brzinu. Elektronske zrake fokusiraju se ili rasipaju

pomoću leća, odnosno elektronskih leća koja može biti elektrostatska ili magnetska. U TEM se nalaze tri vrste leća, a to su kondenzorske, objektivske i projektorske. Kondenzorske leće reguliraju širinu odnosno intenzitet snopa, obično instrumenti imaju dvije ovakve leće. Objektivska leća sabire snop elektrona na uzorak, ova leća određuje granicu razlučivosti instrumenta. Zadnja vrsta leće se naziva projektorska koja služi za povećanje slike, svaka leća koja se nalazi iza objektivske je projektorska. Važan dio TEM su i aperture koje služe za regulaciju širine snopa, čime utječu na kontrast i duljinu polja [3].



Slika 5. Osnovne komponente TEM-a [12]

Ovisno o kojim se elektronima koristi za dobivanje slike, postoje dvije mogućnosti nastanka slike, u svijetlom i tamnom polju. Prilikom radi s tehnikom svijetlog polja dolazi do selektiranja prolaska samo transmitiranim elektronima pomoću aperturom, tako da se selektira središnja točka koja odgovara nedifraktiranoj zraci. Ukoliko selektira samo difraktirane zrake, a onemogući prolazak direktnog snopa elektrona, nastaje slike u tamnom polju. Za nastanak slike potrebno je da uzorak bude određene debljine, odnosno da elektroni mogu djelomično proći kroz uzorak, odnosno transmitirati se.

2.4.2. Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS)

Efektivna je metoda za određivanje veličine dimenzija, oblika čestica u koloidnim suspenzijama na temelju Brownovog gibanja. Brownovo gibanje je slučajno kretanje čestica uslijed sudara uzrokovanim molekulama otapala koje okružuju čestice. Kada u suspenziji čestice budu pobuđene monokromatskim svjetlom lasera dolazi do promjene valne duljine ulaznog svjetla, ova pojava se naziva Dopplerov efekt, dolazi do male promjenu u frekvenciji raspršenog svjetla od neraspršenog svjetla. Upravo na temelju te promjene može se dobiti

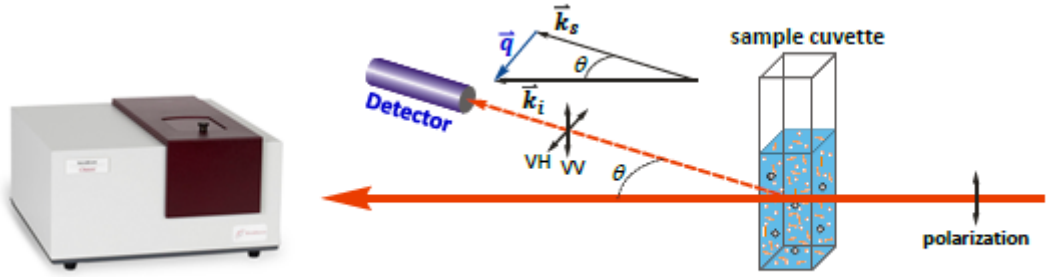
informacije o veličini, obliku i strukturi čestice [13]. Raspršenje svjetla česta je pojava u optici u kojem dolazi do preusmjeravanja elektromagnetskog vala kada dođe u kontakt s materijom. Kada svjetlost naiđe na prepreku dolazi do raspršenja, a svjetlost se time može reflektirati ili refraktirati.

Za male čestice čiji je promjer manji za desetinu valne duljine svjetlosti, vrijedi Rayleigheva teorija. Rayleighevo raspršenje je izotropno, odnosno jednako u svim smjerovima. Tehnika ovisi o intenzitetu fluktuacija vidljivog svjetla raspršenog na česticama dok se gibaju Brownovim gibanjem u tekućini. DLS mjeri brzinu Brownovog gibanja, na brzinu Brownovog gibanja utječu: veličina čestice, viskoznost uzorka i temperatura. Što je manja čestica, brzina Brownovog gibanja postaje veća i obrnuto. Brzina Brownovog gibanje se može odrediti pomoću translacijskog difuzijskog koeficijenta (D_t) pomoću kojeg se može mjeriti hidrodinamički promjer čestice (D_H). Prema Stokes-Einstein relaciji (1),

$$D_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \tag{1}$$

gdje je D_H hidrodinamički promjer, k Boltzmannova konstanta, T apsolutna temperatura, η koeficijent viskoznosti, a D difuzijski koeficijent.

DLS ima broje prednosti, koristi se za određivanje hidrodinamičke veličine različitih čestica. Vrijeme koje je potrebno za mjerenje vrlo je kratko i cijeli postupak je automatiziran. Dijelovi DLS-a su izvor svjetlosti koji je najčešće, ćelija za uzorak, najčešće cilindrična kiveta s promjerom između 10 - 30 nm, te ako je moguće s termostatom. Potom detektor i na kraju hardware komponentne povezane na detektor koje se koriste za obradu signal.



Slika 6. Osnovne komponentne DLS sustava [14].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.Materijali i metode

3.1.1. Materijali

-bijeli prah komercijalnog kitozana, molarne mase 200 000 - 300 000 Da i nepoznatog stupnja deacetilacije

-bijeli prah kitozana dobiven deacetilacijom hitina, molarne mase 60 000 - 180 000 Da i 30% većim stupnjem deacetilacije u odnosu na gore navedeni komercijalni kitozan

-10% ocetena kiselina

-otopina NaCl

-destilirana voda

-TPP (tripolifosfat)

3.1.2. Metode

-Dinamičko raspršivanje svjetlosti (Dynamic Light Scatering DLS) za određivanje veličine nastalih kitozanskih nanočestica

-Transmisijska elektronska mikroskopija (Transmission Electron Microscopy TEM)

3.2. Uvjeti i opažanja izvođenja eksperimenta

3.2.1. Sinteza kitozanskih nanočestica

Eksperiment se izvodio pri sobnoj temperaturi, u kiselom mediju, na miješalici pri 700 okr/min i u 0,1 molarnoj otopini NaCl. Korištene su različite koncentracije kitozana i različiti omjeri TPP/kitozan. Bijeli prah kitozana, komercijalni kitozan koji ima manji stupanj deacetilacije i kitozan koji je bio podvrgnut procesu deacetilacije zbog čega ima veći stupanj deacetilacije, izvaže se kako bi se napravila 1% otopina kitozana. Masa kitozana od 0,015 g se otopi u 10% otopini octene kiseline, otopina se obezboji. Može se uočiti kako se komercijalni kitozan teže otapa od drugog uzorka. Stajanjem na sobnoj temperaturi oba su se uzorka u potpunosti otopila. Sljedeći je korak bio priprema različitih koncentracija iz dvaju uzorka, a to su 0,05% 0,1% i 0,2% koncentracija kitozana. Potom je bilo potrebno napraviti 0,1 M otopinu NaCl. Omjer TPP/kitozana je bio 10:90. Miješanjem svih otopina s magnetskom miješalicom dobiva se prozirna otopina, uzorci koji su pravljeni iz tvorničkog kitozana koji nije bio dodatno deacetilirana nije se jednako uspješno otapao kao deacetilirani kitozan te se morao

dodatno otopiti pomoću ultrazvuka na minimalno 5 minuta ili dodatno po potrebi, pri čemu nastaje homogena otopina.

Tablica 1. Pripadni maseni udio(w) i volumeni (V) kemikalija korištenih pri sintezi nanočestica.

	w(otopine kitozana) / %	m (1%otpine kitozana) / g	V(0,1 moldm^{-3} NaCl) / mL	V(ukupan) / mL
UZORAK 1.[1]	0,05	1	19	20
UZORAK 2.[3]	0,1	2	18	20
UZORAK 3.[3]	0,2	4	16	20
UZORAK 4.[2]	0,05	1	19	20
UZORAK 5.[4]	0,1	2	18	20
UZORAK 6.[4]	0,2	4	16	20

3.2.2. Karakterizacija sintetiziranih kitozanskih nanočestica

DLS

Hidrodinamički promjer (d) i indeks polidisperznosti (PDI) određeni su dinamičkim raspršivanjem svjetlosti (DLS) pomoću Malvern Zetasizer Nano S instrumenta. Mjerenja intenziteta raspršene svjetlosti vršili smo u standardnim staklenim kivetama i kutu detekcije od 178°, za analizu i generiranje korelacijske funkcije koristili smo Zetasizer Software verzija 7.11 i analitički model Multiple Narow Peaks (high resolution).

TEM

Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM), snimke uzoraka snimili smo sa JEOL JEM 1200 EX II uređajem. Za mikroskopske eksperimente koristili smo bakrene rešetke (200 mesh) (Micro to Nano Ltd.) koji su bili presvučene s Butvar B-98 tankim transparentnim polimernim filmom kao nosača kitozanskih uzoraka.

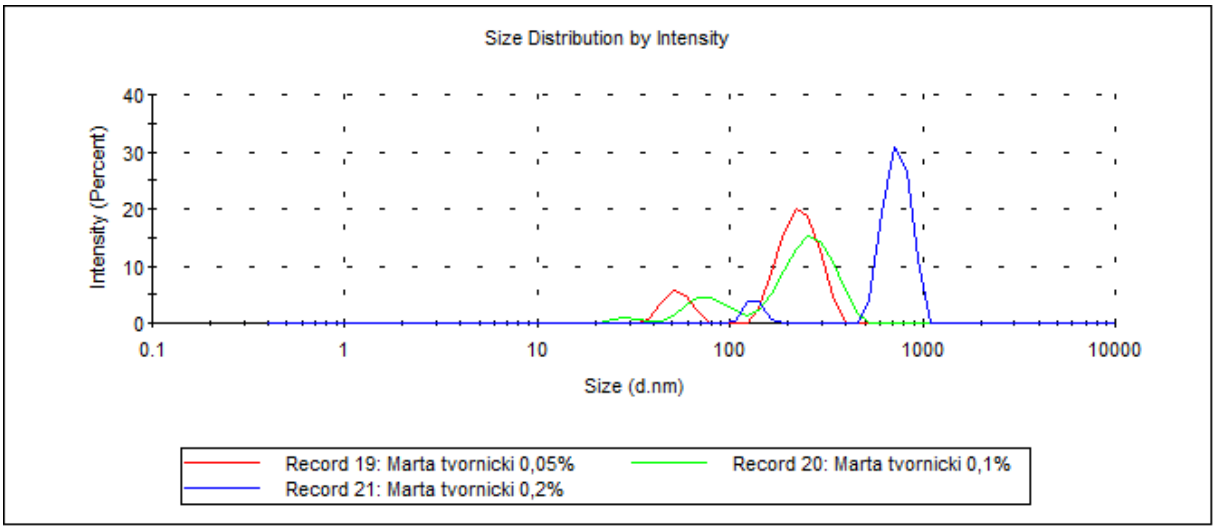
[1] Uzorak deacetiliranog kitozana
[2] Uzorak tvorničkog kitozana

4. REZULTATI I RASPRAVA

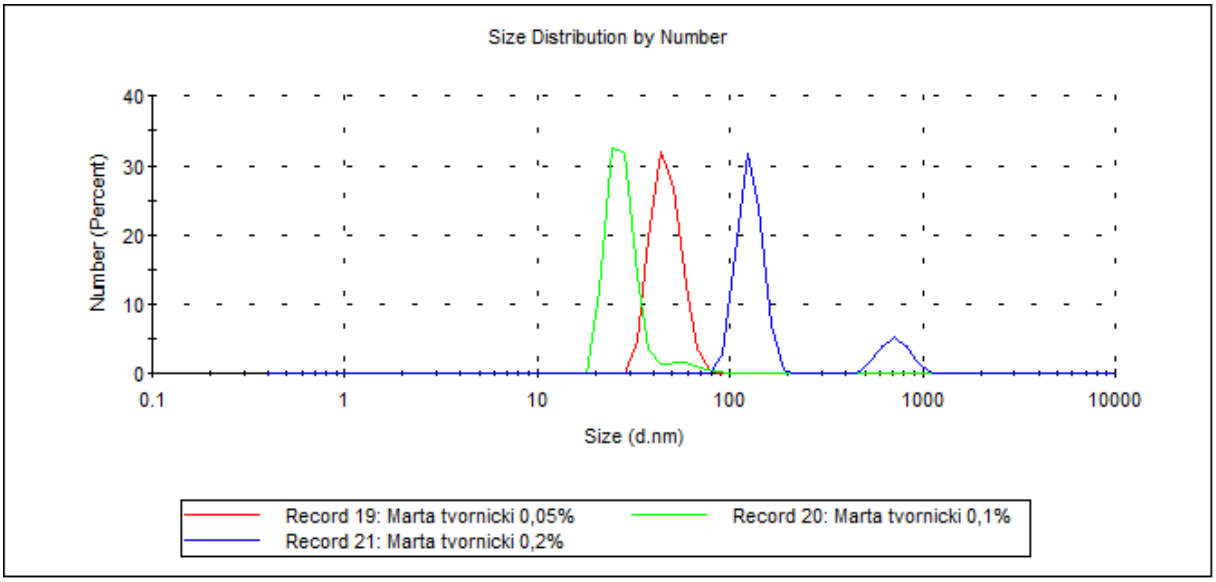
4.1. DLS mjerenja

Po PDI vrijednostima vidi se da su svi pripravljeni uzorci polidisperzni, veličina čestica se smješta u intervalu od 10 do 4000 nm, ali postoje dobro definirana područja.

Za uzorke pripravljene s tvorničkim kitozanom, prosječne molarne mase od 250 kDa pri koncentraciji od 0,05%m/m imamo dva dobro odvojena područja na grafu dobivenim kalkulacijama koje se baziraju na intenzitetu raspršene svjetlosti, s maksimumom veličine na 53 i 232 nm (slika 7.). Ako kalkuliramo distribuciju veličine čestica na osnovi broja određene veličine čestice vidi se da imamo samo jedan maksimum kod 55 nm (slika 8.) što znači da je više od 99% čestica te veličine. Za veće koncentracije karakteristično je da tako nastaju i veće čestice, što je u suglasnosti s osnovnim principima ionotropske preciptacije polimera. Kod koncentracije kitozana od 0,1% dobili smo tri frakcije, s vrhovima distribucije kod 27 nm, 55 nm i 222 nm. U najvećem broju imamo sitne nanočestice od 27nm čak 93,78%. PDI vrijednost je 0,440 zbog izuzetno širokog polja distribucije. Od otopine kitozana s najvećom koncentracijom dobili smo i najveće čestice uz isti omjer TPP i kitozana. Sistem se sastojao od jedne frakcije s maksimumom distribucije veličine čestica kod 745 nm i druge kod 132 nm računate po intenzitetu. Kod računanja distribucije mjera po broju čestica glavna frakcije je s maksimumom veličine kod 127 nm i 83%, Sažetak podataka određivanja veličine DLS metodom može se naći u tablici 2..

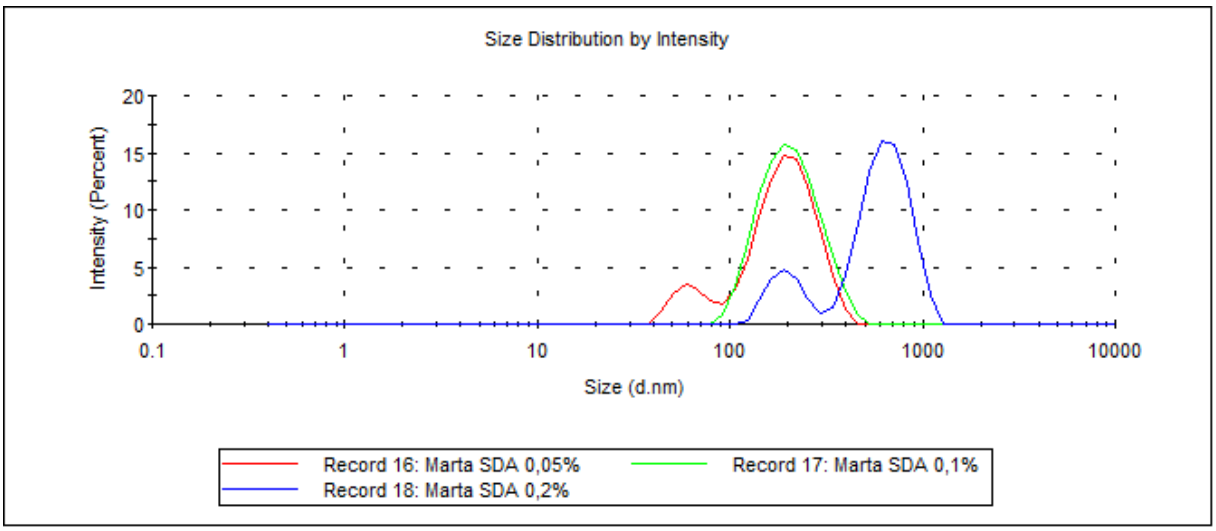


Slika 7. . Grafički prikaz podataka dobiveni DLS metodom

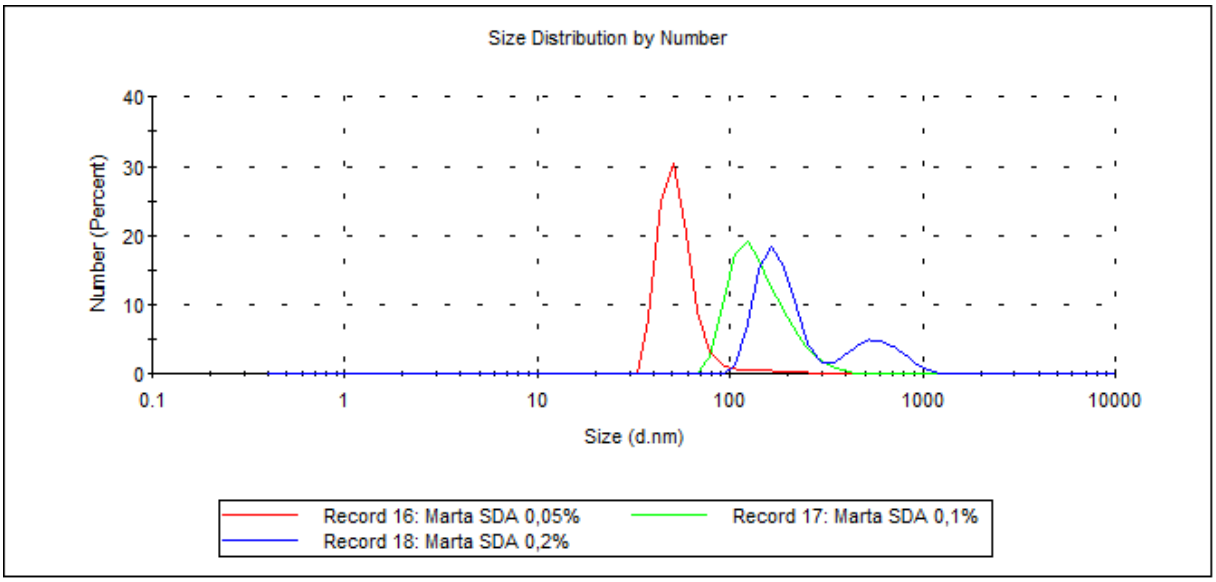


Slika 8. Grafički prikaz podataka dobiveni DLS metodom

Od uzoraka pripravljenih od kitozana prosječne molarne mase 120 kDa i 30 posto većim stupnjem deacetilacije dobili smo čestice koji imaju puno bolji PDI, što znači da im distribucija veličina puno uža. Ovo je naglašeno kod koncentracije 0,1% gdje smo dobili samo jednu frakciju s vrhom distribucije oko 212 nm na osnovi intenziteta i 147 nm na osnovi broja čestica. Pri velikim koncentracijama dobivamo polidisperznu distribuciju veličine zbog stvaranja i međusobnog povezivanja manjih čestica u aglomerate.



Slika 9. Grafički prikaz podataka dobiveni DLS metodom



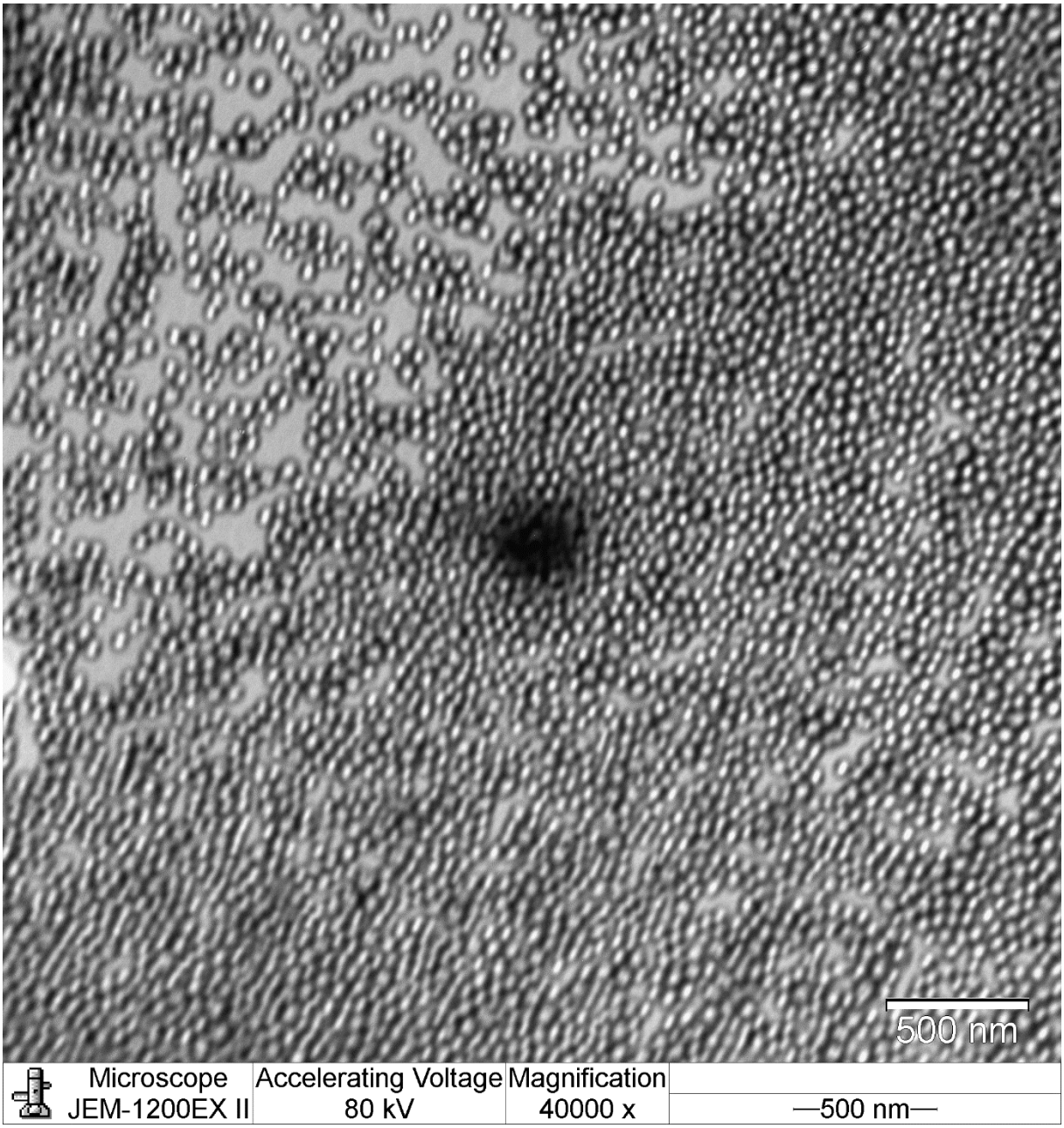
Slika 10. . Grafički prikaz podataka dobiveni DLS metodom

Tablica 2. Podatci određivanja veličine DLS metodom

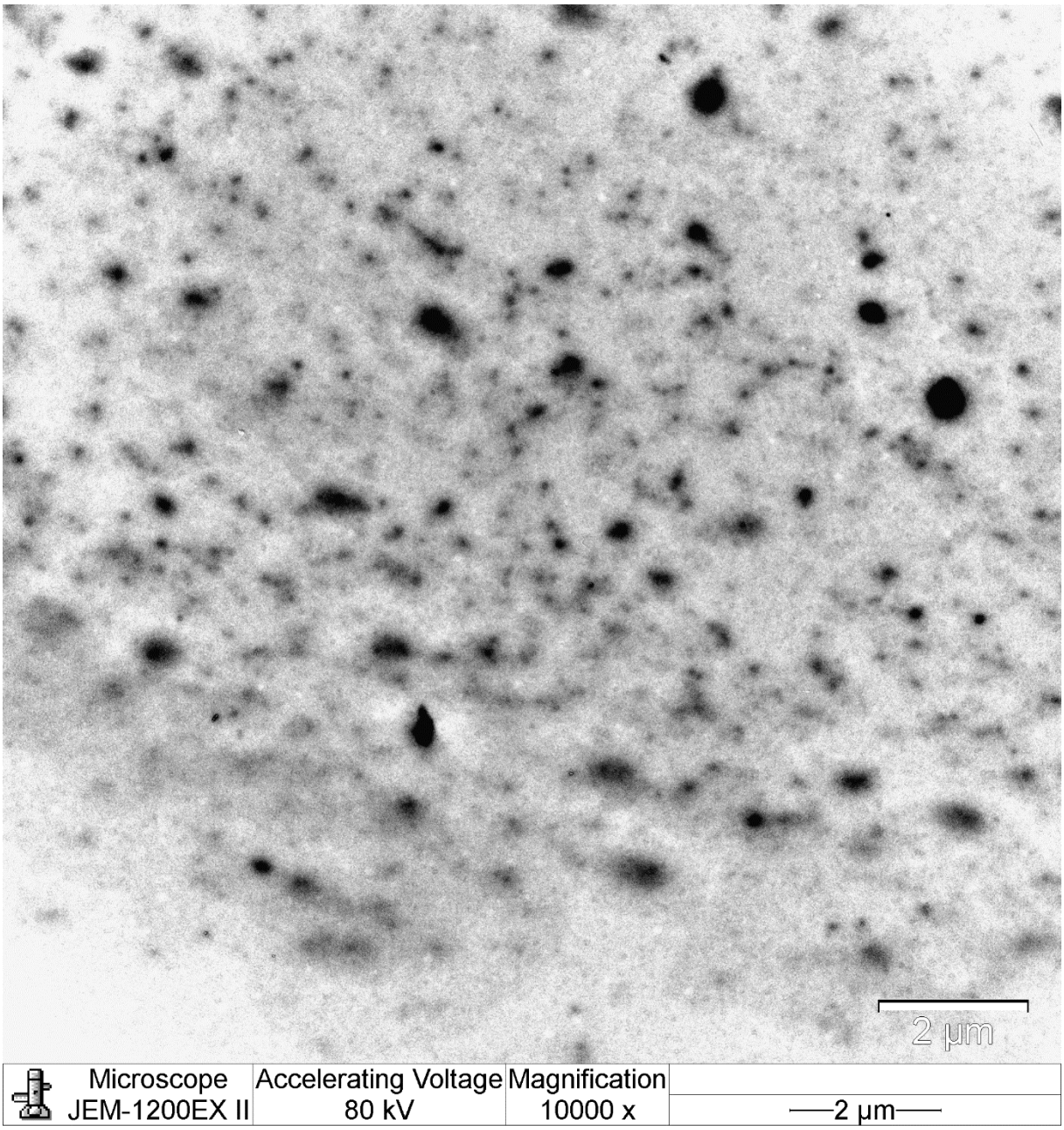
				Distribucija velicine na osnovi intezziteta rasprsene svjetlosti					
Uzorak	Koncentracija	prosjecna velicina	PdI	frakcija 1	frakcija 2	frakcija 3	frakcija 1	frakcija 2	frakcija 3
	% m/m	d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
Marta SDA 0,05%	0,05	148,7	0,248	206±65	65,32±14	0	86,1	13,9	0
Marta SDA 0,1%	0,1	180,3	0,189	212,7±73	0	0	100	0	0
Marta SDA 0,2%	0,2	431,6	0,429	659,6±180	197,8±41	0	81,9	18,1	0
Marta tvornicki 0,05%	0,05	157,4	0,44	232,3±83	53,35±16	0	83,3	16,7	0
Marta tvornicki 0,1%	0,1	165,1	0,458	264,4±74	78,71±20	29,48±2	77,1	20,7	2,2
Marta tvornicki 0,2%	0,2	553,4	0,566	745,7±14	132,8±13	0	91,6	8,4	0
				Distribucija velicine kitozanskih nanocestice na osnovi broja cestica					
	Koncentracija	prosjecna velicina	PdI	frakcija 1	frakcija 2	frakcija 3	frakcija 1	frakcija 2	frakcija 3
	% m/m	d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
Marta SDA 0,05%	0,05	148,7	0,248	55,74±22	0	0	100	0	0
Marta SDA 0,1%	0,1	180,3	0,189	147±54	0	0	100	0	0
Marta SDA 0,2%	0,2	431,6	0,429	179±47	596±175	0	73,6	26,2	0,2
Marta tvornicki 0,05%	0,05	157,4	0,44	46,97±8	206±51	0	99,5	0,5	0
Marta tvornicki 0,1%	0,1	165,1	0,458	27±5	58±14	222±68	93,8	6,1	0,1
Marta tvornicki 0,2%	0,2	553,4	0,566	127±13	724±134	0	83	17	0

4.2. TEM karakterizacija

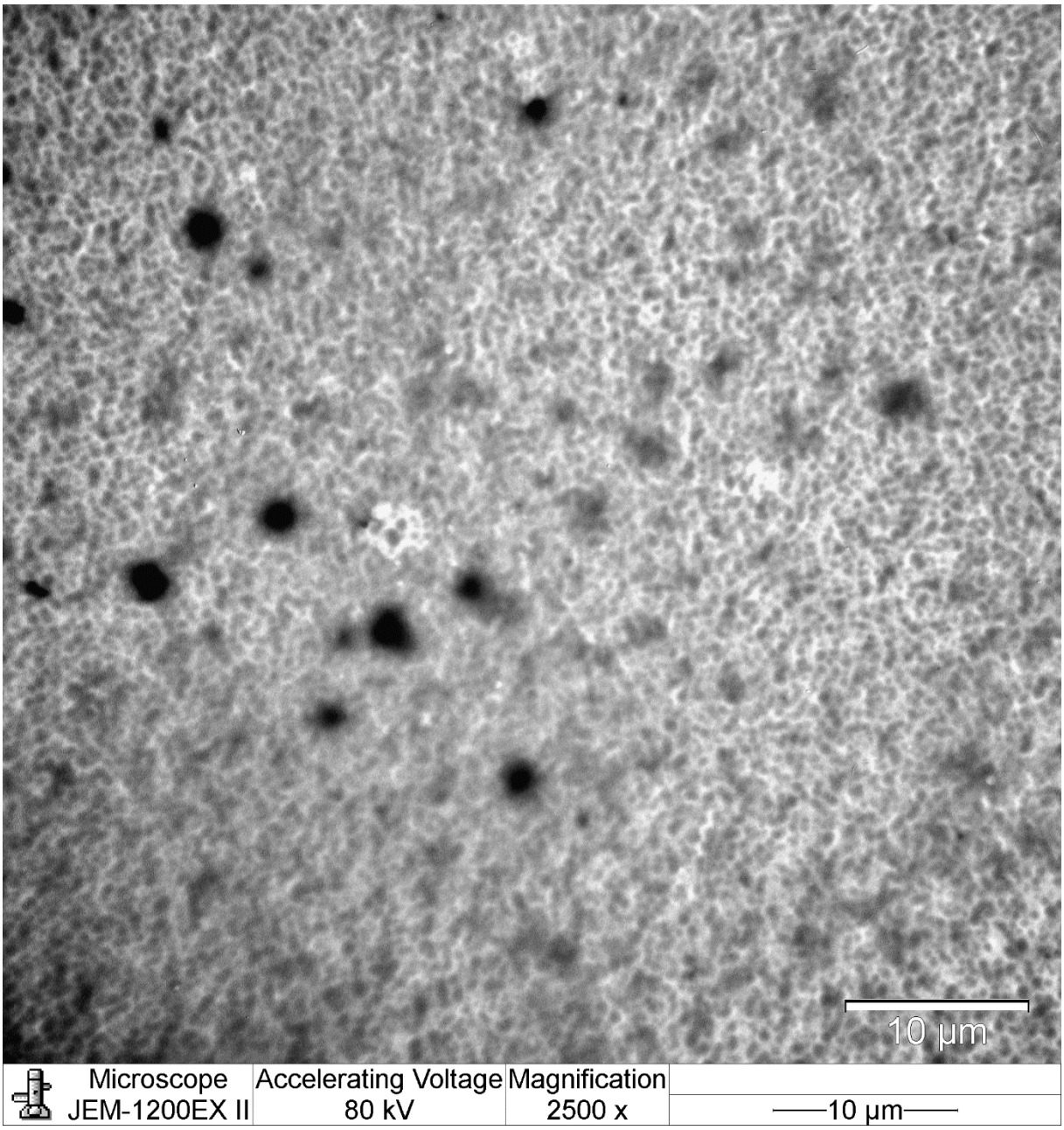
- TEM slike uzorak pripravljenih od otopine komercijalnog kitozana M=250 kDa



Slika 11. TEM prikaz kitozana C=0,05%

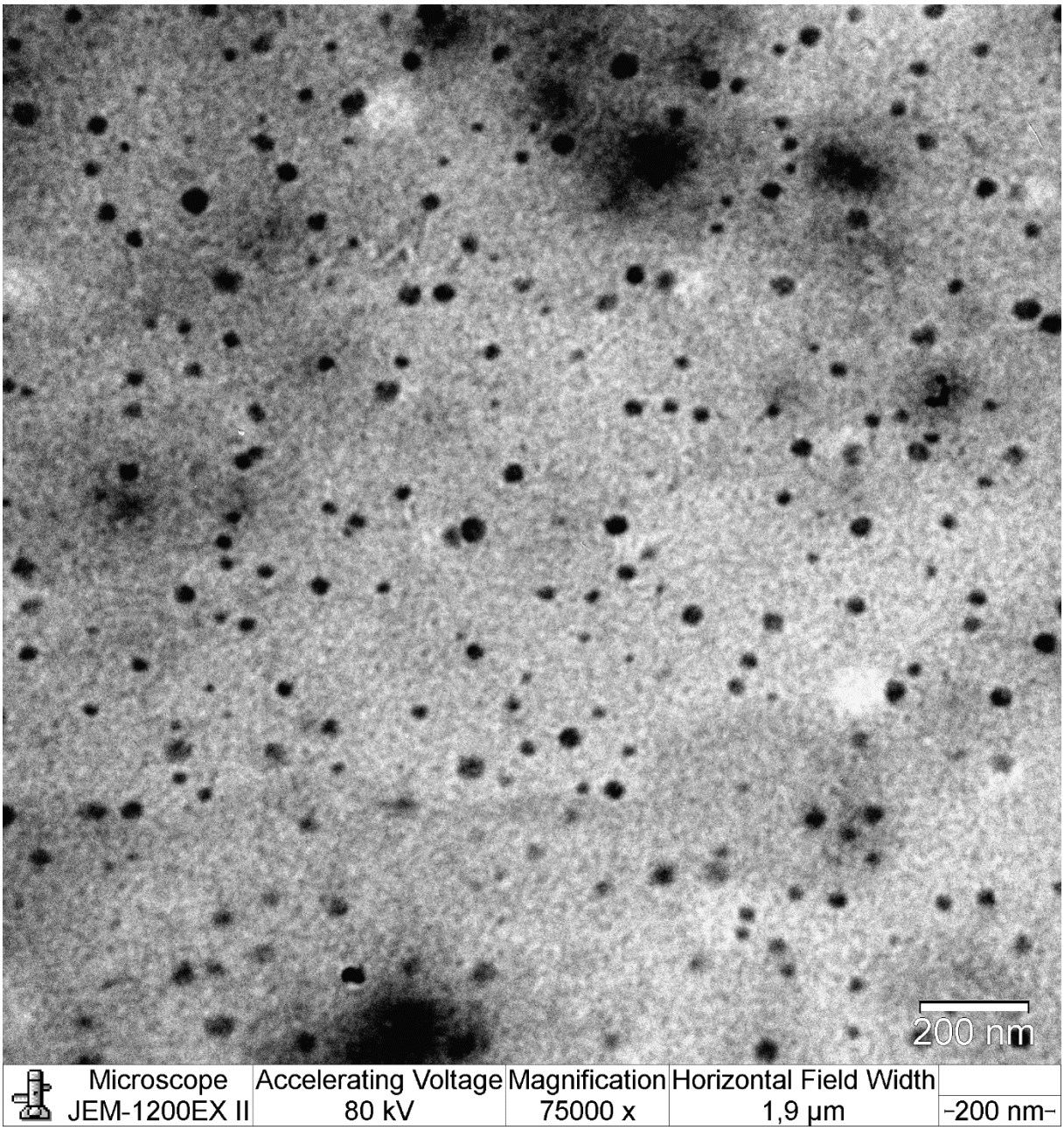


Slika 12. TEM prika kitozana C=0,1%

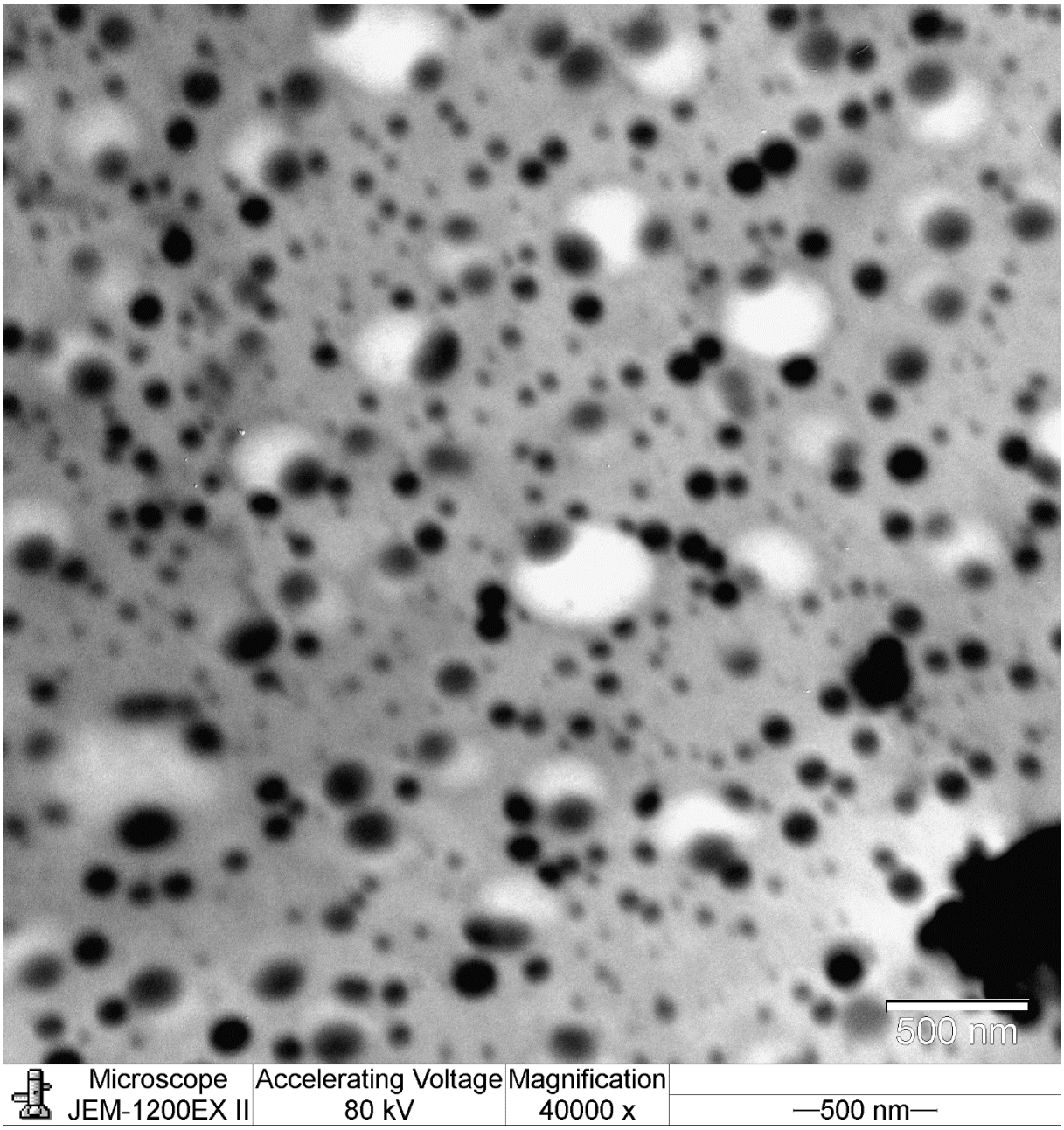


Slika 13. TEM prikaz kitozana C=0,2%

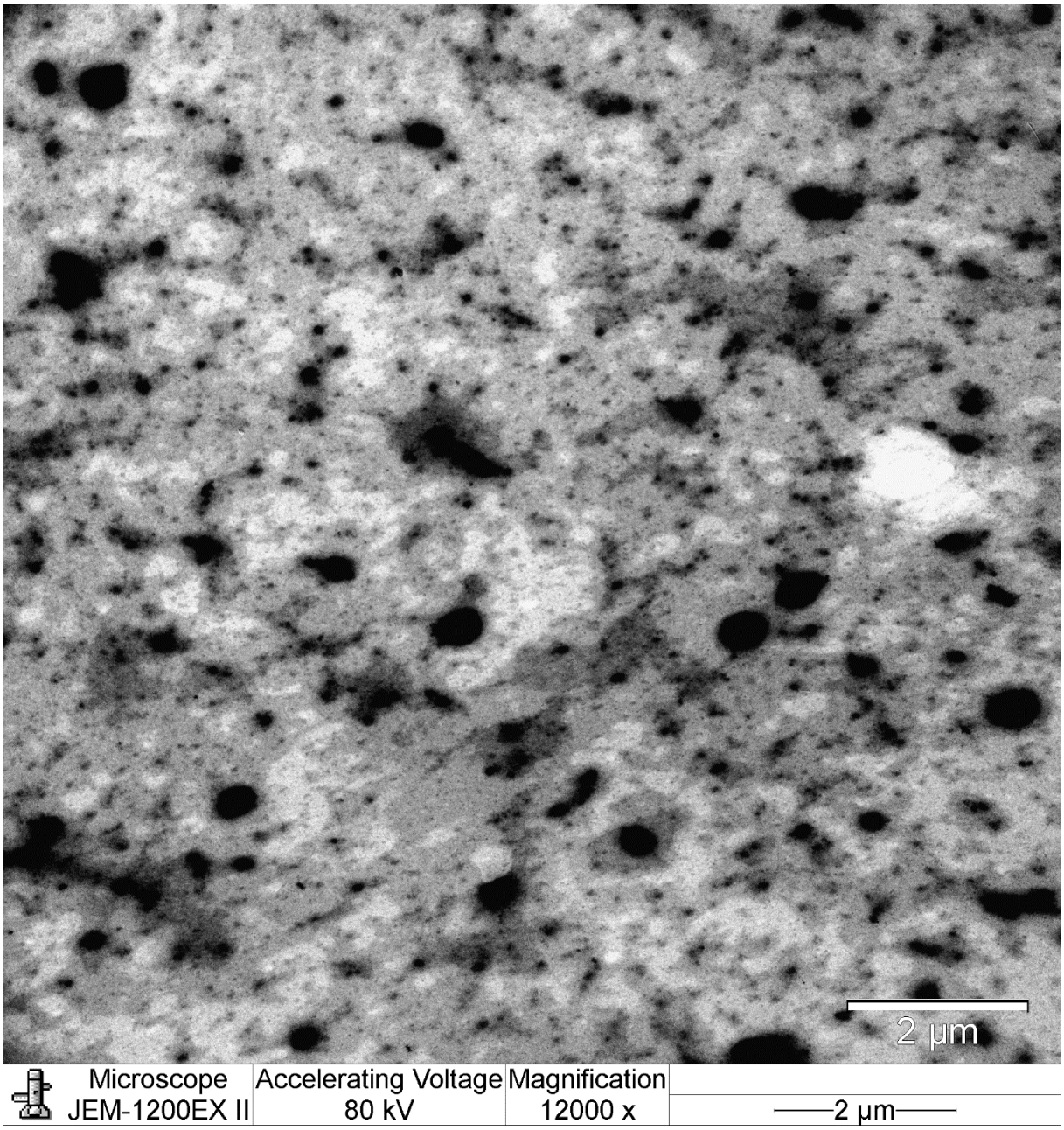
- TEM slike uzorak pripravljenih od otopine deaetiliranog kitozana M=120 kDa



Slika 14. TEM prikaz kitozana C=0,05%



Slika 15. TEM prikaz kitozana C=0,1%



Slika 16. TEM prikaz kitozana C=0,2%

5. ZAKLJUČAK

Uspješno smo izvršili sintezu kitozanskih nanočestica metodom ionotropske gelacije. Sintetizirane čestice karakterizirali smo DLS i TEM metodama. Iako je poznato da DLS metoda nije najpogodnija za određivanje veličine čestica polidisperznog sistema, rezultati se dobro podudaraju s TEM slikama, najvjerojatnije zbog korištenja Analitičkog modela Multiple Narow Peaks (high resolution). U svakom slučaju broj distribucija i njihova prosječna veličina se podudaraju. Na osnovi rezultata (tablica 2.) možemo utvrditi da od otopine kitozana s povećanim stupnjem deacetilacije i manjom molarnom masom možemo sintetizirati kitozanske čestice s odgovarajućom distribucijom veličina. Za proizvodnju strogo monodisperznog sustava mehaničko miješanje i precipitacija iontropskom gelacijom nije odgovarajuća metoda.

6. POPIS LITERATURE :

[1] http://www.enciklopedija.hr/ (pristup: 30.08.2018)

[2] Y. W. H. Wong1 , C. W. M. Yuen1 , M. Y. S. Leung1 , S. K. A. Ku1 i H. L. I.; AUTEX Research Journal, Vol. 6, No 1, March 2006

[3] S. Kurajica, S. Lučić Blagojević; Uvod u nanotehnologiju, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Zagreb 2017.

[4] Waree Tiyaboonchai; Chitosan Nanoparticles : A Promising System for Drug Delivery; Naresuan University Journal 2003; 11(3): 51-66

[5] K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z.G. Chen, D.M. Shin; Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer, Clin Canser Res 2008;14(5) March 1, 1310-1316

[6] S.A. Agnihotri , N.N. Mallikarjuna, T.M. Aminabhavi ; Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery; J Control Release. 2004 Nov 5;100(1):5-28.

[7] M. Rinaudo; Chitin And Chitosan—General Properties And Applicatio; Cheminform 38(7):603-632, July 2007

[8] K.Divya, M.S. Jisha; Chitosan Nanoparticles Preparation And Applications, March 2018, Volume 16, Issue 1, Pp 101–112

[9] H.Jonassen, A.L Kjøniksen, M.Hiorth; Stability of Chitosan Nanoparticles Cross-Linked with Tripolyphosphate; Biomacromolecules 2012, 13, 3747−3756

[10] L. Ilium; Chitosan and Its Use as a Pharmaceutical Excipient, Pharmaceutical Research, September 1998, Volume 15, Issue 9, pp 1326–1331

[11] H.J. Kleebe, S. Lauterbach, M. Müller; Transmission electron microscopy (TEM); BUNSEN-MAGAZIN, 12. JAHRGANG, 5/2010

[12] https://www.britannica.com/technology/transmission-electron-microscope,

(pristup: 10.09.2018)

[13] S.Thomas, R. Thomas, A.K. Zachariah, R. K. Mishra; Thermal And Rheological Measurement Techniques For Nanomaterials Characterization; Volume 3, 1st Edition, pp 37-45

[14] https://www.brookhaveninstruments.com/ (pristup: 11.09.2018)