

# Sinteza i karakterizacija šupljih nanosfera poli(alilamina) i poli(akrilne kiseline)

---

Peranić, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:533356>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-08**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Nikolina Peranić

**SINTEZA I KARAKTERIZACIJA ŠUPLJIH  
NANOSFERA POLI(ALILAMINA) I  
POLI(AKRILNE KISELINE)**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2020.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za fizikalnu kemiju Kemijskog odsjeka  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc.  
Davora Kovačevića i neposrednim voditeljstvom Tina Klačića, mag. chem.



## Zahvale

Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Davoru Kovačeviću na ustupanju zanimljive teme, pruženom povjerenju i razumijevanju te podršci i pomoći tijekom izrade ovog rada.

Neposrednom voditelju, asistentu Tinu Klačiću, zahvaljujem na svim savjetima i strpljenju tijekom eksperimentalnog i pisanog dijela rada, ugodnim raspravama te snimanju AFM slika.

Zahvaljujem Borni Radatoviću, mag. phys., na snimanju SEM slika i EDX spektara te prenesenom znanju o tim metodama. Barbari Panić, mag. chem., zahvaljujem na snimanju IR spektara.

Veliko hvala mojim prijateljima i kolegama na podršci tijekom studija, razumijevanju i povjerenju te na mnoštvu lijepih trenutaka tijekom ovih godina.

Najveće hvala mojim roditeljima na pruženoj ljubavi, strpljenju, podršci, odricanju i razumijevanju tijekom cijelog školovanja. Mojim sestrama hvala na potpori tijekom studiranja te slušanju o ispitima, diplomskom radu i svim ostalim fakultetskim izazovima.



# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XI</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Polielektroliti .....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Svojstva i primjena polielektrolita .....	2
2.1.2. Klasifikacija polielektrolita.....	3
<b>2.2. Polielektrolitni višeslojevi.....</b>	<b>5</b>
2.2.1. Svojstva i primjena polielektrolitnih višeslojeva.....	5
2.2.2. Priprava polielektrolitnih višeslojeva .....	6
2.2.3. Interakcije pri nastajanju polielektrolitnih višeslojeva.....	8
2.2.4. Čimbenici koji utječu na nastajanje polielektrolitnih višeslojeva.....	9
<b>2.3. Šuplje sfere od polielektrolitnih višeslojeva.....</b>	<b>14</b>
2.3.1. Svojstva šupljih sfera .....	14
2.3.2. Primjena šupljih sfera .....	15
2.3.3. Sinteza šupljih sfera .....	16
2.3.4. Supstrati i njihovo uklanjanje .....	18
<b>2.4. Hidroksiapatit.....</b>	<b>19</b>
2.4.1. Svojstva hidroksiapatita.....	20
2.4.2. Primjena hidroksiapatita .....	21
<b>2.5. Kalcijev karbonat.....</b>	<b>22</b>
2.5.1. Svojstva i primjena kalcijeva karbonata.....	22
<b>§ 3. TEORIJSKA OSNOVICA.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1. Mikroskopija atomskih sila.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija .....</b>	<b>26</b>
<b>§ 4. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1. Materijali .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2. Računanje topljivosti hidroksiapatita .....</b>	<b>29</b>
<b>4.3. Sinteza šupljih sfera .....</b>	<b>31</b>
4.3.1. Polielektrolitni višeslojevi na česticama kalcijeva karbonata .....	31
4.3.2. Polielektrolitni višeslojevi na česticama hidroksiapatita.....	31
4.3.3. Uklanjanje supstrata i sinteza šupljih sfera .....	32



---

<b>4.4. Instrumentne metode</b> .....	<b>32</b>
4.4.1. <i>Mjerenja elektrokinetičkog potencijala</i> .....	32
4.4.2. <i>Dinamičko raspršenje svjetlosti</i> .....	33
4.4.3. <i>Infracrvena spektroskopija</i> .....	33
4.4.4. <i>Mikroskopija atomskih sila</i> .....	34
4.4.5. <i>Skenirajuća elektronska mikroskopija</i> .....	34
<b>§ 5. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>35</b>
<b>5.1. Mjerenja elektrokinetičkog potencijala</b> .....	<b>35</b>
<b>5.2. Dinamičko raspršenje svjetlosti</b> .....	<b>42</b>
<b>5.3. Infracrvena spektroskopija</b> .....	<b>46</b>
<b>5.4. Mjerenja mikroskopom atomskih sila</b> .....	<b>50</b>
<b>5.5. Skenirajuća elektronska mikroskopija</b> .....	<b>56</b>
<b>§ 6. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>64</b>
<b>§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA</b> .....	<b>66</b>
<b>§ 8. LITERATURNI IZVORI</b> .....	<b>67</b>
<b>§ 9. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>LXXI</b>



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### SINTEZA I KARAKTERIZACIJA ŠUPLJIH NANOSFERA POLI(ALILAMINA) I POLI(AKRILNE KISELINE)

Nikolina Peranić

Naizmjeničnom adsorpcijom pozitivno i negativno nabijenih polielektrolita na površinu supstrata (npr. koloidne čestice) nastaju tanki filmovi zvani polielektrolitni višeslojevi. U slučaju adsorpcije na sferične čestice moguće je (uklanjanjem supstrata) prirediti šuplje sfere mikrometarskih ali i nanometarskih dimenzija koje imaju različita fizikalno-kemijska svojstva. Zbog velikog broja dostupnih polimernih spojeva navedeni sustavi nalaze svoju primjenu u područjima biomedicine, katalize i sinteze funkcionaliziranih nanomaterijala. U ovom radu uspješno su sintetizirane šuplje nanosfere slabih polielektrolita, poli(alilamina) i poli(akrilne kiseline), pri čemu su kao supstrati korištene čestice hidroksiapatita. Nastanak polielektrolitnog višesloja na koloidnim česticama praćen je mjerenjem elektroforetske pokretljivosti čestica, a uklanjanje supstrata provedeno je otapanjem u prisustvu klorovodične kiseline. Metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti određen je efektivni hidrodinamički promjer dobivenih polielektrolitnih kapsula, a mikroskopijom atomskih sila i skenirajućom elektronskom mikroskopijom dobivene su informacije o morfologiji i veličini nanosfera. Infracrvenom spektroskopijom i energijski disperzijskom rendgenskom analizom potvrđeno je uklanjanje supstrata.

(83 stranice, 51 slika, 4 tablice, 76 literaturnih navoda, izvornik na hrvatskom jeziku)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: hidroksiapatit, nanosfere, poli(akrilna kiselina), poli(alilamin), polielektrolitni višeslojevi

Mentor: prof. dr. sc. Davor Kovačević  
Neposredni voditelj: Tin Klačić, mag. chem.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Davor Kovačević
  2. prof. dr. sc. Željka Soldin
  3. doc. dr. sc. Adriana Kendel
- Zamjena: prof. dr. sc. Tajana Begović

Datum diplomskog ispita: 22. prosinca 2020.





University of Zagreb

Faculty of Science

**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF HOLLOW NANOSPHERES OF POLY(ALLYLAMINE) AND POLY(ACRYLIC ACID)

Nikolina Peranić

By alternating adsorption of positively and negatively charged polyelectrolytes on the surface of the substrate (e.g. colloidal particles), thin films called polyelectrolyte multilayers are formed. In the case of adsorption on spherical nanoparticles it is possible (by removing the substrate) to prepare hollow spheres of micrometer and nanometer dimensions with various physico-chemical properties. Due to the large number of available polymeric compounds, these systems find their application in the fields of biomedicine, catalysis and functionalized nanomaterial synthesis. In this study, hollow nanospheres of weak polyelectrolytes, poly(allylamine) and poly(acrylic acid) were successfully synthesized, using hydroxyapatite particles as substrates. The formation of the polyelectrolyte multilayer on colloidal particles was monitored by measuring the electrophoretic mobility of the particles, and the removal of the substrate was obtained by dissolution in the presence of hydrochloric acid. The effective hydrodynamic diameter of the obtained polyelectrolyte capsules was determined by the method of dynamic light scattering, while information on the morphology and size of nanospheres was obtained by atomic force microscopy and scanning electron microscopy. Infrared spectroscopy and energy dispersion X-ray analysis confirmed the removal of the substrate.

(83 pages, 51 figures, 4 tables, 76 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: hydroxyapatite, nanospheres, poly(acrylic acid), poly(allylamine), polyelectrolyte multilayers, solubility

Mentor: Dr. Davor Kovačević, Professor  
Assistant mentor: Tin Klačić, mag. chem.

Reviewers:

1. Dr. Davor Kovačević, Professor
  2. Dr. Željka Soldin, Professor
  3. Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Tajana Begović, Professor

Date of exam: 22<sup>nd</sup> of December 2020



## § 1. UVOD

Polielektroliti su makromolekule čije disocirajuće funkcionalne skupine mogu biti nositelji pozitivnog ili negativnog naboja u otopini. Svojstva tih spojeva slična su svojstvima polimera i elektrolita jer su molekule velike molarne mase čije otopine vode struju. Prirodni i sintetski polielektroliti nalaze široku primjenu u znanosti i industriji.

Uzastopnom adsorpcijom polielektrolita na površinu nastaju polielektrolitni višeslojevi koji su predmet istraživanja mnogih znanstvenih skupina zahvaljujući jednostavnosti njihove funkcionalizacije. Iako se formiranje polielektrolitnih višeslojeva najčešće vrši na površinama ravnih supstrata, oni se mogu adsorbirati i na mnoge koloidne čestice različitih geometrija. Primjeri supstrata na kojima se mogu formirati polielektrolitni višeslojevi su silicijev dioksid, kalcijev karbonat i organski spojevi poput melamin formaldehida i polistirena. Adsorpcijom polielektrolita na sferične čestice i uklanjanjem supstrata nastaju šuplje sfere od polielektrolitnih višeslojeva. Takvi spojevi posebno su zanimljivi jer se u njih mogu ugraditi funkcionalne skupine koje odgovaraju na vanjske podražaje poput promjene ionske jakosti, pH-vrijednosti otopine i temperature. Uz navedeno, šuplje sfere mogu se raspasti i pod utjecajem magnetskog polja, laserskog zračenja ili ultrazvuka. Činjenica da se jednostavno funkcionaliziraju i odgovaraju na promjene u sustavu, učinila je šuplje sfere atraktivnim sustavom za dostavu lijekova. Iako je biomedicinska primjena šupljih sfera najčešća, treba istaknuti i njihovu primjenu u katalizi te anorganskoj sintezi gdje se koriste kao mikroreaktori.

Metoda kojom se najuspješnije pripremaju polielektrolitni višeslojevi je sloj po sloj metoda depozicije polielektrolita na supstrat koja se temelji na uzastopnoj adsorpciji polielektrolita suprotnih naboja. Neke od tehnika kojima se prati nastajanje višeslojeva su elipsometrija i mjerenje elektrokinetičkog potencijala dok se dobiveni sustavi karakteriziraju uglavnom mikroskopskim metodama.<sup>1-4</sup>

Cilj ovog diplomskog rada sintetizirati je šuplje sfere slabih polielektrolita poli(alilamina) i poli(akrilne kiseline) nanometarskih dimenzija te dobiti informacije o njihovoj morfologiji i veličini pomoću mikroskopskih i drugih tehnika.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Polielektroliti

#### 2.1.1. Svojstva i primjena polielektrolita

Polielektrolitima se nazivaju molekule čija fizikalna svojstva objedinjuju svojstva polimera i elektrolita. Ono što ih razlikuje od drugih polimernih sustava je da sve monomerne jedinice sadrže ionizirajuće funkcionalne skupine. Otapanjem polielektrolita u vodi dolazi do disocijacije na nabijene lance čiji se naboj uglavnom kompenzira protuionima. Konformacija polielektrolita u otopini ovisi o koncentraciji i strukturi polimera, interakcijama s otapalom, distribuciji naboja duž lanca, ionskoj jakosti otopine i temperaturi. Bez dodanog elektrolita ili pri niskoj ionskoj jakosti otopine, polielektroliti imaju preferenciju biti u izduženoj konformaciji kako bi se smanjilo odbijanje istoimenih naboja monomernih jedinica. Dodatkom soli u otopinu polielektrolita odnosno rastom ionske jakosti otopine dolazi do promjene konformacije polimera iz izdužene, tj. štapićaste u konformaciju nalik klupku. Razlog tomu je zasjenjenje naboja koje izaziva dodani elektrolit pri čemu je odbijanje između monomera istoimenih naboja manje. Promjena konformacije polielektrolita grafički je prikazana na slici 1.<sup>1,2</sup>

Primjena polielektrolita svakako je široka zahvaljujući njihovim zanimljivim fizikalno-kemijskim svojstvima. Polielektroliti se često koriste kao flokulansi, stabilizatori, u ionskoj izmjeni i kao aditivi u prehrani. Reakcijom dvaju polielektrolita suprotnog naboja nastaju polielektrolitni kompleksi koji su potaknuli interes kod mnogih znanstvenika prošlog, a i ovog stoljeća. Neke od eksperimentalnih metoda pomoću kojih se istražuju sami polielektroliti i njihovi raznovrsni kompleksi su kalorimetrija, elektroforeza, metode raspršenja svjetlosti i mikroskopske metode. U novije vrijeme, kod istraživanja polielektrolita neizostavne su metode molekulske dinamike kojima se produbljuje razumijevanje reakcija ovih spojeva.<sup>3</sup>

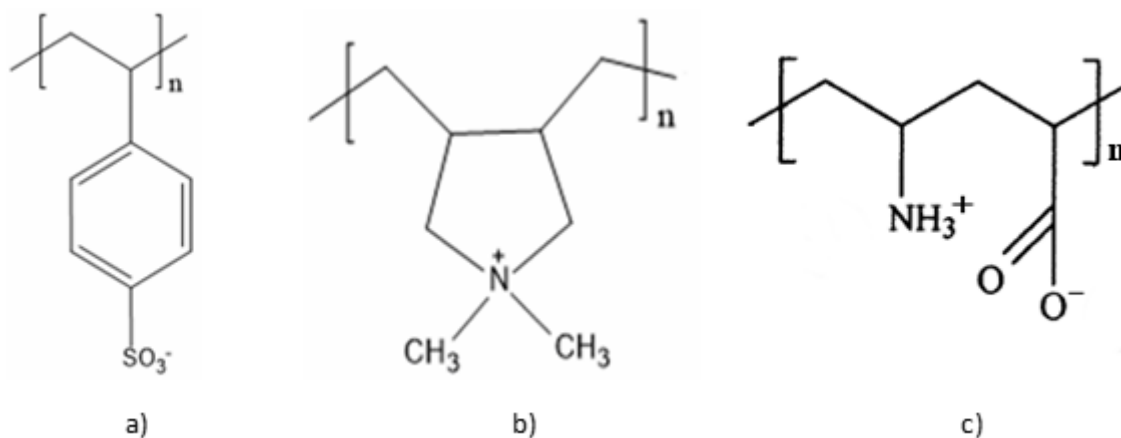


Slika 1.

Grafički prikaz promjene konformacije polielektrolita u otopini nakon dodatka soli. (preuzeto i prilagođeno iz ref. 2)

### 2.1.2. Klasifikacija polielektrolita

Široka skupina spojeva koju čine polielektroliti može se podijeliti s obzirom na mnogo kriterija. Kao jednu od najuobičajenijih podjela svakako treba istaknuti onu s obzirom na naboj poliona prema kojoj razlikujemo polikatione i polianione čije monomernе jedinice imaju pozitivno odnosno negativno nabijene funkcionalne skupine i poliamfolite koji u svojoj strukturi sadrže funkcionalne skupine oba naboja. Jedan od najviše korištenih anionskih polielektrolita je polistiren sulfonat kojem odgovara struktura prikazana na slici 2. Primjeri kationskog polielektrolita i poliamfolita prikazani su također na slici 2.<sup>4</sup>



Slika 2. Strukture: a) poli(stiren sulfonatnog) aniona (PSS)

b) poli(dialildimetilamonijeva) kationa (PDADMA)

c) poliamfolita poli[(vinilamin)-*alt*-(akrilna kiselina)] P(VAm-*alt*-AA).



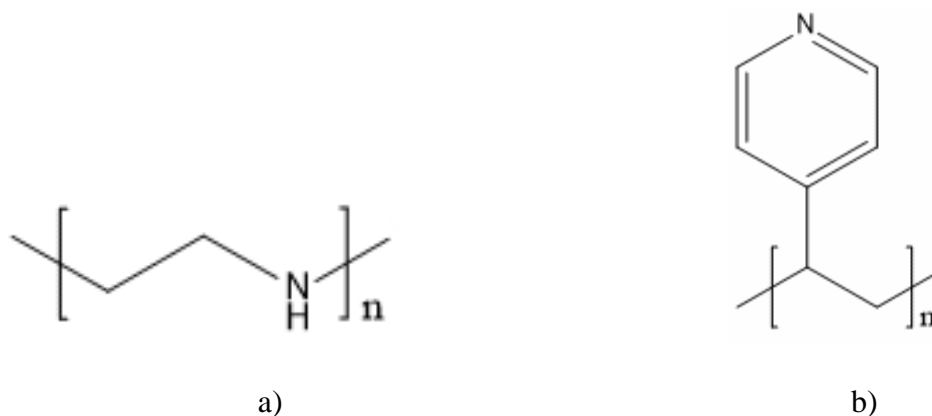
Nadalje, s obzirom na vrstu monomernih jedinica razlikujemo homopolielektrolite koji se sastoje od istoimenih monomera i heteropolielektrolite koji sadrže dvije ili više različite monomerne jedinice. Funkcionalne skupine polielektrolita mogu biti raspoređene uvijek s iste strane lanca te sustavno ili slučajno raspoređene. Ukoliko su skupine slučajno raspoređene po lancu polielektrolit se naziva ataktičkim dok onaj u kojem su skupine sustavno raspoređene na obje strane zovemo sindiotaktičkim. Ako se funkcionalne skupine na lancu nalaze svaki put s iste strane, polielektrolit dobiva naziv izotaktički. Struktura polielektrolita može biti jednostavna odnosno linearna ili razgranata na različite načine.

S obzirom na položaj funkcionalne skupine razlikujemo polielektrolite integriranog tipa u kojima su funkcionalne skupine dio okosnice lanca i polielektrolite pendantnog tipa čije su funkcionalne skupine poveznicom vezane na okosnicu lanca.

Prema njihovom podrijetlu, polielektrolite dijelimo na sintetske koji se dobivaju različitim laboratorijskim postupcima, prirodne u koje spadaju nukleinske kiseline, nabijeni polisaharidi i proteini te modificirane prirodne, primjerice derivate celuloze.

Klasifikacija polielektrolita prema vrsti funkcionalne skupine koja disocira u otopini je na polibaze, polikiseline i polisoli. Polisoli disociraju u otopini na nabijene poliione i protuione suprotnog naboja. Polikiseline u otopini protoniraju otapalo dok će otapalo protonirati polibaze.

Kao najpoznatija podjela polielektrolita, uz podjelu prema naboju, ističe se ona na slabe i jake polielektrolite. Za jake polielektrolite gustoća naboja duž polimernog lanca ovisi o gustoći naboja funkcionalnih skupina koje disociraju dok je stupanj disocijacije ionizirajućih skupina slabih polielektrolita određen pH-vrijednošću otopine. Jaki polielektroliti ionizirani su potpuno u cijelom pH području i funkcionalne skupine su neovisne jedna o drugoj, dok zbog utjecaja elektrostatskih interakcija na svojstva svake funkcionalne skupine slabog polielektrolita utječe susjedna skupina. Uobičajeni slabi polielektroliti koji se koriste u istraživačke svrhe su slaba polibaza poli(alilamin hidroklorid) (PAH) i poli(etilenimin) (PEI) kojem odgovara struktura prikazana na slici 3. Od jakih polielektrolita treba istaknuti polivinilsulfat i poli(4-vinilpiridin) čija je struktura također prikazana na slici 3.<sup>5</sup>



Slika 3. Struktura: a) slabog polielektrolita polietilenimina (PEI)  
b) jakog polielektrolita poli(4-vinilpiridina) (PVP).

## 2.2. Polielektrolitni višeslojevi

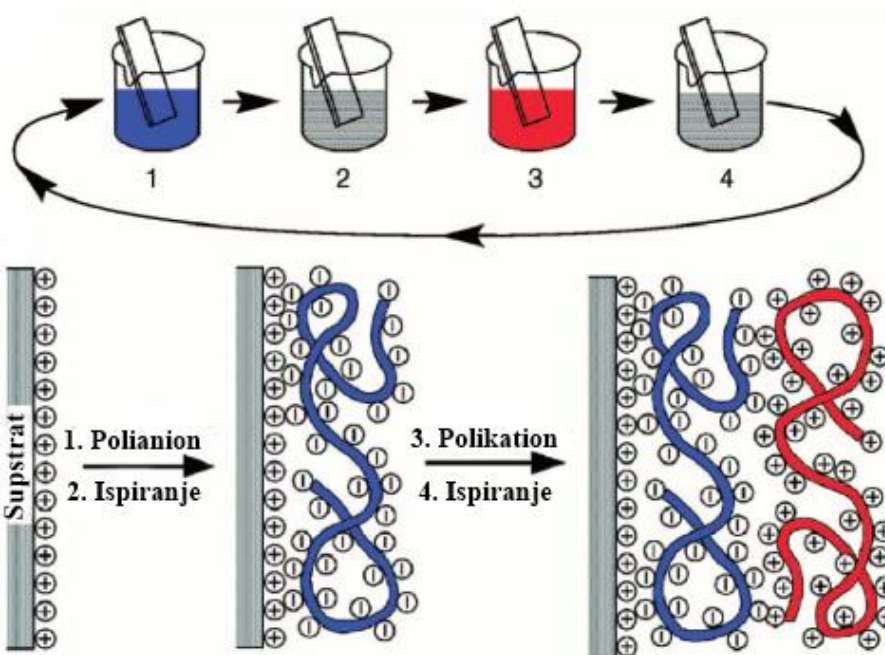
### 2.2.1. Svojstva i primjena polielektrolitnih višeslojeva

Polielektrolitni kompleksi koji nastaju miješanjem otopina polikationa i polianiona, intenzivno su proučavani sustavi, poznati po svojim jedinstvenim svojstvima. Iako su veoma zanimljivi, polielektrolitnim kompleksima nije bilo jednostavno rukovati i oblikovati ih u željene forme sve dok Decher i suradnici nisu osmislili metodu uzastopne depozicije polielektrolita na supstrat.<sup>6,7</sup> Naizmjeničnom adsorpcijom polikationa i polianioina na supstrat moguće je prirediti višeslojne filmove željenih polielektrolita čija se svojstva mogu vrlo precizno kontrolirati. Nakon otkrića popularne metode sinteze, mnoga su istraživanja pokazala jednostavnost funkcionalizacije polielektrolitnih višeslojeva i njihovu široku primjenu. Praktična primjena polielektrolitnih višeslojeva našla se je u biomedicini, biotehnologiji i brojnim industrijama, od farmaceutske do elektroničke. Zbog antikorozivnih svojstava i mogućnosti samozacjeljivanja, neki se polielektrolitni višeslojevi koriste kao zaštitni materijal za metalne površine. Puferska svojstva takvih višeslojeva omogućuju neutralizaciju promjene pH-vrijednosti metalnih površina uslijed koje dolazi do korozije.<sup>8</sup> Također, u obliku zaštitnog sloja, polielektrolitni višeslojevi koriste se u sprječavanju bakterijskih infekcija. Osnovni motivi pri kreiranju antibakterijske površine su eliminiranje ili prevencija adhezije bakterija i ubijanje bakterija ukoliko je došlo do adhezije. Polielektrolitni višeslojevi zadovoljavaju dane kriterije budući da se jednostavno mogu funkcionalizirati potrebnim baktericidima ili se isti

mogu ugraditi u njih. Primjeri dobivanja antibakterijskih površina od polielektrolitnih filmova su ugradnja antibiotika u višeslojeve i sinteza višeslojeva s kationskim polimerima koji oštećuju bakterijske membrane.<sup>9-11</sup> Pojedini višeslojni filmovi dobivaju veliku pozornost znanstvenika zbog sve potrebnijih svojstava samozacjeljivanja i samoobnavljanja. Takva svojstva proizlaze iz mobilnosti, elastičnosti i permeabilnosti višeslojeva te njihovoj osjetljivosti na vanjske podražaje poput promjene pH-vrijednosti, temperature ili ionske jakosti. Uz spomenute primjene višeslojeva, važno je ne izostaviti onu biomedicinsku gdje se koriste kao sustavi za dostavu lijekova. Sustavi koji omogućuju prostornu i vremensku kontrolu nad dostavom DNA i ostalih terapeutika, od velikog su značaja za biomedicinu današnjice. Budući da se DNA, RNA i neki oligonukleotidi vrlo jednostavno mogu uklopiti u njih, polielektrolitni višeslojevi često su odabrani sustav dostave željenih nukleotida. Uz to, mogu se funkcionalizirati raznovrsnim molekulama podložnim hidrolizi u fiziološkim uvjetima koja dovodi do raspadanja višesloja i otpuštanja terapeutika na ciljano mjesto.<sup>12-15</sup> O nastajanju takvih sustava biti će više rečeno u sljedećim odlomcima.

### 2.2.2. Priprava polielektrolitnih višeslojeva

Najpopularnija metoda sinteze polielektrolitnih višeslojeva zasigurno je *layer-by-layer* (LbL) odnosno sloj po sloj tehnika depozicije polielektrolita. Iako su prvi polielektrolitni višeslojevi priređivani na ravnim površinama i to najčešće metala ili njihovih oksida, danas se oni pripremaju i na sferičnim česticama te zakrivljenim plohama. Najčešće korištena ravna ploha je ona od silicijeva oksida dok su najzastupljenije sferične čestice anorganskih spojeva poput karbonata i fosfata. Metoda sloj po sloj sastoji se od naizmjenične adsorpcije polikationa i polianiona na nabijeni supstrat pomoću elektrostatskih interakcija. Ukoliko je površina supstrata pozitivno nabijena, sinteza višeslojnog filma kreće uranjanjem supstrata u otopinu polianiona. Nakon adsorpcije polianiona slijedi ispiranje supstrata vodom ili puferskom otopinom kako bi se uklonio suvišak neizreagirano polimera. Ovisno o načinu izvedbe i metodi kojom se prati nastajanje višesloja, nakon svakog koraka ispiranja može slijediti sušenje supstrata. Ako se adsorpcija polianiona pokazala uspješnom, slijedi depozicija polikationa i ispiranje njegova suviška.<sup>16</sup> Postupak se ponavlja do željenog broja slojeva i debljine filma. Opisani proces shematski je prikazan na slici 4.



Slika 4. Shematski prikaz pripreve polielektrolitnih višeslojeva sloj po sloj metodom.

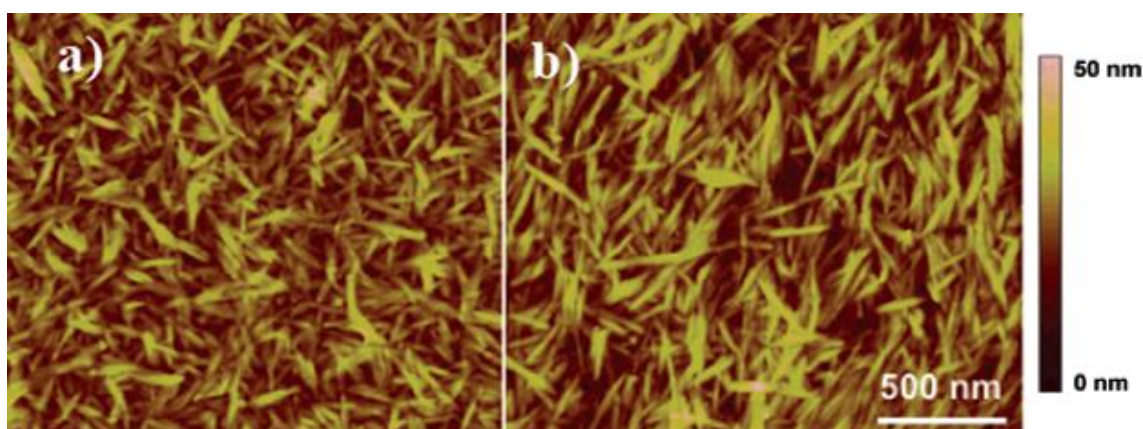
(preuzeto i prilagođeno iz ref. 16)

Jedan od razloga zbog kojih je sloj po sloj metoda najzastupljenija u pripremi višeslojeva je jednostavnost postupka kojim se ona izvodi. Velika prednost u odnosu na druge metode je širok spektar spojeva koji mogu sudjelovati u toj sintezi počevši od raznih polimera, biomakromolekula poput proteina i polinukleotida, malih molekula pa čak i kompleksnih iona.<sup>17</sup> Nadalje, sinteza metodom sloj po sloj ima mnogo optimizacijskih parametara kojima se vrlo precizno mogu kontrolirati svojstva konačnog produkta. Ti parametri će biti opisani u idućem odlomku.

Osim uranjanjem u otopine polianiona, polielektrolitni višeslojevi mogu nastati sprejanjem polimera na površinu supstrata ili *spin coating* metodom gdje se željeni polimer nanosi na sredinu supstrata koji rotira i pomoću centrifugalne sile raspršuje uzorak. Ono što čini metode sprejanja i *spin coating* metode boljim u odnosu na klasično uranjanje u otopinu je korištenje jako malih volumena za prekrivanje velikih površina supstrata.

Metode kojima se prati nastajanje višeslojeva i one kojima se karakteriziraju dobiveni filmovi raznolike su. Tijekom same sinteze višesloja koristi se metoda kvarc kristalne mikrovage (QCM) u kojoj kristal kvarca oscilira različitom frekvencijom uslijed vezanja molekule te se iz promjene frekvencije računa promjena mase. Optičkom se reflektometrijom također dobiva promjena mase direktno proporcionalna promjeni signala odnosno omjera intenziteta paralelne

i okomite komponente polarizirane svjetlosti. Za mjerenje debljine slojeva uglavnom se koriste elipsometrija i mikroskopija atomskih sila (AFM). Osim informacije o debljini slojeva, elipsometrijom se može odrediti indeks loma svjetlosti i apsorpcijski koeficijent tankih filmova. Mikroskopijom atomskih sila i skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) dobivaju se podaci o morfologiji površine.<sup>18</sup> Na slici 5. prikazane su AFM slike polielektrolitnih višeslojeva PAH-a i celuloze nastalih različitim metodama pripreve: a) metodom uranjanja u otopine polielektrolita, b) metodom *spin coating* u kojoj površina supstrata rotira.



Slika 5. AFM slike: a) višesloja PAH-a i celuloze nastalog uranjanjem u otopinu b) višesloja PAH-a i celuloze nastalog metodom *spin coating*. (preuzeto i prilagođeno iz ref. 18)

### 2.2.3. Interakcije pri nastajanju polielektrolitnih višeslojeva

Iako je sinteza sloj po sloj vođena elektrostatskim interakcijama, one nisu jedine koje sudjeluju u nastajanju polielektrolitnih višeslojeva. Neosporiva je činjenica da alterniranjem pozitivnog i negativnog naboja proces nastajanja višesloja završava uglavnom uspješno, no otkrivanjem pozitivnih biomakromolekula koje ne formiraju film adsorpcijom na negativni supstrat dalo se je naslutiti kako u cijelom procesu sudjeluju i druge interakcije osim elektrostatskih.<sup>19</sup> Kotov je proučavao hidrofobne interakcije tijekom sloj po sloj adsorpcije polielektrolita i ukazao na njihov značajan doprinos. Analiza hidrofobnih interakcija pokazala je kako slobodna energija adsorpcije polikationa na površinu polianiona ima više doprinosa uključujući kompleksiranje polielektrolita, nestajanje njihove hidratacijske sfere i oslobađanje protuiona.<sup>20</sup>

Vodikove veze također mogu igrati važnu ulogu pri nastajanju polielektrolitnih višeslojeva. Stockton i Rubner prvi su pokazali kako se vodikove veze mogu koristiti u sloj po sloj metodi na primjeru polianilina koji ih može ostvarivati s nizom polimera putem njegovih aaminskih i iminskih skupina.<sup>21</sup> Istraživanje Stocktona i Rubnera urodilo je korištenjem brojnih polielektrolitnih parova u pripremi polielektrolitnih višeslojeva pomoću vodikovih veza.

Osim navedenih, u sintezi višeslojnih filmova vrlo često sudjeluju i specifične reakcije prepoznavanja molekula u višesloju. Primjer takvih interakcija su one između proteina avidina i vitamina biotina, kojim je bio označen enzim glukoza-oksidaza u sintezi enzimskog višesloja Suzukija i suradnika<sup>22</sup>. Specifične interakcije između proteina lektina i ugljikohidrata također se mogu primjeniti u takve svrhe. Jedan od primjera su interakcije lektina i mucina te je shematski prikaz nastajanja višesloja pomoću snažnog afiniteta lektina prema mucinu prikazan na slici 6.<sup>23</sup>



Slika 6. Formiranje polielektrolitnog višesloja PAH-a i PSS-a pomoću specifičnih interakcija proteina mucina iz govedjeg seruma i proteina lektina. (preuzeto i prilagođeno iz ref. 23)

#### 2.2.4. Čimbenici koji utječu na nastajanje polielektrolitnih višeslojeva

Adsorpcija polielektrolita na površinu ovisi o mnogo faktora, a ponajprije o gustoći naboja polielektrolita i supstrata te o njihovim nabojima. Također, važno je istaknuti ionsku jakost otopine i u slučaju slabih polielektrolita njezinu pH-vrijednost kao bitne parametre. Budući da konformacija polielektrolita ovisi o koncentraciji soli, posljedično je ionska jakost varijabla polielektrolitne adsorpcije. Dodatkom soli u otopinu polielektrolita dolazi do njegova svijanja čime je izvođenje sloj po sloj adsorpcije otežano zbog nastajanja struktura prikazanih na slici 7. Petlje su dijelovi lanca koji nemaju kontakta sa supstratom i povezuju dva adsorbirana dijela lanca dok su repovi slobodni krajevi lanca koji strše u otopinu.<sup>1</sup>

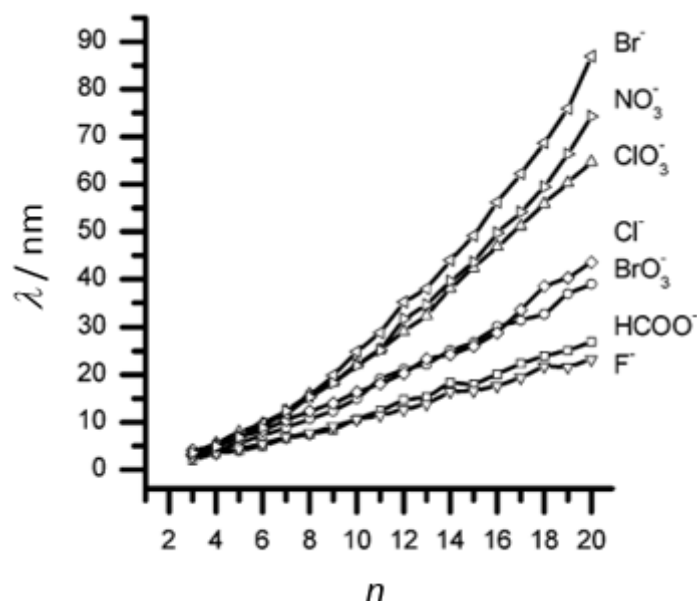


Slika 7. Adsorpcija polielektrolitnog lanca na površinu supstrata (preuzeto i prilagođeno iz ref. 1)

Gustoća naboja polielektrolita ima iznos minimalne vrijedosti potrebne za nastajanje višesloja ispod koje prenašanje površine nije dovoljno za postizanje stabilnosti višesloja. Poznato je kako u slučaju jakih polielektrolita gustoća naboja varira s različitim funkcionalnim skupinama na lancu dok je ona u slučaju slabih polielektrolita ovisna o pH-vrijednosti otopine. Ukoliko je gustoća naboja pri određenoj pH-vrijednosti za neki slabi polielektrolit maksimalna, onda je njezina vrijednost vrlo niska za njegov suprotno nabijeni par. Iz te činjenice proizlazi kako je za formiranje višeslojeva slabih polielektrolita optimalna srednja vrijednost gustoće naboja polielektrolitnog para.<sup>24</sup>

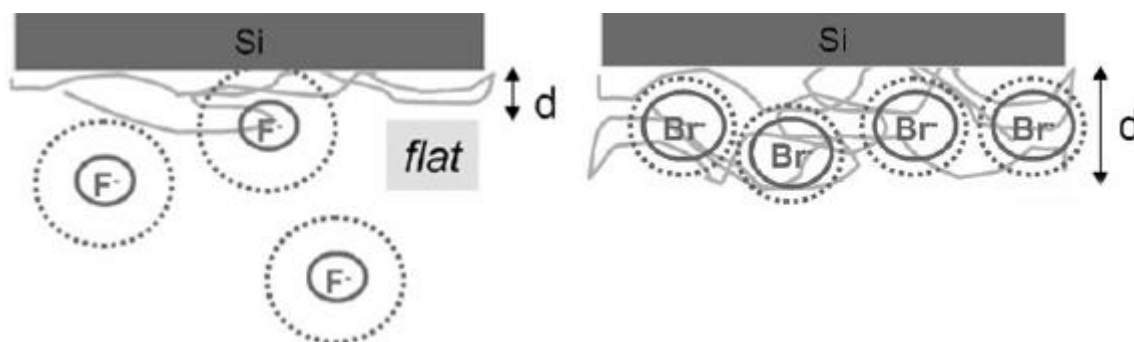
Kao što je spomenuto u odjeljku 2.2.2., jedna od prednosti sloj po sloj metode sinteze polielektrolitnih višeslojeva cijeli je niz varijabli kojima se može utjecati na strukturu konačnih filmova. Parametri koji su se pokazali od najvećeg značaja su koncentracija i vrsta dodanog elektrolita odnosno ionska jakost otopine polielektrolita, vrsta protuiona oslobođenog disocijacijom polielektrolita te vrsta otapala. Sporedni faktori koji u pravilu nemaju velik utjecaj na svojstva višeslojeva su koncentracija i molarna masa polielektrolita te vremena depozicije i ispiranja polielektrolita.<sup>25</sup>

Utjecaj vrste protuiona pokazao se zanemarivim pri njihovim nižim koncentracijama ( $< 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ) u sintezi višeslojeva s polimerima visoke gustoće naboja dok su istraživanjem sinteze pri većim koncentracijama Salomäki i suradnici dobili zanimljive rezultate prikazane na slici 8. Dobiveni rezultati prikazuju ovisnost debljine višeslojeva PDADMA/PSS određivane elipsometrijski o vrsti prisutnog protuiona te kako ona ima najveću vrijednost u prisustvu bromida.<sup>26</sup>



Slika 8. Debljina višeslojeva PDADMA/PSS s brojem slojeva u prisutnosti različitog protuiona koncentracije X. (preuzeto i prilagođeno iz ref. 25)

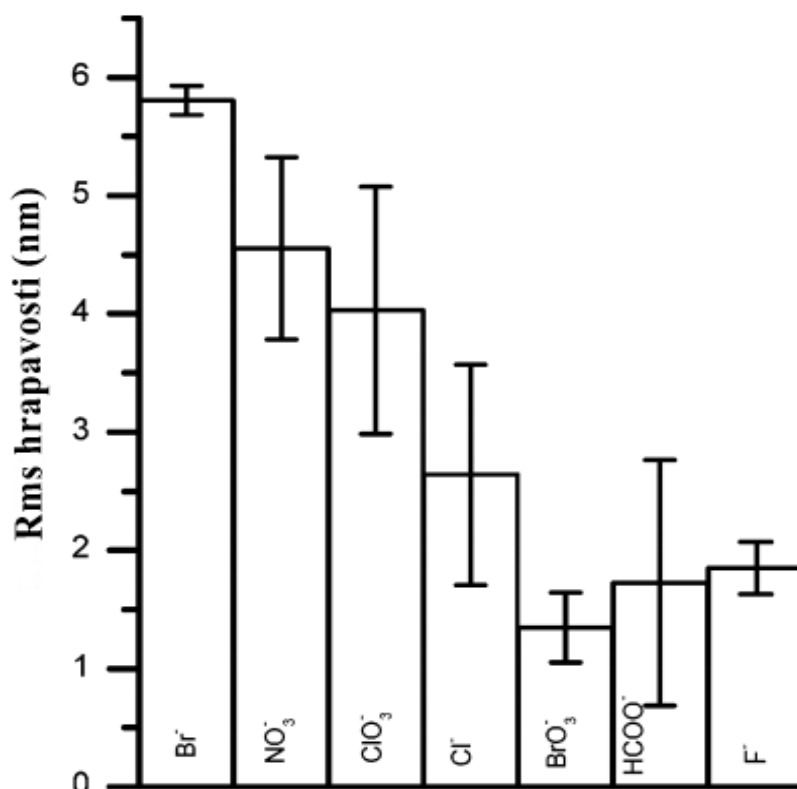
Objasnenje navedenih rezultata nije u potpunosti razjašnjeno. Kovačević i suradnici<sup>27</sup> kalorimetrijski su određivali promjene entalpije uslijed titracije natrijeva polistirensulfonata različitim elektrolitima. Iz dobivenih rezultata zaključili su kako ukupna promjena entalpije ovisi o naboju protuiona i njegovoj hidratacijskoj sferi. Shematski prikaz vezanja polielektrolita u prisustvu fluoridnih i bromidnih iona prikazan je na slici 9.



Slika 9. Usporedba adsorpcije polielektrolita u prisustvu fluoridnih i bromidnih protuiona. (preuzeto i prilagođeno iz ref. 19)



Osim utjecaja vrste protuiona na debljinu višeslojeva, Salomaki i suradnici, mikroskopijom atomskih sila ispitali su kako vrsta protuiona utječe na hrapavost višeslojeva. Kvadratna srednja vrijednost ("Root mean square-rms") hrapavosti višeslojeva s različitim protuionima prikazana je na slici 10.

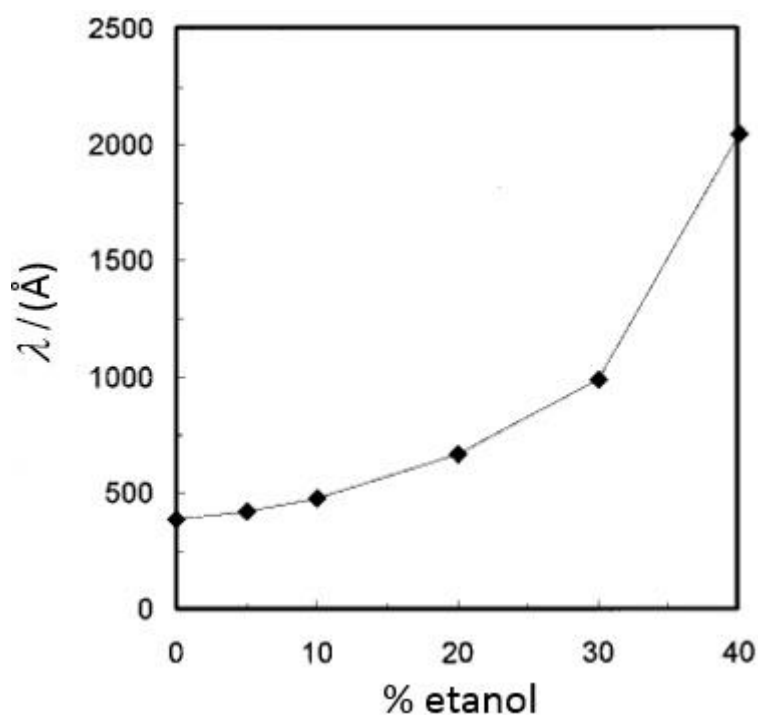


Slika 10. Kvadratna srednja vrijednost hrapavosti višeslojeva PAH/PDADMA u prisustvu 0,1 mol dm<sup>-3</sup> otopina različitih protuiona mjerena mikroskopijom atomskih sila (preuzeto i prilagođeno iz ref. 26)

Osim vrste protuiona, na hrapavost površine višeslojnih filmova, kao i na njihovu debljinu utječe ionska jakost. Kao što je više puta napomenuto, zbog zasjenjenja naboja na polielektrolitnom lancu, molekule polimera postaju zavijenije povećanjem koncentracije soli što u konačnici rezultira debljim i hrapavijim višeslojevima. Uz spomenute utjecaje, ionska jakost također utječe na vrstu rasta polielektrolitnih višeslojeva. Načini na koje višeslojevi mogu nastajati su linearni i eksponencijalni, odnosno mogu rasti tako da dodatkom svakog lanca dolazi do povećanja debljine višesloja u istoj količini ili tako da svakim korakom razlika u debljini bude sve veća.

Uočeno je kako pri višim koncentracijama soli dolazi do eksponencijalnog rasta dok je rast linearan ukoliko je koncentracija soli niska.<sup>28</sup> Daljnji faktori koji utječu na tip rasta višesloja su kemijska priroda polielektrolitnog para, vrsta dodanog elektrolita, temperatura pri kojoj se odvija sinteza te metoda pripreme samog polielektrolitnog višesloja.

Još jedan način kontrole strukture i sastava višeslojeva je sastav otapala. Dubas i Schlenoff<sup>25</sup> ispitali su kako udio etanola u smjesi otapala etanol/voda utječe na debljinu desetoslojnih filmova PSS-a i PDADMA-a. Sastav otapala varirali su povećanjem udjela etanola u smjesi, čime se dielektrična konstanta otapala smanjila. Posljedično, energija solvatacije polielektrolita bila je manje povoljna što je olakšalo njegovu adsorpciju na supstrat. Debljina različitih dobivenih slojeva određena je elipsometrijski i prikazana na slici 11.



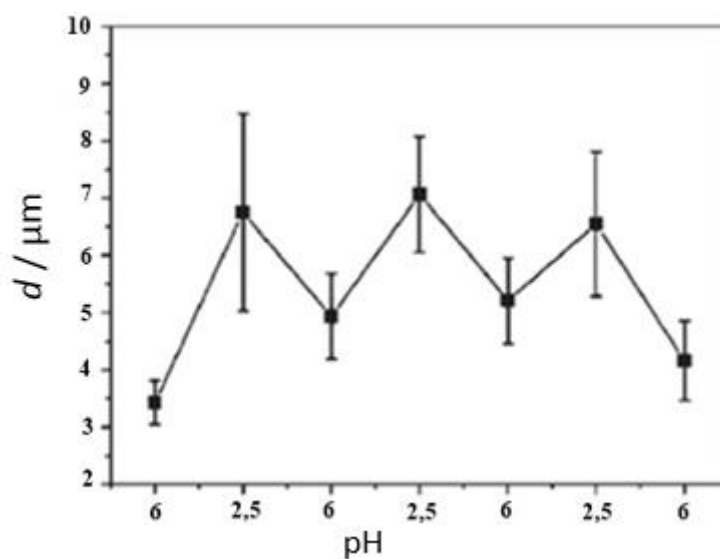
Slika 11. Elipsometrijom određena debljina višeslojeva priređenih u otapalima različitog udjela etanola (preuzeto i prilagođeno iz ref. 25)

## 2.3. Šuplje sfere od polielektrolitnih višeslojeva

### 2.3.1. Svojstva šupljih sfera

Sloj po sloj metodom moguće je obložiti koloidne čestice polielektrolitnim višeslojevima i ostalim polimerima ovisno o svojstvima potrebnim za njihovu primjenu. Šuplje sfere nastaju uslijed otapanja jezgre na koju su adsorbirani polimeri te njihova svojstva poput debljine, permeabilnosti i homogenosti ovise o metodi sinteze, korištenom supstratu i postupku njegova uklanjanja te vrsti i koncentraciji korištenog polimera kojim se supstrat oblaže. Variranje veličine, geometrije i mehaničkih svojstava kapsula u svrhu modeliranja njihovih bioloških interakcija široko je područje zanimanja. Polielektrolitne kapsule pobudile su značajan interes znanstvenika jer njihova višeslojna struktura omogućava kombiniranje različitih svojstava u jednom sustavu pomoću korištenja više različitih materijala. Ugradnjom polimera s funkcionalnim skupinama koje odgovaraju na vanjske podražaje poput promjene pH-vrijednosti, temperature ili ionske jakosti olakšava se ugađanje svojstava kapsula čak do nanometarske razine. Osim sfera koje odgovaraju na spomenute podražaje, sintetizirane su i sfere osjetljive na lasersko zračenje, primjenu magnetskog polja ili ultrazvuka.<sup>29–31</sup>

Veoma zanimljivo svojstvo kapsula načinjenih od slabih polielektrolita reverzibilna je promjena veličine ovisna o pH-vrijednosti. Mauser i suradnici<sup>32</sup> sintetizirali su mikrokapsule poli(alilamin hidroklorida) i poli(metakrilne kiseline) (PMA) na česticama kalcijeva karbonata. Nakon uklanjanja jezgre, dobivene sfere pokazale su stabilnost u području pH-vrijednosti od 2,5 do 11,5. Promjenu promjera kapsula variranjem pH-vrijednosti pratili su konfokalnom laserskom skenirajućom mikroskopijom i ti rezultati su prikazani na slici 12.



Slika 12. Promjena promjera šupljih sfera PAH-a i PMA u ovisnosti o pH-vrijednosti.

(preuzeto i prilagođeno iz ref. 32)

Stabilnost mikro kapsula ovisna o pH-vrijednosti pokazala se veoma bitnim faktorom za mnoge primjene poput kontrolirane dostave i otpuštanja lijekova i razvijanja sklopivih mikrouređaja.

### 2.3.2. Primjena šupljih sfera

Najznačajnija primjena polielektrolitnih kapsula zasigurno je ona u području biomedicine. Sustavi za dostavu lijekova moraju zadovoljavati nekoliko ključnih zahtjeva poput niske toksičnosti i imunogenosti, visokog kapaciteta vezanja molekula lijeka te mogućnosti otpuštanja lijeka putem vanjskih podražaja. Kontrolirano otpuštanje lijekova postiže se, osim vanjskim, i nekim biološkim stimulansima kao što su promjena redoks potencijala i enzimaska aktivnost. Uz dostavu lijekova, kapsule se mogu koristiti u dostavi cjepiva kao nosači antigena i adjuvanata za promoviranje adaptivnih odgovora imunoloških stanica.<sup>33-35</sup>

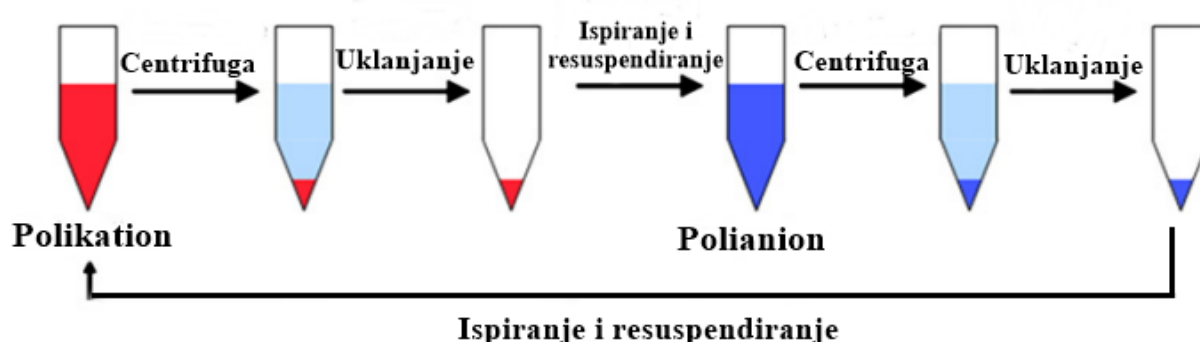
Xiao i Du<sup>36</sup> sintetizirali su polimerne kapsule s ugrađenim superparamagnetičnim nanočesticama željezova oksida za koje se pokazalo da se mogu koristiti kao kontrastno sredstvo u magnetskoj rezonanciji te u detekciji bakterija i virusa. Također, pokazano je kako bi mikro kapsule mogle imati primjenu kao umjetni stanični organeli i enzimski reaktori. Korištenje polielektrolitnih kapsula koje sadrže enzim ureazu za biomineralizaciju samo je jedan od brojnih primjera.

Lvov i suradnici<sup>37</sup> koristili su enzim peroksidazu, ugrađen u šuplje sfere načinjene od poli(stiren sulfonata), poli(alilamin hidroklorida) i poli(etilenimina), za katalizu polimerizacije fenola. Pokazano je kako prilagodbom uvjeta polimerizacije i koncentracije fenolnog monomera, nastaju polimerni filmovi različite debljine na površini mikrokapsula.

Shchukin i suradnici<sup>38</sup> koristili su mikrokapsule poli(stiren sulfonata) i poli(alilamin hidroklorida) kao reaktore u sintezi fosfata metala rijetkih zemalja. U mikrokapsule ugradili su fosfate koji su unutar njih reagirali s nitratima odgovarajućih metala. Ovakav način sinteze omogućava kreiranje specifičnih kristalizacijskih uvjeta koji vode do postizanja veće kristaliničnosti čestica.

### 2.3.3. Sinteza šupljih sfera

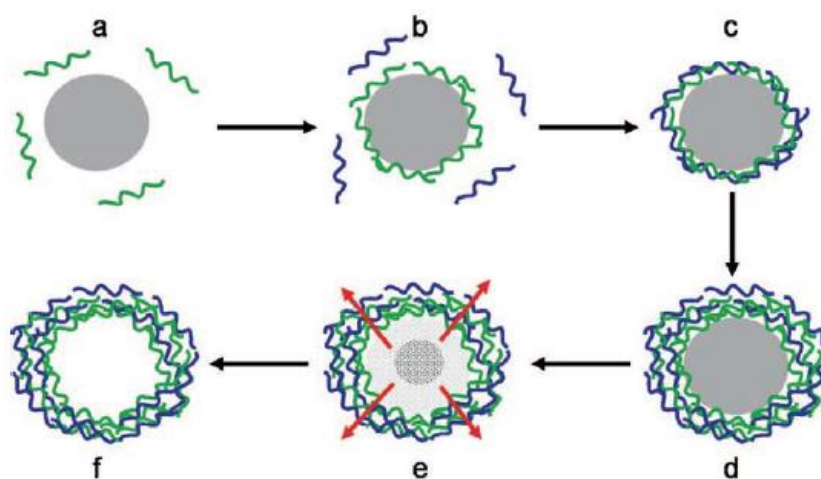
Metoda kojom se već neko vrijeme uspješno pripremaju šuplje sfere je sloj po sloj metoda adsorpcije polimera. Za depoziciju polimera na površine čestica mikrometarskih i nanometarskih dimenzija pristupi bazirani na uranjanju u otopine polielektrolita nisu se pokazali korisnima. Kao rezultat toga, čestice obložene višeslojnim filmovima pripremaju se suspendiranjem, centrifugiranjem i resuspendiranjem u otopinama polielektrolita. Sintaza kreće adsorpcijom polielektrolita suprotno nabijenog od koloidnih čestica na njihovu površinu te centrifugiranjem dobivene suspenzije kako bi se nevezani polimer uklonio. Nakon uklanjanja supernatanta, koloidne čestice se redispergiraju u otopini za ispiranje nekoliko puta prije adsorpcije sljedećeg polielektrolita. Postupak se ponavlja sa suprotno nabijenim polielektrolitom sve dok se ne postigne željeni broj slojeva na površini supstrata. Opisani proces shematski je prikazan na slici 13.<sup>17,39</sup>



Slika 13. Shematski prikaz adsorpcije polielektrolita na sferične čestice. (preuzeto i prilagođeno iz ref. 39)

Kako je već naglašeno, cilj centrifugiranja suspenzije čestica je odvajanje slobodnih polimera od omotanih čestica što zahtijeva višestruke cikluse centrifuge i ispiranja. Takavim postupkom dolazi do sedimentacije čestica što često dovodi do njihove agregacije, posebice u slučaju korištenja supstrata male veličine. U svrhu nadilaženja te prepreke razvile su se metoda membranske filtracije i elektroforetska metoda spajanja polimera koje dopuštaju česticama da ostanu u suspenziji smanjujući njihovu tendenciju za agregacijom. Elektroforetska metoda koristi agarozni gel za suspenziju čestica jezgre dok se adsorpcija slojeva izvodi elektroforezom polimera agaroznim gelom. Metodom membranske filtracije slobodni polimer odvaja se od omotanih čestica korištenjem tlačnog diferencijala duž membrana tijekom dodavanja medija za ispiranje. Nedostatak tih metoda ograničen je broj polimera koji se mogu koristiti u sintezi te utjecaj mnogih ključnih faktora koji ne postoje u izvođenju adsorpcije višeslojeva centrifugiranjem. Ovisno o vrsti polimera i jezgre na kojoj se vrši depozicija, izabire se metoda za optimalno omatanje čestica.<sup>40</sup>

Sinteza kapsula završava uklanjanjem jezgre pri čemu nastaju šuplje sfere sačinjene od polielektrolitnih višeslojeva. Uklanjanje supstrata jedan je od ključnih koraka o kojem uvelike ovise svojstva i struktura sfera. Nastajanje šupljih sfera shematski je prikazano na slici 14.



Slika 14. Nastajanje šupljih sfera: adsorpcija suprotno nabijenih polielektrolita prikazana koracima a) do d), uklanjanje jezgre (e) te formirane šuplje sfere (f). (preuzeto i prilagođeno iz ref. 1)

Fizikalno-kemijska karakterizacija šupljih sfera provodi se mnogim tehnikama, uglavnom mikroskopskim koje osiguravaju uvid u morfologiju kapsula. Među mikroskopskim metodama ističu se mikroskopija atomskih sila (AFM), transmisijska (TEM) i skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) te konfokalna laserska skenirajuća mikroskopija (CLSM). Veličina nastalih sfera može se odrediti metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS), dok se adsorpcija polielektrolita često prati mjerenjem elektrokinetičkog (zeta) potencijala kako bi se provjerilo dolazi li do prenavijanja površine, ključnog koraka za uspješno nastajanje polielektrolitnog višesloja na koloidnim česticama. Kvalitativna analiza ovih spojeva sastoji se od infracrvene spektroskopije (IR), difrakcije rendgenskog zračenja na polikristalnom uzorku (PXRD) te energijski disperzivne spektroskopije rendgenskih zraka (EDX).

#### 2.3.4. Supstrati i njihovo uklanjanje

Izbor supstrata jedan je od ključnih faktora pri nastajanju polimernih kapsula različitih svojstava i funkcija budući da veličina i geometrija konačnih kapsula ovise o njemu. Prikladni supstrat mora biti stabilan tijekom sloj po sloj adsorpcije polimera te proces njegova uklanjanja ne smije utjecati na stabilnost i strukturu šupljih sfera.

Kao jezgre u sintezi polielektrolitnih kapsula koriste se mnogi anorganski i organski spojevi. U samim počecima istraživanja ovih spojeva koristio se uglavnom melamin formaldehid koji se uklanjao tretiranjem s klorovodičnom kiselinom ili organskim otapalima poput dimetil sulfoksida i *N,N*-dimetilformamida. Kiselim hidrolizom melamin formaldehida nastaju oligomeri koji se ne mogu u potpunosti ukloniti i nisu biološki kompatibilni što je ograničilo njegovu upotrebu kao materijala za jezgru. Još jedan primjer organske jezgre je polistiren koji se otapa tetrahidrofuranom ili *N,N*-dimetilformamidom. Upotreba polistirena kao i ostalih organskih jezgri ograničena je iz razloga što se pokazalo da korištenje organskih otapala pri ragradnji jezgre uzrokuje mijenjanje stabilnosti kapsula.<sup>41</sup>

Od anorganskih materijala kao jezgre koriste se karbonati kalcija, mangana i kadmija te silicijev dioksid. Upotreba silicijeva dioksida ograničena je na sintezu kapsula stabilnih u kiselim uvjetima budući da se uklanja fluorovodičnom kiselinom. Prednost čestica silicijeva dioksida njihova je glatka površina koja je u nekim sintezama važan preduvjet.

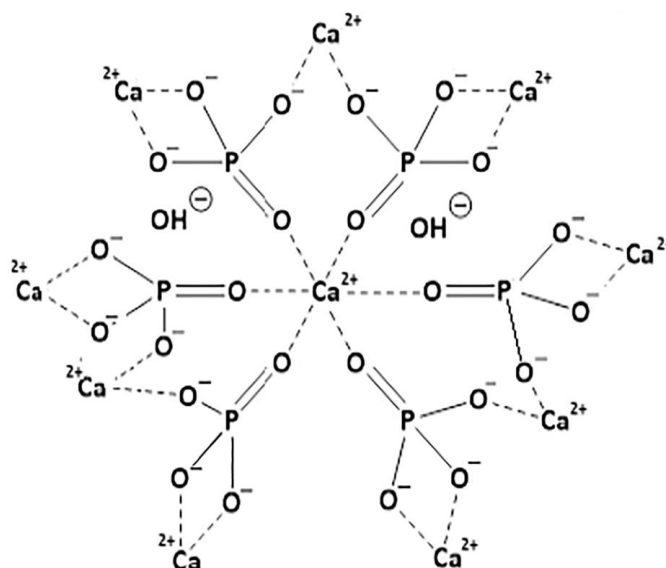
Kalcijev karbonat najčešće je korištena anorganska jezgra zbog njegove biokompatibilnosti i netoksičnosti što su najvažnija svojstva materijala za primjenu u dostavi lijekova.

Kao i karbonati mangana i kadmija, kalcijev se karbonat uklanja reakcijom s etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA) u neutralnim uvjetima, što ga također čini jednim od prvih izbora u sintezi šupljih sfera različitih primjena.<sup>42-44</sup>

## 2.4. Hidroksiapatit

Zahvaljujući svojoj širokoj primjeni, hidroksiapatit je najviše istraživani spoj iz skupine apatita. Uobičajena formula kojom se prikazuje je  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  koja odgovara strukturi prikazanoj na slici 15. Prirodni izvori hidroksiapatita su kosti i zubi mnogih sisavaca, riblje kosti, ljuska jajeta, prirodni minerali i mnogi drugi.<sup>45,46</sup>

Osim ekstrakcijom iz navedenih prirodnih izvora, hidroksiapatit dobiva se mnogim sintetskim postupcima u laboratoriju. Metode sinteze uključuju sinteze iz otopina (sol-gel metoda, hidrotermalna sinteza, precipitacija), mehanokemijske i neke od elektrokemijskih metoda poput elektrodepozicije. Sintetski hidroksiapatit često je stehiometrijski sa specifičnim molarnim omjerom Ca/P od 1,67 iako omjer varira ovisno o metodi sinteze i postupcima obrade produkta. Pri laboratorijskoj sintezi od velike važnosti su početna svojstva praha poput čistoće faze, stehiometrije, veličine i oblika čestica i njihove kristaliničnosti.<sup>47-49</sup>

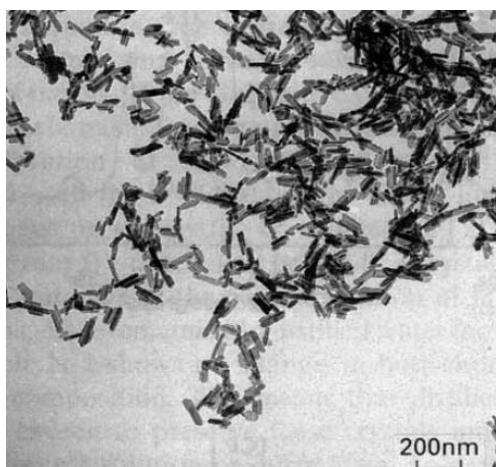


Slika 15. Prikaz strukture hidroksiapatita (preuzeto i prilagođeno iz ref. 48)



### 2.4.1. Svojstva hidroksiapatita

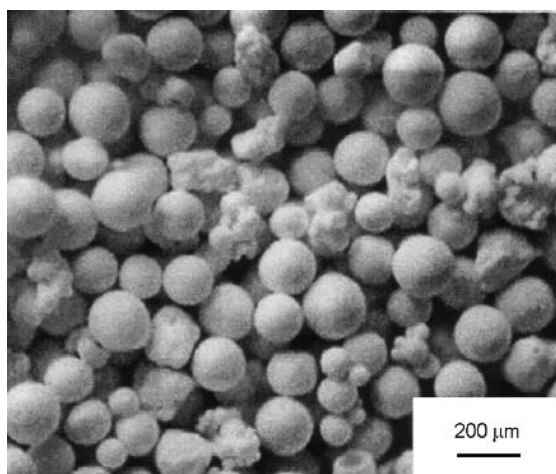
Čisti hidroksiapatit bijeli je prah iako u prirodnim izvorima često može imati primjese žute ili zelene boje zbog prisutnosti prijelaznih metala u tragovima. Jedno od svojstva hidroksiapatita koje je pobudilo poseban interes znanstvenika je njegov sastav koji je sličan anorganskoj fazi kosti. Prisutnost u kostima je u obliku igličastih kristala nanometarskih dimenzija čija je TEM slika prikazana na slici 16. Iako je primjena hidroksiapatita zastupljena u mnogim područjima, ograničavaju je njegova mehanička svojstva poput lomljivosti, male elastičnosti i krhkosti. Zbog navedenih svojstava čisti se spoj uglavnom ne koristi za ortopedске primjene već se on pojačava dodatkom polimera, anorganskih materijala i inertnih metala. Neka od poželjnih svojstava hidroksiapatita su njegova kemijska stabilnost u fiziološkim uvjetima, visok stupanj kristaliničnosti, biokompatibilnost, bioaktivnost i mnoga druga.<sup>50</sup> Određivanje topljivosti spomenutog apatita složen je proces zbog njegovog varijabilnog sastava. Pri otapanju spojeva stehiometrija koje imaju različit omjer Ca/P od 1,67 nastaje površinski sloj uglavnom neodređenog sastava koji utječe na topljivost samog spoja i otežava njezino precizno određivanje. Između ostalog na topljivost utječu parametri poput efekta aniona i kiseline kojom se podešava pH-vrijednost zbog kojih topljivost može varirati preko nekoliko redova veličine.<sup>51,52</sup> Osim već spomenutog sastava sličnog anorganskoj fazi kosti, svojstvo koje omogućuje većinu primjena hidroksiapatita njegova je poroznost. U procesu sinteriranja kojim se postiže željeni stupanj poroznosti hidroksiapatita važni su parametri poput temperature pri kojoj se izvodi sam proces, veličine i oblika čestica te stehiometrije i čistoće samog reaktanta.<sup>53</sup>



Slika 16. TEM slika igličastih kristala hidroksiapatita.<sup>48</sup>

### 2.4.2. Primjena hidroksiapatita

Značajan interes mnogih istraživačkih skupina hidroksiapatit dobio je zbog dobrih svojstava opisanih u prethodnom odlomku. Zastupljenost hidroksiapatita seže u mnoga područja no najznačajnija je u ortopedskoj primjeni i dentalnoj medicini. Zahvaljujući spomenutom sastavu sličnom kostima koristi se kao koštani umetak u obliku gustih i poroznih blokova, diskova, granula i omotača. Ono što omogućuje takvu primjenu su bioaktivnost, biokompatibilnost, osteokondukcija i poroznost hidroksiapatita. Poroznost omogućuje snažno vezanje na kosti i mehaničko blokiranje koje vodi do fiksiranja materijala. U samim porama raste koštano tkivo i čini vezu između kosti i umetka jačom. Zbog bioaktivnosti hidroksiapatita on može stvoriti kemijsku vezu s kosti te se integrirati u njezinu strukturu. Budući da je biokompatibilan odnosno neotrovan i ne oštećuje okolna tkiva dobiva još više na važnosti u biomedicinskim znanostima. Kako bi se poboljšao biomimetički odgovor umetaka s hidroksiapatitom, sintetiziraju se njegove nanočestice koje imaju veliku specifičnu površinu i čine interakciju koštanih stanica i čestica umetka bržom. Najbolji rezultati u ortopedskoj primjeni dobivaju se kombinacijom hidroksiapatita s bioinertnim metalima poput aluminijsa i cirkonija koji mu poboljšavaju mehanička svojstva.<sup>54</sup> Osim u ortopediji i dentalnoj medicini, hidroksiapatit primjenjuje se u dostavi lijekova poput antibiotika, kromatografiji i katalizi. Zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava, primjerice topljivosti u fiziološkim uvjetima i stvaranja veza s molekulama lijeka, hidroksiapatit pokazao se dobrim kandidatom za sustav dostave lijekova. Kako bi se eliminirale nepoželjne upalne reakcije mekog tkiva, u biomedicinskoj primjeni poželjna je sferična geometrija čestica koja je prikazana na slici 17.<sup>55</sup>



Slika 17. SEM slika sferičnih čestica hidroksiapatita.<sup>55</sup>

## 2.5. Kalcijev karbonat

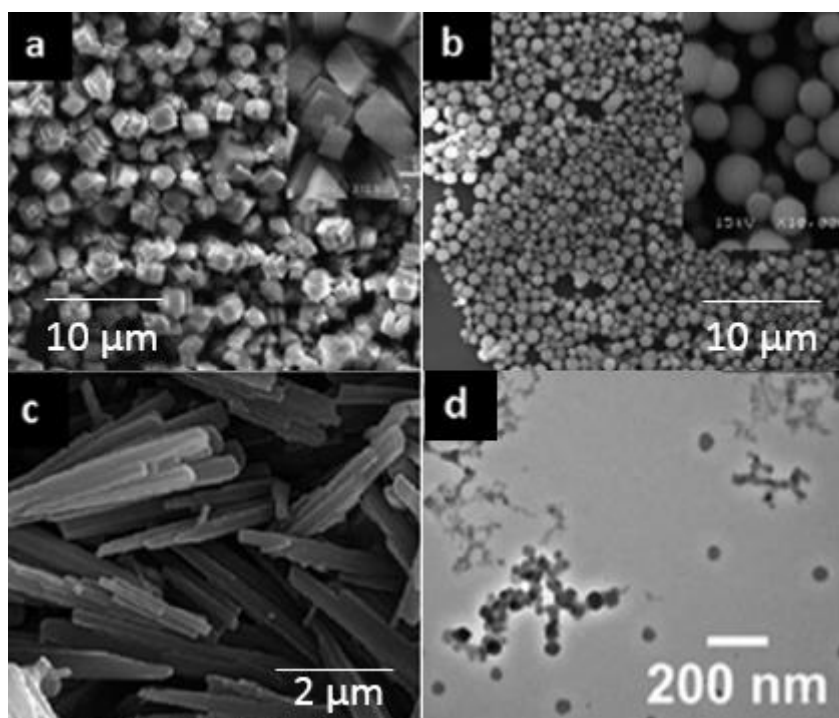
Uz prethodno opisan hidroksiapatit, u biomedicinskoj primjeni često je korišten kalcijev karbonat. Kao najvažniji spoj kalcija pojavljuje se u mnogim prirodnim izvorima poput vapnenca, krede i mramora. Također uz silicijev dioksid, najzastupljeniji je mineral u sastavu Zemljine kore. Ostali prirodni izvori biološkog su podrijetla te se pronalaze u ljušturama školjkaša, puževa te kostima sisavaca i ptica. Jedna od najčešće primjenjivanih metoda dobivanja kalcijeva karbonata svakako je izolacija iz navedenih prirodnih izvora koja se izvodi u tri koraka. Nakon termičke razgradnje pri visokim temperaturama na kalcijev oksid i ugljikov dioksid reakcijom s vodom nastaje kalcijev hidroksid odnosno gašeno vapno. Željeni produkt dobiva se reakcijom kalcijeva hidroksida s ugljikovim dioksidom. Uz opisanu metodu izolacije, koriste se i sintetske metode poput precipitacije i mehanokemije.

### 2.5.1. Svojstva i primjena kalcijeva karbonata

Uz kalcit koji je termodinamički najstabilniji polimorf pri ambijentalnim uvjetima, u prirodi se pojavljuju aragonit i vaterit te amorfni kalcijev karbonat. Kao posljedica različitih koordinacija kalcija, javljaju se različite morfologije kristalnih formi koje su prikazane na slici 18. Priređeni amorfni kalcijev karbonat nestabilna je i kratkoživuća forma te iz tog razloga služi kao klica za kristalizaciju željene kristalne forme. Čisti kalcijev karbonat tvar je slabe topljivosti u vodi koja se povećava dodatkom ugljikovog dioksida. Njegove nanočestice odlikuju svojstva poput velike specifične površine, poroznosti, netoksičnosti i biokompatibilnosti. Upravo su ova svojstva omogućila široku industrijsku primjenu nanočestica kalcijeva karbonata.

U građevinskoj industriji, kalcijev karbonat koristi se kao građevni materijal i sirovina za dobivanje živog vapna. Kao jedna od važnijih primjena, ističe se ona u papirnoj industriji gdje se koristi kao punilo. U kombinaciji kalcijeva karbonata s određenim vezivima dobivaju se svojstva superhidrofobnosti te odgovarajuće svjetline papira. Zahvaljujući velikoj poroznosti i specifičnoj površini njegovih nanočestica, postiže se bolje zadržavanje tinte i ulja na papiru. Osim u industriji papira, kao punilo koristi se i za boje, pigmente i plastiku.<sup>56,57</sup>

Kada se govori o primjeni kalcijeva karbonata svakako je važno spomenuti njegovu široku biomedicinsku primjenu. Kompatibilnost i netoksičnost prema organizmu čine kalcijev karbonat atraktivnim sustavom za dostavu lijekova pri čemu se koriste šuplje ili porozne sferične čestice. Budući da su takva svojstva pobudila velik interes znanstvenika, do sada su mnoge biomakromolekule i lijekovi uspješno inkorporirani u njegove sfere i otpušteni u organizmu. Uz primjenu kao sustav za dostavu lijekova, kalcijev se karbonat potencijalno može primjenjivati kao materijal za koštane umetke. Za takvu primjenu zanimljivo je istraživanje stabilizacije amornog kalcijeva karbonata zbog njegove sposobnosti poprimanja različitih oblika prije kristalizacije što je od velike važnosti pri regeneraciji kostiju. Također, uz već spomenute primjene, kalcijev karbonat često je korišten u katalizi, farmaceutskoj industriji te u proizvodnji mnogih funkcionalnih materijala kao biosenzora.<sup>55</sup>



Slika 18. SEM snimke polimorfa kalcijeva karbonata:

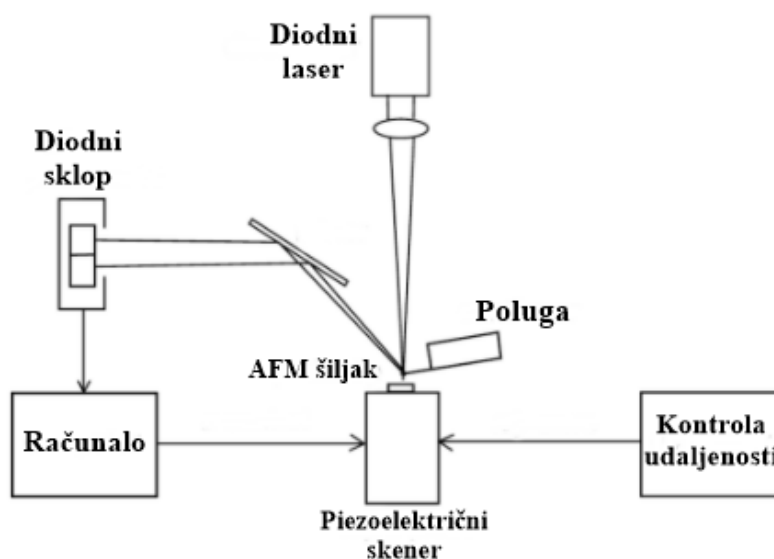
- a) kalцит; b) vaterit; c) aragonit;
- d) amorfni kalcijev karbonat.

Umetak na slici a) predstavlja sliku uvećanu 5 puta dok je na slici b) umetak uvećanje od 10 puta. (preuzeto i prilagođeno iz ref. 56)

## § 3. TEORIJSKA OSNOVICA

### 3.1. Mikroskopija atomskih sila

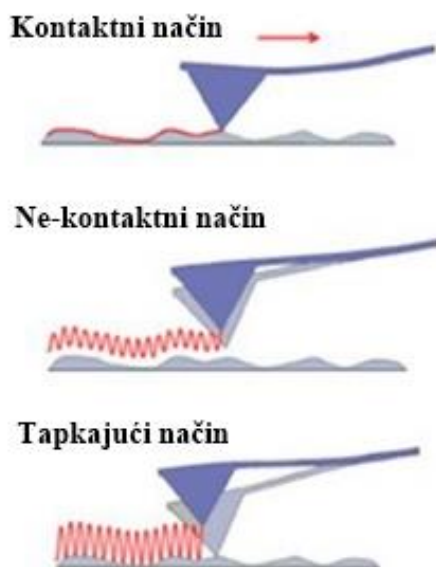
Mikroskop atomskih sila (*atomic force microscope*, AFM) uređaj je kojim se snima topografija površina nanometarskom rezolucijom. Metoda se temelji na interakcijama između šiljka pričvršćenog za savitljivu polugu i površine uzorka. Interakcije između šiljka i uzorka uključuju van der Waalsove interakcije, kapilarne sile, Coulombove privlačne ili odbojne interakcije te odbojne steričke interakcije. Interakcijom šiljka s uzorkom dolazi do pomaka poluge. Uslijed pomaka poluge očitavaju se promjene u refleksiji laserske zrake pomoću kojih AFM mjeri silu međudjelovanja šiljka i uzorka. Uzorak se postavlja na piezoelektrično postolje koje pomiče uzorak ispod šiljka ili šiljak površinom uzorka sve dok ne dođe do interakcije. Zbog horizontalnih pomaka piezoelektričnog postolja površina uzorka se skenira, a sila međudjelovanja uzorka i šiljka preračunava se u visinski profil uzorka. Najvažniji dijelovi mikroskopa atomskih sila istaknuti su na slici 19. Šiljak mikroskopa vrlo je sitan dio uređaja koji može biti izrađen od silicija, silicijeva oksida ili silicijeva nitrida. Od velike važnosti je da šiljak bude jako oštar kako bi se postiglo dobro razlučivanje. Cijeli uređaj mora biti vibracijski izoliran iz razloga što su sile međudjelovanja šiljka i uzorka jako male, a iz istog razloga masa poluge mora biti mala.<sup>58,59</sup>



Slika 19. Osnovni dijelovi mikroskopa atomskih sila. (preuzeto i prilagođeno iz ref. 58)

Priprema uzorka za mjerenje mikroskopom atomskih sila minimalna je te površina uzorka ne mora biti vodljiva. Jedno od najbitnijih mehaničkih svojstava koje se može odrediti AFM-om je hrapavost površine. Informacija o hrapavosti potrebna je mnogim industrijskim primjenama poput industrije boja i lakova. AFM ima značajnu važnost i u kemijskoj, prehrambenoj, farmaceutskoj i industriji plastike te u medicini i elektronici.

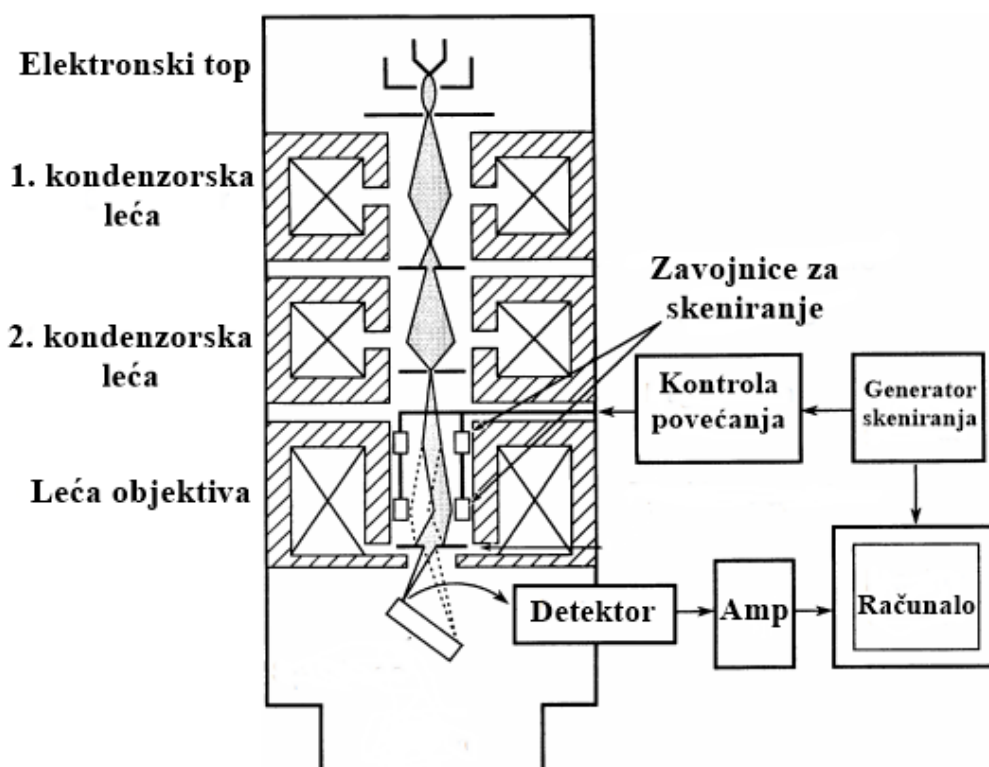
Razlikujemo kontaktni i dinamički način rada AFM-a. U kontaktnom načinu rada šiljak i površina uzorka su u kontinuiranom kontaktu. Ovakvim načinom rada može doći do oštećenja uzorka zbog čega se on ne primjenjuje pri obradi mekih i osjetljivih uzoraka kao što su biološki. Dinamički način rada sastoji se od prelaženja površine uzorka šiljkom pri čemu šiljak oscilira gore-dolje i ne postoji opasnost od oštećenja uzorka. Korištenjem dinamičkog načina rada otvaraju se dvije mogućnosti snimanja uzorka: ne-kontaktni i tapkajući način. Tapkajućim načinom površina uzorka obrađuje se tako da šiljak povremeno dolazi u kontakt s uzorkom dok je u ne-kontaktном načinu šiljak na određenoj udaljenosti od površine uzorka.<sup>60</sup> Odabir metode ovisi o površini i svojstvima uzorka. Princip sva tri načina rada AFM-a prikazan je na slici 20.



Slika 20. Tri različita principa rada AFM-a. (preuzeto i prilagođeno iz ref. 58)

### 3.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Skenirajući elektronski mikroskop (SEM) najčešće je korišten tip elektronskog mikroskopa koji ispituje mikroskopsku strukturu uzorka skeniranjem površine materijala visokom rezolucijom. Metoda pruža informacije o veličini i morfologiji čestica, debljini filmova te strukturi i raznim defektima uzorka. Princip rada mikroskopa je precizno skeniranje uzorka fokusiranim snopom elektrona. Izvori elektrona mogu biti elektronski, termionski ili topovi koji rade na principu emisije polja. Elektroni se nakon izbacivanja fokusiraju i usmjeravaju pomoću nekoliko elektromagnetskih leća uključujući kondenzorske i leće objektivna. Interakcijom elektrona s uzorkom nastaju različiti signali koji se detektiraju s tri detektora. Elektroni raspršeni unazad (BSE) primarni su elektroni iz snopa koji su se odbili od uzorka tijekom elastičnih međudjelovanja s jezgrom iz uzorka. Takvi se elektroni detektiraju BSE detektorom. Sekundarne elektrone (SE) detektira SE detektor, a to su elektroni iz vanjskih razina atoma uzorka izbačeni pomoću interakcije s primarnim elektronima iz snopa. Treći detektor je energijsko disperzivni spektrometar rendgenskih zraka (EDS) koji omogućava elementnu analizu uzorka u području blizu površine uzorka.<sup>61</sup> Opisani dijelovi SEM-a nalaze se na slici 21.



Slika 21. Princip rada i osnovni dijelovi SEM-a. (preuzeto i prilagođeno iz ref. 61)

SEM instrumenti zahtijevaju visoki vakuum kako čestice zraka ne bi poremetile putanju elektrona. Jedna od najvećih prednosti ove metode je mogućnost da objekti različite visine na površini uzorka ostanu u fokusu. Također, ono što često čini SEM prvim izborom je da uzorak može biti u bilo kojoj formi ali mora biti vodljiv. Ukoliko to nije slučaj, uzorak se naparuje vodljivim materijalom u vakuumu, najčešće zlatom ili platinom. Iz navedenih razloga, metoda ima široku primjenu u mnogim prirodnim znanostima, tekstilnoj industriji i forenzici.

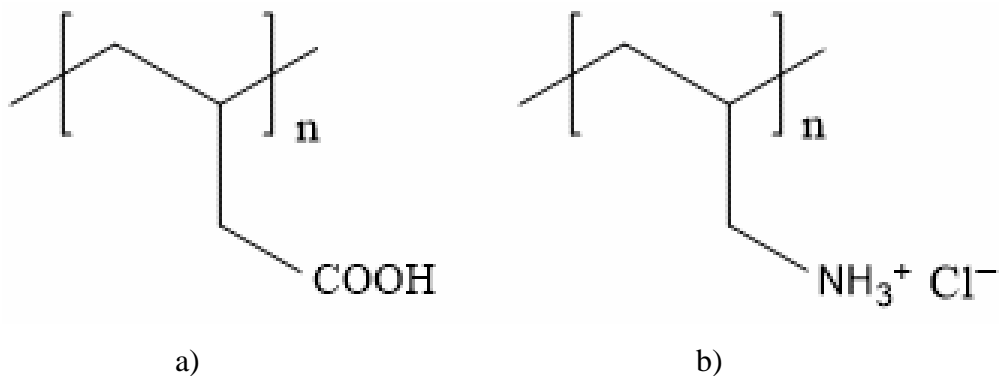


## § 4. EKSPERIMENTALNI DIO

### 4.1. Materijali

U izvedbi ovog diplomskog rada korištene su sljedeće kemikalije bez dodatnog pročišćavanja:

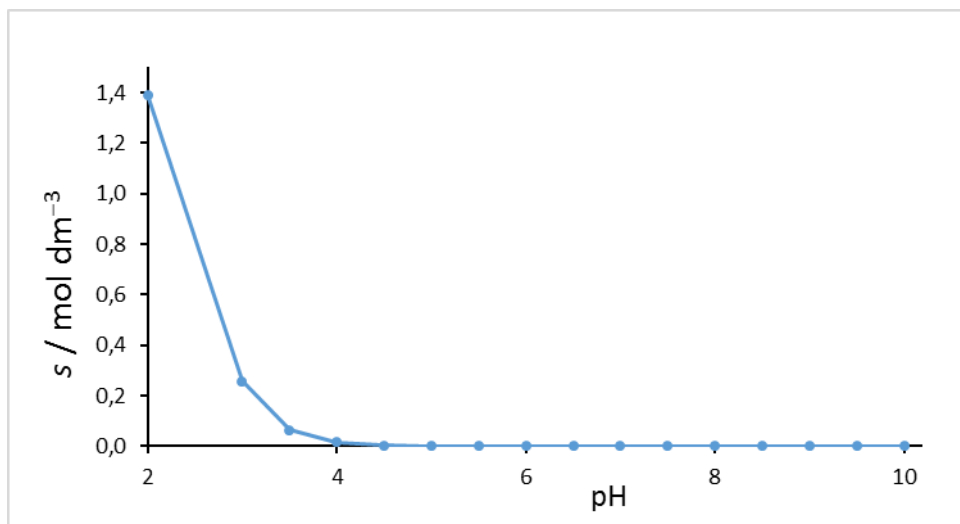
- kalcijev karbonat,  $\text{CaCO}_3$ , *p.a.* (*Sigma Aldrich*)
- hidroksiapatit,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_2$ , *p.a.* (*Sigma Aldrich*)
- poli(alilamin hidroklorid), PAH,  $M_w = 17\,500\text{ g mol}^{-1}$ , (*Sigma Aldrich*)
- poli(akrilna kiselina), PAA,  $M_n = 130\,000\text{ g mol}^{-1}$ , (*Sigma Aldrich*)
- natrijev perklorat,  $\text{NaClO}_4$ , *p.a.* (*Sigma Aldrich*)
- natrijev klorid,  $\text{NaCl}$ , *p.a.* (*Sigma Aldrich*)
- natrijev hidroksid,  $\text{NaOH}$ , *p.a.* (*Sigma Aldrich*)
- klorovodična kiselina,  $\text{HCl}$ , *p.a.* (*VWR Chemicals*)
- kalijev bromid,  $\text{KBr}$ , *p.a.* (*Sigma Aldrich*)
- etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), *p.a.*, (*Fluka*)
- aceton, 99,5 % (*T. T. T*)
- standardni pufer,  $\text{pH} = 3$  (*Kemika*)
- standardni pufer,  $\text{pH} = 5$  (*Kemika*)
- standardni pufer,  $\text{pH} = 7$  (*Kemika*)
- standardni pufer,  $\text{pH} = 9$  (*Kemika*)
- jednostrano polirani diskovi od silicija, P-tipa, (100) orijentacije, dopirani borom, promjera 15 cm, debljine  $675 \pm 25\ \mu\text{m}$ , (*Siltronic AG*)
- deionizirana voda



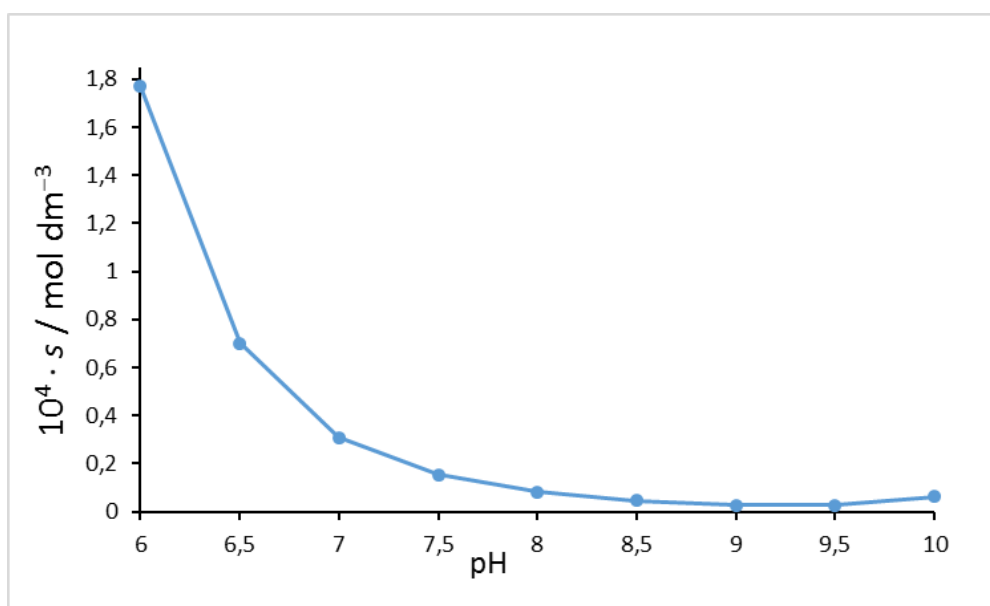
Slika 22. Strukture polielektrolita korištenih za izradu diplomskog rada: (a) PAA - poli(akrilna kiselina) i (b) PAH - poli(alilamin hidroklorid).

#### 4.2. Računanje topljivosti hidroksiapatita

Za izračunavanje topljivosti hidroksiapatita pri različitim pH-vrijednostima korišten je program *PHREEQC 3*, u kojem se fiksiraju ulazni parametri.<sup>62</sup> Temperatura pri kojoj se računa topljivost postavljena je na 25 °C, a množinski udio ugljikova dioksida u zraku na 340 ppm. Kao ulazni podaci postavljaju se i koncentracija ostalih tvari u sustavu, u ovom slučaju natrijev perklorat ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ), te kiselina ili baza kojom se pH-vrijednost podešava (HCl i NaOH). Uz navedene parametre, unešena je i pretpostavka da se pri otapanju hidroksiapatita, ukoliko se sve otopi, neće otopiti više od 10 mola tvari. Na slici 23. prikazana je topljivost pri različitim pH vrijednostima, u području od 2 do 10, dok je na slici 24. prikazano pH područje od 6 do 10 kako bi se istaklo povećanje topljivosti nakon pH-vrijednosti od 9,5.



Slika 23. Topljivost hidroksiapatita pri različitim pH-vrijednostima,  $\theta = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



Slika 24. Topljivost hidroksiapatita u uvećanom području pH-vrijednosti od 6 do 10,  $\theta = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Na temelju dobivenih vrijednosti, za sintezu šupljih sfera na hidroksiapatitu odabrana je pH vrijednost od 8,8. Pri toj vrijednosti topljivost hidroksiapatita vrlo je mala, a gustoća naboja slabih polielektrolita PAH i PAA je maksimalna i prikladna za sintezu.<sup>5</sup>

### 4.3. Sinteza šupljih sfera

#### 4.3.1. Polielektrolitni višeslojevi na česticama kalcijeva karbonata

Masena koncentracija ishodnih otopina polielektrolita (PAH i PAA) iznosila je  $\gamma = 2 \text{ mg mL}^{-1}$  a koncentracija pozadinskog elektrolita NaCl bila je  $c(\text{NaCl}) = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  ili  $c(\text{NaCl}) = 0,001 \text{ mol dm}^{-3}$ . Prije same sinteze, pH-vrijednosti otopina polielektrolita podešene su na  $\text{pH} = 6,5$  pomoću natrijeve lužine ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Za mjerenje pH-vrijednosti korištena je kombinirana elektroda (tip 6.0234.100, *Metrohm*,  $3 \text{ mol dm}^{-3}$  KCl) (prethodno baždarena pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  s puferima pH-vrijednosti 3, 5, 7, 9) uz pH-metar *913 pH Lab, Metrohm*. Volumeni otopina polielektrolita dodavani u Falcon epruvete u kojima su se nalazile čestice kalcijeva karbonata ( $m = 100 \text{ mg}$ ) iznosili su  $V = 10 \text{ mL}$ . Nakon svakog dodatka polielektrolita suspenzija je miješana 10 minuta na sobnoj temperaturi rotacijskom miješalicom. Suspenzija je po zavšetku miješanja centrifugirana (Centric 400 R, *Domel*) 5 minuta silom od 300 G.

Supernatant je uklonjen, a čestice su ispirane 3 puta otopinom natrijeva klorida ( $c = 0,002 \text{ mol dm}^{-3}$ ), pri čemu su poslije svakog dodatka otopine za ispiranje, čestice bile resdispergirane a suspenzije miješane 10 minuta i centrifugirane istim uvjetima. Nakon adsorpcije svakog sloja izmjerene su vrijednosti elektrokinetičkog (zeta) potencijala o čemu će biti riječ u idućim odlomcima. Pripremljena su 4 sloja na sferama kalcijeva karbonata.

#### 4.3.2. Polielektrolitni višeslojevi na česticama hidroksiapatita

Ishodne otopine PAH i PAA polielektrolita pripremljene su u koncentraciji  $\gamma = 2 \text{ mg mL}^{-1}$  a koncentracija pozadinskog elektrolita  $\text{NaClO}_4$  iznosila je  $c(\text{NaClO}_4) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ . Prije adsorpcije polielektrolita pH-vrijednosti polielektrolitnih otopina podešene su na  $\text{pH} = 8,8$  natrijevom lužinom ( $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Za mjerenje pH-vrijednosti korištena je kombinirana elektroda (tip 6.0234.100, *Metrohm*,  $3 \text{ mol dm}^{-3}$  KCl) prethodno baždarena pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  s puferima pH-vrijednosti 3, 5, 7, 9 uz pH-metar *913 pH Lab, Metrohm*. Volumeni otopina polielektrolita dodavani u Falcon epruvete u kojima su se nalazile čestice hidroksiapatita ( $m = 50 \text{ mg}$ ) iznosili su  $V = 10 \text{ mL}$ . Nakon adsorpcije svakog od 4 sloja polielektrolita, suspenzija je miješana 15 minuta rotacijskom miješalicom i centrifugirana (Centric 400 R, *Domel*) 5 minuta silom od 300 G. Supernatant je uklonjen a čestice su ispirane 3 puta deioniziranom vodom (pH-vrijednost podešena na 8,8). Poslije svakog dodatka otopine za ispiranje čestice su resdispergirane a njihove

suspenzije miješane 5 minuta i centrifugirane 5 minuta silom od 300 G. Uspješnost adsorpcije svakog sloja provjeravana je mjerenjem elektrokinetičkog potencijala.

#### 4.3.3. Uklanjanje supstrata i sinteza šupljih sfera

U svrhu dobivanja šupljih nanosfera hidroksiapatitna jezgra pokušala se ukloniti na tri načina: otopinom etilendiamintetraoctene kiseline te otopinom klorovodične kiseline pH-vrijednosti 3,0 i približno 1,5. Otopina etilendiamintetraoctene kiseline ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ) dodana je polielektrolitnim nanosferama u volumenu od 10 mL. Reakcijska smjesa miješana je 24 sata pri čemu se nakon 19 i 23 sata dodalo svježih 10 mL EDTA kako bi se pospješilo otapanje. Uslijed svake promjene otopine suspenzija je centrifugirana 5 minuta silom od 300 G. Nakon otapanja, čestice su ispirane tri puta deioniziranom vodom (pH-vrijednost podešena na 8,8). Preostale metode uklanjanja jezgre bile su dodavanje otopina pH-vrijednosti 3,0 i približno 1,5 suspenziji čestica hidroksiapatita obloženih polielektrolitim višeslojem. U slučaju otapanja jezgre s otopinom pH-vrijednosti 3,0 postupak je bio isti kao i s otopinom EDTA, odnosno suspenzija je miješana 24 sata i 2 puta je promijenjena otopina, prvi put nakon 19 sati i drugi put nakon 23 sata. U slučaju otapanje jezgre s otopinom pH-vrijednosti oko 1,5, 10 mL otopine HCl dodano je u koloidnu otopinu i ona je miješana 21 sat nakon čega je tretirana identično kao i otopine s EDTA i one pH-vrijednosti 3. Svi produkti nakon zadnjeg ispiranja sušeni su u eksikatoru preko noći te su potom snimljeni njihovi IR spektri.

### 4.4. Instrumentne metode

#### 4.4.1. Mjerenja elektrokinetičkog potencijala

Elektrokinetička mjerenja provedena su instrumentom *Zeta Potential Analyzer* tvrtke *Brookhaven Instruments Corporation*. Princip na kojem instrument radi je Dopplerov efekt. Elektroda je uronjena u kivetu s uzorkom te generira električno polje. Upadna laserska zraka usmjerena je prema uzorku a mjeri se frekvencija raspršenog zračenja. Iz razlike frekvencija upadnog i raspršenog zračenja dobiva se pokretljivost čestica koja je proporcionalna spomenutoj razlici frekvencija. Pomoću različitih teorijskih modela, poput Smoluchowskog, poznavanjem elektroforetske pokretljivosti dolazi se do informacije o elektrokinetičkom potencijalu, čiji predznak govori o predznaku naboja čestica.<sup>63</sup> U ovome radu sva elektrokinetička mjerenja izvedena su pri 25 °C s 2 mL uzorka čestica dispergiranih u ultračistoj

vodi u plastičnim kivetama. Početna koncentracija čestica hidroksiapatita bila je  $\gamma = 1,25 \text{ mg mL}^{-1}$ , a čestica kalcijeva karbonata  $\gamma = 2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Kao izvor laserskog zračenja korišten je He-Ne laser valne duljine 635 nm. Uzorci su podvrgnuti mjerenjima elektroforetske pokretljivosti bez prethodnog razrjeđivanja, a u slučaju čestica hidroksiapatita i kalcijeva karbonata, nakon tretiranja ultrazvučnom sondom.

#### 4.4.2. Dinamičko raspršenje svjetlosti

Mjerenja dinamičkog raspršenja svjetlosti provedena su uređajem *90 Plus Particle Size Analyzer* tvrtke *Brookhaven Instruments Corporation*. Metoda je korištena za određivanje prosječnih hidrodinamičkih promjera čestica. Izvor zračenja monokromatski je laser valne duljine  $\lambda = 635 \text{ nm}$ . Instrument prati vremenske fluktuacije intenziteta raspršenog zračenja, uslijed Brownovog gibanja čestica, na temelju kojih je moguće izračunati difuzijske koeficijente čestica. Stokes-Einsteinovom jednačbom, uz poznatu viskoznost medija ( $\eta$ ) i temperaturu ( $T$ ), dobiva se hidrodinamički promjer čestica:

$$d = \frac{k_B T}{3 \pi \eta D} \quad (1)$$

pri čemu je  $D$  difuzijski koeficijent čestica a  $k_B$  Boltzmannova konstanta. Pretpostavka koja se uvodi tom jednačbom je da su čestice sferne geometrije.<sup>64</sup> Raspršeno zračenje detektirano je pod kutem od  $\theta = 90^\circ$  u odnosu na upadno zračenje. Snimanja su provedena pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  u plastičnim kivetama s 2 mL uzorka vodene koloidne otopine koncentracije. Početna koncentracija čestica hidroksiapatita bila je  $\gamma = 1,25 \text{ mg mL}^{-1}$ , a čestica kalcijeva karbonata  $\gamma = 2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Na svakom od uzoraka učinjeno je 10 mjerenja. Podaci su obrađeni u *Brookhaven Instruments Particle Sizing Software Version 5.33*.<sup>65</sup>

#### 4.4.3. Infracrvena spektroskopija

Temelj infracrvene spektroskopije interakcija je tvari i elektromagnetskog zračenja u infracrvenom području elektromagnetskog spektra. Apsorpcijom zračenja dolazi do prijelaza između vibracijskih i rotacijskih stanja molekule. Ukoliko tijekom vibracije dolazi do promjene električnog dipolnog momenta molekule, ona će apsorbirati IR zračenje. Snimanjem

apsorbancije ili transmitancije zračenja pri različitim valnim duljinama infracrvenog zračenja dobivaju se vibracijski spektri kojima se može odrediti kemijski sastav tvari i molekulska struktura istih. Područje valnih brojeva u kojima su snimljeni spektri za ovaj rad je 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  uz spektralno razlučivanje od 4  $\text{cm}^{-1}$ . Uzorci su pripremljeni u obliku KBr pastille, a snimani su pomoću FT-IR spektrofotometra *Perkin Elmer Spectrum Two*. Pastile su uvijek pripremane prešanjem smjese koja je sadržavala 2 mg uzorka i 200 mg KBr-a tako da budu približno iste debljine kako bi se mogla napraviti kvantitativna analiza. Dobiveni spektri uprosječeni su rezultat 32 uzastopna snimanja i obrađeni su pomoću programskog paketa *Omnisc 9.2.86*.<sup>66</sup>

#### 4.4.4. Mikroskopija atomskih sila

Ambijentalna AFM mjerenja provedena su pri sobnoj temperaturi i vlažnosti zraka 30–60 % na komercijalnom Multimode 8 AFM-u (*Bruker*). Snimanja su provedena u dinamičkom tapkajućem načinu rada. Korištene su NCHV-A silicijske probe tvrtke *Bruker* sa nominalnom konstantom opruge od 40 N/m, nominalnom rezonantnom frekvencijom od 320 kHz i nominalnim radijusom zakrivljenosti vrha šiljka od 8 nm. Cijeli postav AFM-a nalazi se na antivibracijskom stolu za izolaciju od mehaničkih vibracija. Priprema uzorka sastojala se od nakapavanja koloidne otopine na silicijsku pločicu približne površine 1 cm x 1 cm te isparavanja otapala. Procesuiranje samog AFM mjerenja učinjeno je računalnim programom *NanoScope Version 9.7*, dok je analiza dobivenih podataka provedena pomoću programskog paketa *NanoScope Analysis 2.0*.<sup>67</sup>

#### 4.4.5. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Za izradu SEM slika u ovom radu korišten je skenirajući elektronski mikroskop VEGA3 Tescan (*Tescan Analytics*) s volframovom niti. Skeniranje površine provedeno je radnoj udaljenosti od 6,8 mm, pri naponu kojim se ubrzavaju elektroni od 30 kV te u rezolucijskom načinu s detektorom sekundarnih elektrona. Za energijski disperzivnu spektroskopiju rendgenskih zraka korišten je Xflasch 6130 detektor tvrtke *Bruker* a za analizu EDX spektara programski paket *Esprit 2.1*.<sup>68</sup> Priprema uzorka za SEM-EDX mjerenja sastojala se od nakapavanja koloidne otopine čestica na silicijsku pločicu približne površine 1 cm × 1 cm te isparavanja otapala.

## § 5. REZULTATI I RASPRAVA

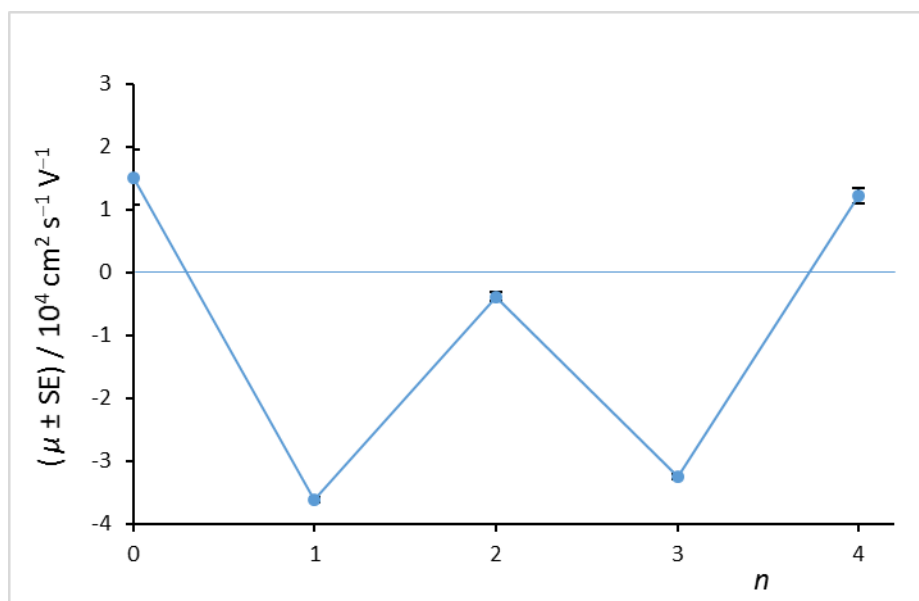
### 5.1. Mjerenja elektrokinetičkog potencijala

Adsorpcija polielektrolita na površinu čestica kalcijeva karbonata i hidroksiapatita praćena je mjerenjem elektroforetske pokretljivosti. Ovisno o naboju površine supstrata prvi je polielektrolit bio pozitivno ili negativno nabijen. U slučaju sinteze kapsula s kalcijevim karbonatom, prvi je sloj bio negativno nabijena poli(akrilna kiselina), dok je kod sfera građenih na površini hidroksiapatita prvi sloj bio pozitivno nabijen poli(alilamin hidroklorid). Nakonadsorpcije svakog sloja i ispiranja suviška nevezanog polimera, suspenzija s česticama podvrgnuta je mjerenju elektrokinetičkog potencijala. Tablica 1. prikazuje mjerene podatke o elektroforetskoj pokretljivosti i odgovarajuće vrijednosti elektrokinetičkog potencijala izračunate na temelju Smoluchowskog modela iz pokretljivosti za sintezu sfera s kalcijevim karbonatom. Čestice samog supstrata bez adsorbiranih višeslojeva predstavljaju rezultat mjerenja s nula slojeva.

Tablica 1. Ovisnost elektroforetske pokretljivosti i elektrokinetičkog potencijala o broju adsorbiranih slojeva polielektrolita na česticama kalcijeva karbonata.  $\gamma(\text{PAH}) = \gamma(\text{PAA}) = 2 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $m_0(\text{CaCO}_3) = 100 \text{ mg}$  i  $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

$n$	$(\mu \pm \text{SE}) / 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$	$(\zeta \pm \text{SE}) / \text{mV}$
0	$1,51 \pm 0,44$	$19,28 \pm 5,69$
1	$-3,62 \pm 0,05$	$-46,37 \pm 0,63$
2	$-0,39 \pm 0,07$	$-5,03 \pm 0,85$
3	$-3,26 \pm 0,04$	$-41,72 \pm 0,55$
4	$1,22 \pm 0,12$	$15,63 \pm 3,30$





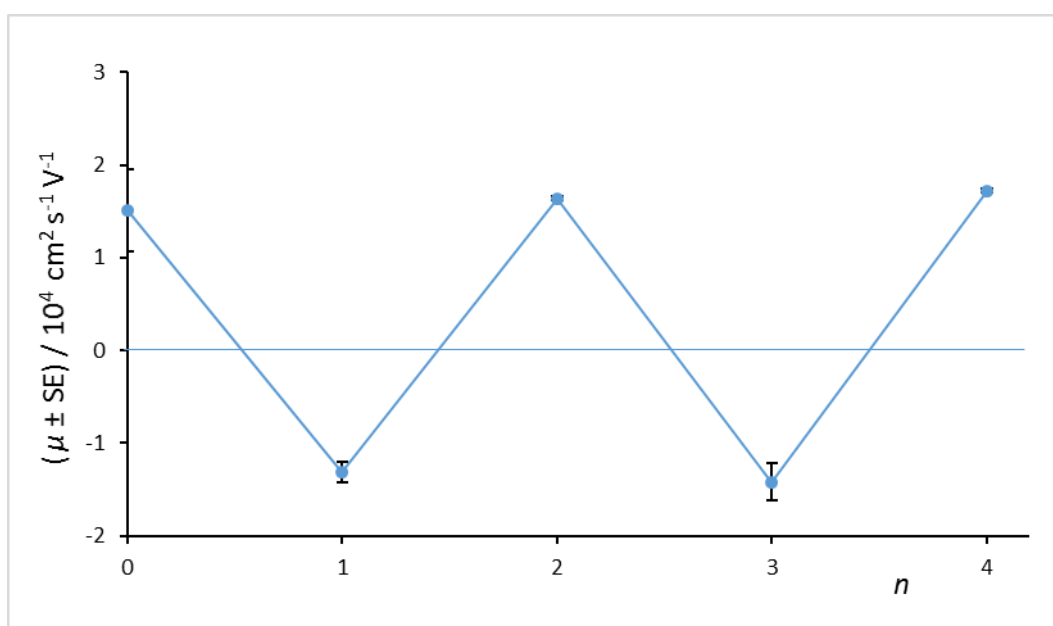
Slika 25. Ovisnost elektroforetske pokretljivosti o broju adsorbiranih slojeva polielektrolita na česticama kalcijeva karbonata pri  $\gamma(\text{PAH}) = \gamma(\text{PAA}) = 2 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $m_0(\text{CaCO}_3) = 100 \text{ mg}$  i  $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Plava linija dodana je na grafički prikaz da bi se lakše pratio trend.

Ovisnost na slici 25. prikazuje praćenje uspješnosti adsorpcije polielektrolita na čestice kalcijeva karbonata. Jasno se uočava cik-cak promjena elektroforetske pokretljivosti s brojem adsorbiranih slojeva polielektrolita koja je opažena primjerice prilikom pripreve PAH/PAA višesloja na površini čestica polistirena<sup>69</sup> i prilikom formiranja PDADMAC/PSS višesloja na površini čestica silike.<sup>70</sup> U slučaju adsorpcije drugog sloja odnosno pozitivno nabijenog PAH-a vidljivo je da elektroforetska pokretljivost ne poprima pozitivnu vrijednost nego samo manje negativnu u odnosu na prethodni sloj PAA. Razlog tome može biti nepotpuna adsorpcija PAH-a i njegovo slabije vezanje na prethodni sloj. Adsorpcija idućih slojeva pokazala se uspješnom i dovela do potpunog prenanabijanja površine. Oblaganje  $\text{CaCO}_3$  čestica polielektrolitnim filmom pri ovim uvjetima rezultiralo je nestabilnim koloidnim sustavom. Uzrok tom vjerojatno je poprilično velika koncentracija pozadinskog elektrolita, zbog čega je sinteza ponovljena pri manjoj koncentraciji NaCl,  $c(\text{NaCl}) = 0,001 \text{ mol dm}^{-3}$ . U tablici 2. sadržane su vrijednosti elektroforetske pokretljivosti i zeta potencijala pri različitom broju slojeva za pripravu višeslojeva na  $\text{CaCO}_3$  česticama pri manjoj koncentraciji pozadinskog elektrolita.

Tablica 2. Ovisnost elektroforetske pokretljivosti i elektrokinetičkog potencijala o broju adsorbiranih slojeva polielektrolita na česticama kalcijeva karbonata.  $\gamma(\text{PAH}) = \gamma(\text{PAA}) = 2 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 0,001 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $m_0(\text{CaCO}_3) = 100 \text{ mg}$  i  $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

$n$	$(\mu \pm \text{SE}) / 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$	$(\zeta \pm \text{SE}) / \text{mV}$
0	$1,51 \pm 0,44$	$19,28 \pm 5,69$
1	$-1,31 \pm 0,11$	$-16,77 \pm 1,35$
2	$1,64 \pm 0,02$	$20,96 \pm 0,20$
3	$-1,42 \pm 0,20$	$-18,14 \pm 2,56$
4	$1,72 \pm 0,02$	$22,02 \pm 0,22$

Slika 26. predstavlja grafički prikaz rezultata iz tablice 2. Može se primjetiti kako se je pri nižoj koncentraciji NaCl-a adsorpcija svih slojeva pokazala uspješnom te je nužan uvjet za nastajanje polielektrolitnih višeselojeva, prenašanje površine, ostvaren.



Slika 26. Ovisnost elektroforetske pokretljivosti o broju adsorbiranih slojeva polielektrolita na česticama kalcijeva karbonata pri  $\gamma(\text{PAH}) = \gamma(\text{PAA}) = 2 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 0,001 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $m_0(\text{CaCO}_3) = 100 \text{ mg}$  i  $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Plava linija dodana je na grafički prikaz da bi se lakše pratio trend.

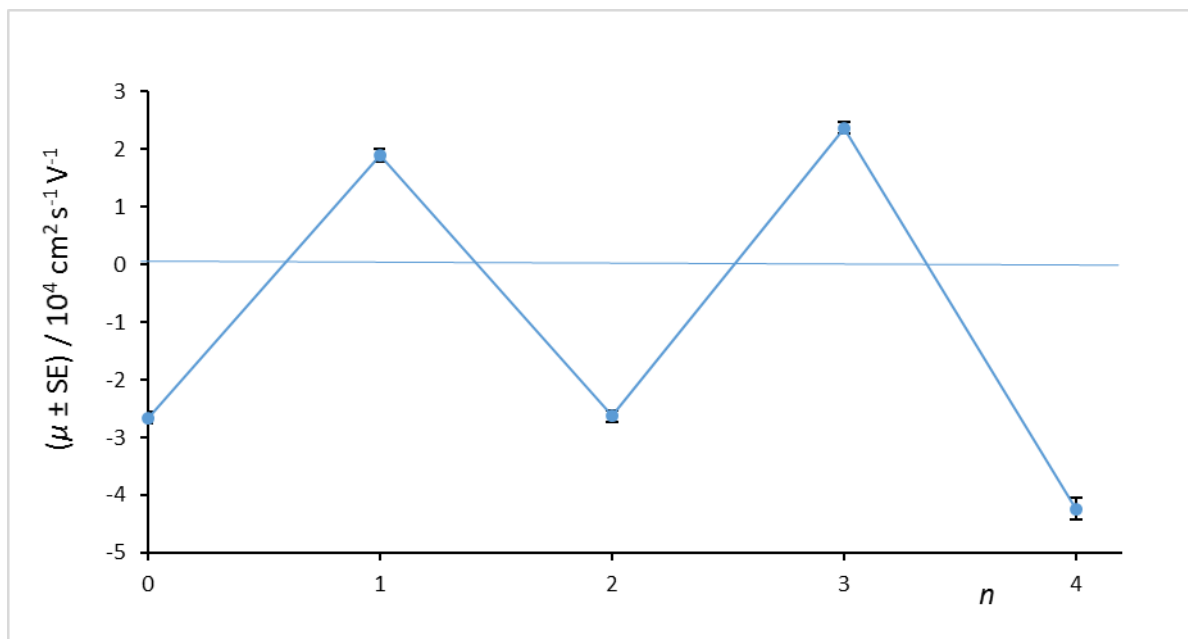
Sustav dobiven pripravom pri manjoj koncentraciji pozadinskog elektrolita pokazao se stabilnijim od prethodnog, ali i dalje nedovoljno koloidno stabilnim za daljnja istraživanja. Čestice su jako brzo agregirale u otopini i u konačnici sedimentirale.

Kako bi se savladala takva prepreka, sinteza sfera provedena je na česticama hidroksiapatita. Topljivost hidroksiapatita manja je pri pH-vrijednostima koje su potrebne za očuvanje gustoće naboja korištenih slabih polielektrolita što dovodi do stabilnijeg sustava. Parametar u pripravi PAH/PAA višesloja na hidroksiapatitu koji je promijenjen u odnosu na pripravu višesloja s kalcijevim karbonatom je dodani pozadinski elektrolit. U slučaju formiranja višesloja na česticama hidroksiapatita u otopine polielektrolita dodan je natrijev perklorat umjesto natrijeva klorida. Koncentracija  $\text{NaClO}_4$  u otopinama polielektrolita iznosila je  $c(\text{NaClO}_4) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ . Vrijednost koncentracije  $\text{NaClO}_4$  odabrana je kako bi se dobili čim deblji slojevi polielektrolita na česticama i kako sačuvala koloidna stabilnost sustava. Tablica 3. sadrži vrijednosti elektroforetske pokretljivosti i zeta potencijala pri različitom broju slojeva polielektrolita za sintezu sfera na hidroksiapatitu.

Tablica 3. Ovisnost elektroforetske pokretljivosti i elektrokinetičkog potencijala o broju adsorbiranih slojeva polielektrolita na česticama hidroksiapatita.  $\gamma(\text{PAH}) = \gamma(\text{PAA}) = 2 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c(\text{NaClO}_4) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $m_0(\text{hidroksiapatit}) = 50 \text{ mg}$ ,  $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

$n$	$(\mu \pm \text{SE}) / 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$	$(\zeta \pm \text{SE}) / \text{ mV}$
0	$-2,66 \pm 0,10$	$-34,05 \pm 1,32$
1	$1,89 \pm 0,11$	$24,21 \pm 1,36$
2	$-2,63 \pm 0,10$	$-33,66 \pm 1,34$
3	$2,37 \pm 0,10$	$30,37 \pm 1,26$
4	$-4,24 \pm 0,19$	$-54,33 \pm 2,41$

Na slici 27. prikazani su dobiveni rezultati mjerenja elektroforetske pokretljivosti pri različitom broju slojeva adsorbiranih polielektrolita. Prema rezultatima iz tablice 3. i grafičkom prikazu ovisnosti na slici 27., adsorpcija slabih polielektrolita PAH i PAA na čestice hidroksiapatita bila je uspješna.



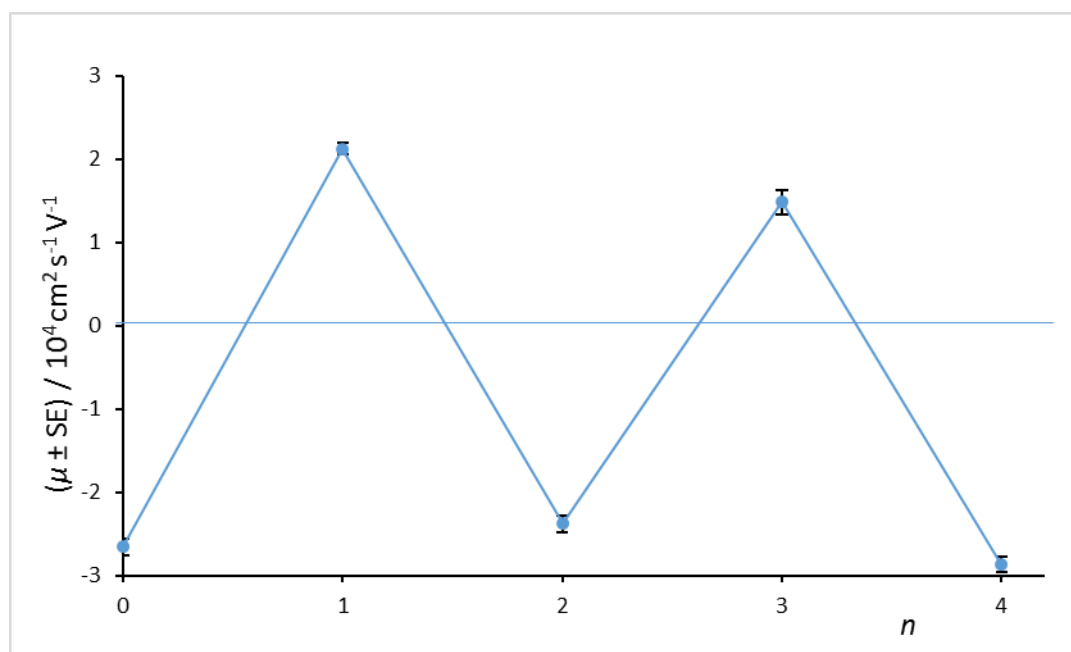
Slika 27. Ovisnost elektroforetske pokretljivosti o broju adsorbiranih slojeva polielektrolita na česticama hidroksiapatita pri  $\gamma(\text{PAH}) = \gamma(\text{PAA}) = 2 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c(\text{NaClO}_4) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $m_0(\text{hidroksiapatita}) = 50 \text{ mg}$  i  $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Plava linija dodana je na grafički prikaz da bi se lakše pratilo trend.

Priprava polielektrolitnog višesloja na hidroksiapatitu rezultirala je stabilnim koloidnim sustavom, prikladnim za daljnje pokuse. Ovakav rezultat ne iznenađuje, zbog izraženog naboja i same veličine, tj. mase čestica obavijenih PAH/PAA višeslojem o čemu će nešto više biti rečeno kasnije. Kako bi se ispitala reproducibilnost sinteze pri tim uvjetima, cijeli je postupak ponovljen. U tablici 4. nalaze se vrijednosti elektroforetske pokretljivosti i elektrokinetičkog potencijala za ponovljenu sintezu sfera s hidroksiapatitom.

Tablica 4. Ovisnost elektroforetske pokretljivosti i elektrokinetičkog potencijala o broju adsorbiranih slojeva polielektrolita na česticama hidroksiapatita.  $\gamma(\text{PAH}) = \gamma(\text{PAA}) = 2 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c(\text{NaClO}_4) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $m_0(\text{hidroksiapatit}) = 50 \text{ mg}$ ,  $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

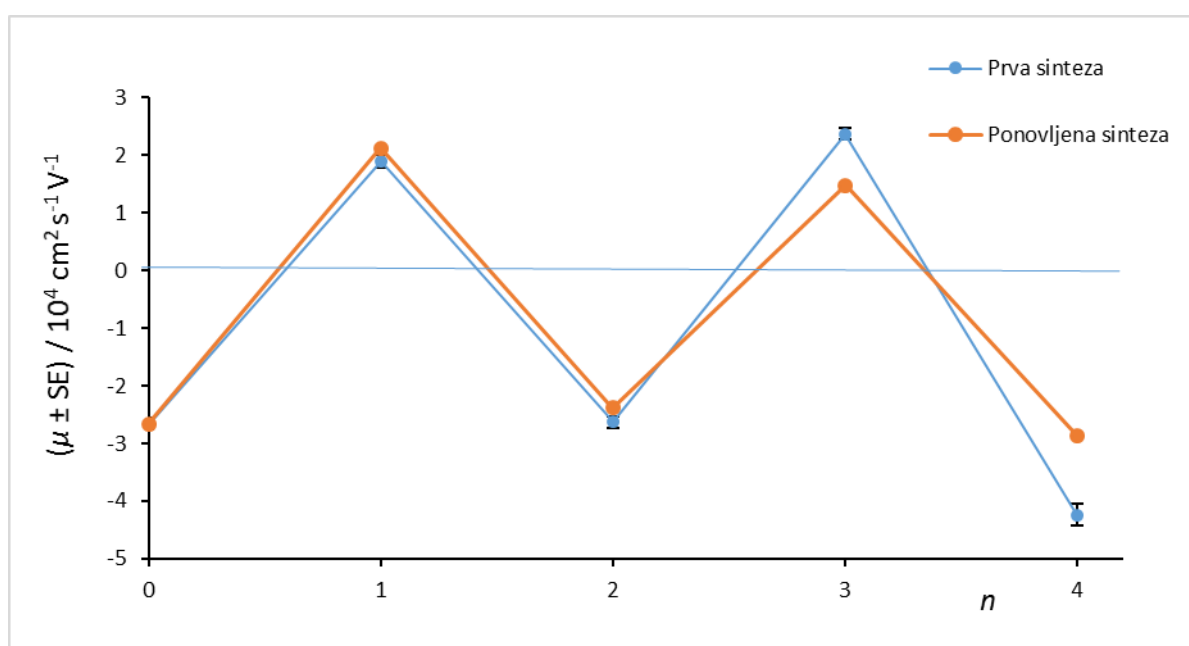
$n$	$(\mu \pm \text{SE}) / 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$	$(\zeta \pm \text{SE}) / \text{ mV}$
0	$-2,66 \pm 0,10$	$-34,05 \pm 1,32$
1	$2,12 \pm 0,07$	$27,16 \pm 0,92$
2	$-2,38 \pm 0,10$	$-30,40 \pm 1,34$
3	$1,48 \pm 0,15$	$18,19 \pm 1,96$
4	$-2,87 \pm 0,09$	$-36,67 \pm 1,17$

Slika 28. prikazuje ovisnost elektroforetske pokretljivosti o broju adsorbiranih slojeva polielektrolita za ponovljenu sintezu sfera na česticama hidroksiapatita.



Slika 28. Ovisnost elektroforetske pokretljivosti o broju adsorbiranih slojeva polielektrolita na česticama hidroksiapatita.  $\gamma(\text{PAH}) = \gamma(\text{PAA}) = 2 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c(\text{NaClO}_4) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $m_0(\text{hidroksiapatita}) = 50 \text{ mg}$  i  $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Plava linija dodana je na grafički prikaz da bi se lakše pratio trend.

Rezultati dobiveni ponovljenom sintezom u skladu su s prethodnom te su na sferama pripremljenim pri tim uvjetima nastavljena daljnja istraživanja. Vrijednosti zeta potencijala zadnjeg sloja odnosno negativno nabijene poli(akrilne kiseline) su  $-54,33 \pm 2,41$  mV za prvu sintezu i  $-36,67 \pm 1,17$  mV za ponovljenu sintezu. Takve vrijednosti sugeriraju stabilnost koloidnog sustava. Na slici 29. uspoređene su vrijednosti elektroforetske pokretljivosti za dvije sinteze, kako bi se uvidjelo poklapanje dobivenih rezultata.

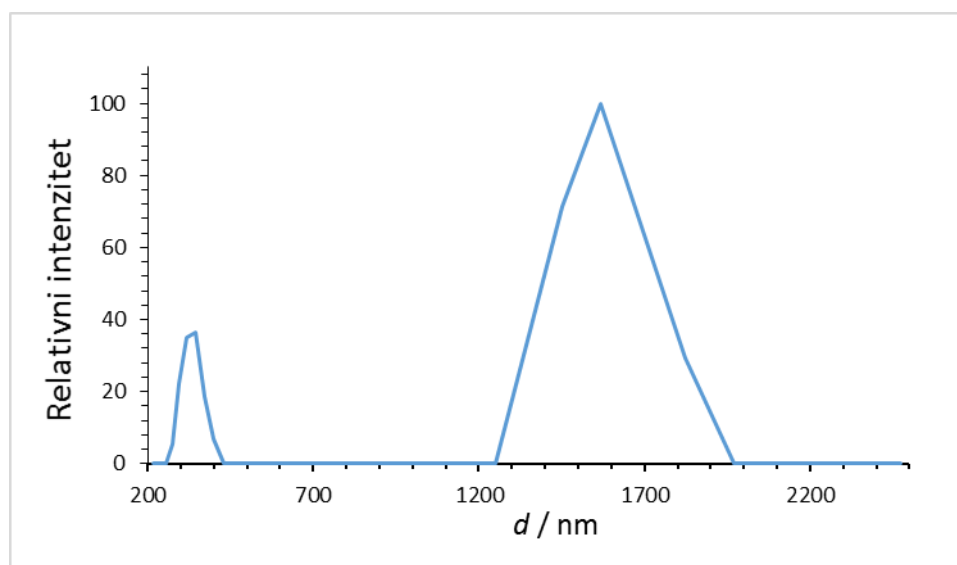


Slika 29. Usporedba dvije sinteze sfera na česticama hidroksiapatita provedenim pri istim uvjetima.

Elektroforetska pokretljivost mijenja se cik-cak stilom kao i u slučaju sinteze sfera s kalcijevom karbonatom. Iznosi elektroforetske pokretljivosti pozitivno i negativno nabijenog zadnjeg sloja na česticama hidroksiapatita su veće u usporedbi s iznosom elektroforetske pokretljivosti pozitivno i negativno nabijenog zadnjeg sloja na česticama kalcijeva karbonata. To sugerira da je kod hidroksiapatita došlo do izraženijeg prenabijanja nego kod kalcijeva karbonata čime se sustav dodatno stabilizirao u koloidnom smislu. Apsolutne vrijednosti elektroforetske pokretljivosti su veće u slučaju PAA u usporedbi s PAH-om. Razlog tome je različito pakiranje molekula polielektrolita na površini. Budući da su lanci PAA puno duži od lanaca PAH-a moguće je da oni više strše s površine te da su slojevi PAA deblji od slojeva PAH-a.

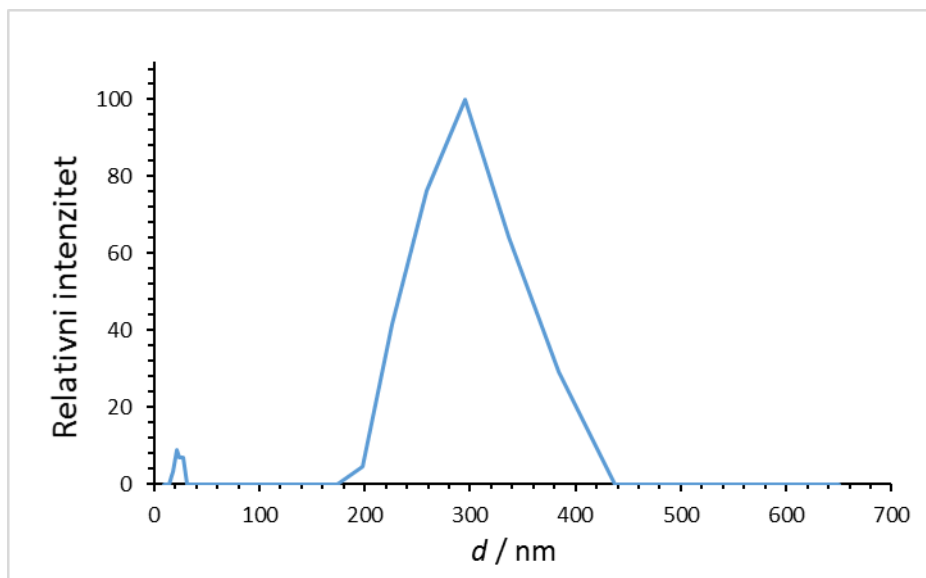
## 5.2. Dinamičko raspršenje svjetlosti

Za određivanje veličine čestica kalcijeva karbonata i hidroksiapatita te šupljih sfera, mjeren je njihov hidrodinamički promjer. Na svakom od uzoraka učinjeno je 10 mjerenja, a u rezultatima je prikazano od 7 do 10 istih. Prije same adsorpcije polielektrolita na kalcijev karbonat izmjerena je veličina njegovih čestica nakon tretiranja ultrazvučnom sondom kako bi se uklonili agregati i što preciznije odredila veličina. Efektivni hidrodinamički promjer čestica kalcijeva karbonata iznosi  $(1,6 \pm 0,2) \mu\text{m}$ . Na slici 30. prikazana je bimodalna raspodjela sa sljedećim rasponom veličina hidrodinamičkog promjera čestica: 270–420 nm i 1220–1950 nm. Ovakvom bimodalnom raspodjelom utvrđeno je da uzorak koloidne otopine kalcijeva karbonata sadrži dva seta čestica s obzirom na veličinu, one nanometarskih i one mikrometarskih dimenzija. Vrlo vjerojatno je zbog ovih potonjih mikrometarskih čestica došlo do ranije spomenute agregacije i sedimentacije tih čestica obloženih polielektrolitnim višeslojem.



Slika 30. Raspodjela hidrodinamičkog promjera čestica kalcijeva karbonata prema intenzitetu raspršenog zračenja.

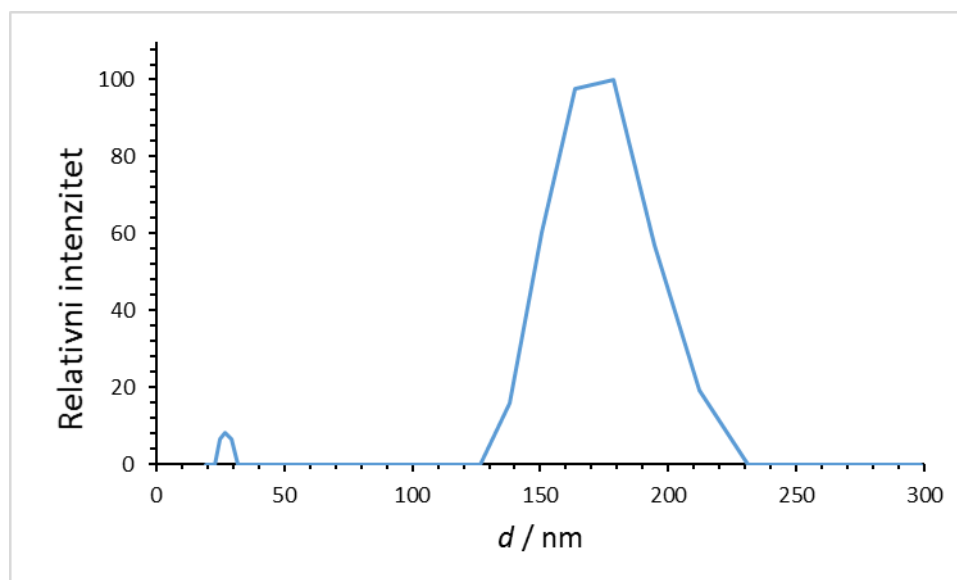
Efektivni hidrodinamički promjer čestica hidroksiapatita iznosi  $(216 \pm 7) \text{nm}$ . Na slici 31. prikazana je bimodalna raspodjela sa sljedećim rasponom veličina hidrodinamičkog promjera čestica: 15–30 nm i 170–440 nm. Iz navedenog se da zaključiti da su čestice hidroksiapatita nanometarskih dimenzija što ih čini pogodnim za pripravu željenih nanosfera.



Slika 31. Raspodjela hidrodinamičkog promjera čestica hidroksiapatita prema intenzitetu raspršenog zračenja.

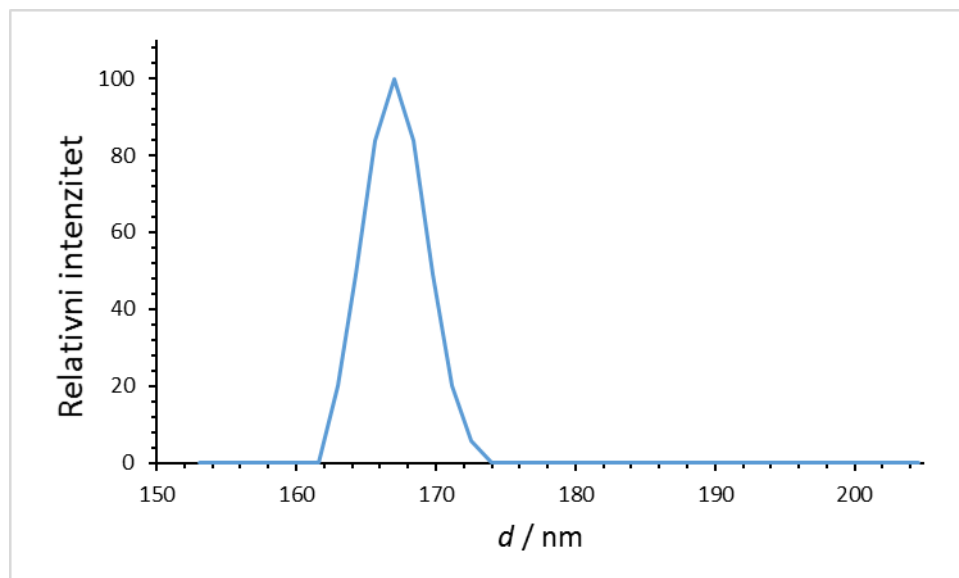
Nakon uklanjanja jezgre dobivene su šuplje sfere slabih polielektrolita PAH i PAA. Kako bi se provjerilo jesu li željenih nanometarskih dimenzija, određen je efektivni hidrodinamički promjer čestica i iznosi ( $142 \pm 2$ ) nm. Dobivene polielektrolitne kapsule jako su male veličine i mase te velike površinske gustoće naboja. Budući da navedene značajke definiraju veoma stabilan koloidni sustav, sfere nisu uspješno izolirane centrifugiranjem te su iz tog razloga sva DLS mjerenja učinjena sa šupljim sferama u otopini dobivenoj otapanjem jezgre. Na slici 32. prikazana je bimodalna raspodjela sa sljedećim rasponom veličina hidrodinamičkog promjera sfera: 20–30 nm i 125–230 nm. Ovakva raspodjela veličina šupljih nanosfera vrlo dobro se preklapa s raspodjelom veličina čestica hidroksiapatita, samo što je uža. To i nije toliko čudno s obzirom da polimerne šuplje sfere posjeduju veću fleksibilnost od rigidnih anorganskih čestica supstrata.





Slika 32. Raspodjela hidrodinamičkog promjera šupljih sfera od slabih PAH/PAA polielektrolita prema intenzitetu raspršenog zračenja.

Kako bi se provjerilo dolazi li do raspada nanosfera to jest ispitala njihova stabilnost, određena je veličina tih kapsula nakon stajanja 40 dana na temperaturi od 4 °C. Efektivni hidrodinamički promjer sfera nakon stajanja iznosi  $(214 \pm 22)$  nm. Raspodjela veličina promjera sfera unimodalna je s rasponom od 162 do 174 nm te je prikazana na slici 33. Usporedbom dobivenih rezultata za veličine sfera odmah po uklanjanju supstrata i nakon 40 dana stajanja vidljivo je kako je efektivni hidrodinamički promjer sfera nakon stajanja nešto veći što može značiti da dolazi do širenja sfera pri nižoj temperaturi. Pogledom na raspodjelu hidrodinamičkog promjera prema intenzitetu raspršenog zračenja može se zaključiti kako je raspon veličina čestica s najvećim intenzitetom u oba slučaja približan. U slučaju određivanja veličine sfera odmah, najveći intenzitet raspršenog zračenja imaju čestice veličine oko 170 nm kao i u slučaju ispitivanja stabilnosti tih čestica. Iz tih rezultata može se zaključiti kako ne dolazi do značajne promjene stajanjem.

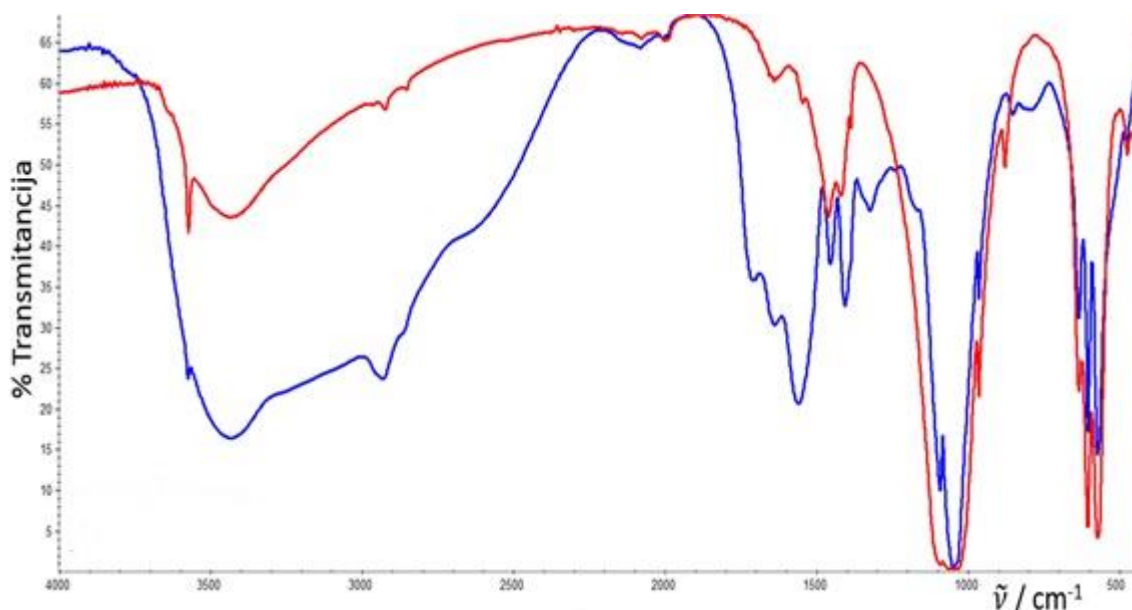


Slika 33. Raspodjela hidrodinamičkog promjera šupljih sfera od slabih PAH i PAA polielektrolita prema intenzitetu raspršenog zračenja nakon stajanja 40 dana u vodenoj otopini pri  $\theta = 4^\circ\text{C}$ .

### 5.3. Infracrvena spektroskopija

Infracrvenom spektroskopijom analizirani su uzorci čistog hidroksiapatita, sfera nakon uklanjanja supstrata pri pH-vrijednostima 3 i oko 1,5 te sfera nakon uklanjanja supstrata otopinom EDTA. Svrha snimanja spektara prethodno spomenutih uzoraka bilo je utvrđivanje uklanjanja hidroksiapatita iz sustava s polielektrolitnim višeslojem PAH/PAA. Kako bi se to moglo procijeniti snimljen je spektar čistog hidroksiapatita koji je na svim slikama prikazan crvenom linijom. Najizraženija vrpca hidroksiapatita je vrpca istezanja fosfatne skupine pri otprilike  $1000\text{ cm}^{-1}$ . Ostale vrpce koje se pojavljuju u spektru hidroksiapatita su vrpca hidroksidne skupine pri  $\sim 3500\text{ cm}^{-1}$  i vrpca deformacije fosfatne skupine pri  $\sim 600\text{ cm}^{-1}$ . Karakteristične vrpce poli(akrilne kiseline) su vrpca istezanja karbonilne skupine pri  $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ , deformacije C–O–H pri  $\sim 900\text{ cm}^{-1}$  i istezanja hidroksilne skupine pri  $\sim 3100\text{ cm}^{-1}$ . Poli(alilamin hidroklorid) karakteriziraju vrpce deformacije N–H pri  $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$  te deformacije C–H pri  $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ . Budući da je količina PAH-a i PAA u usporedbi s količinom hidroksiapatita jako mala, njihove karakteristične vrpce ne dolaze do izražaja u većini slučajeva.<sup>72-74</sup>

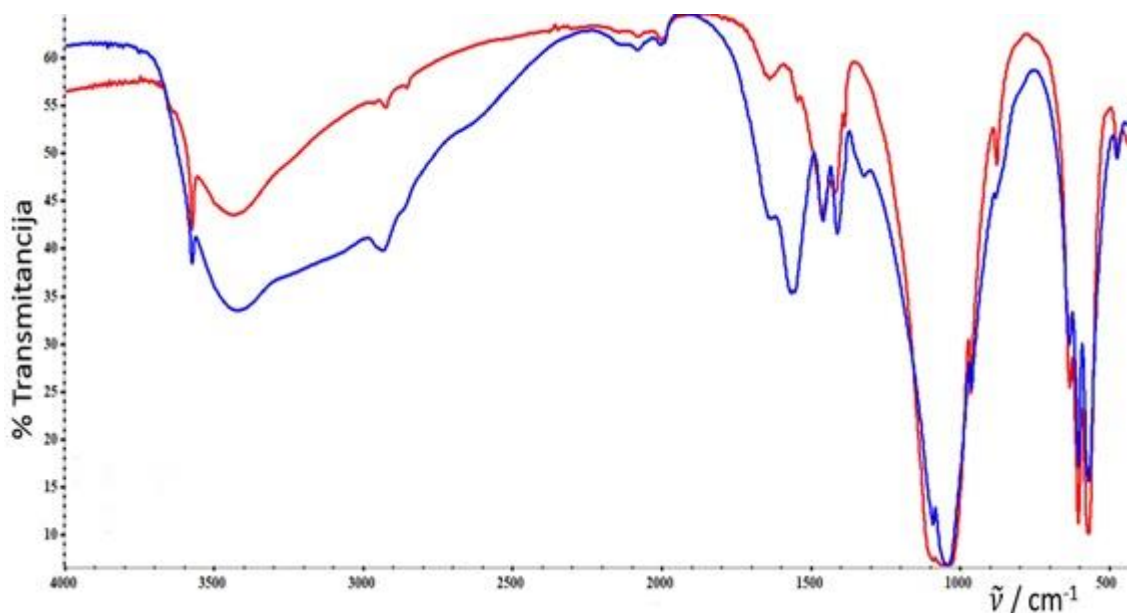
Na slici 34. prikazani su IR spektri hidroksiapatita (crveni spektar) i sfera od slabih polielektrolita nakon tretiranja s EDTA kako bi se uklonio hidroksiapatit (plavi spektar).



Slika 34. Usporedba IR spektara čistog hidroksiapatita (crveni spektar) i sfera nakon uklanjanja hidroksiapatita s EDTA (plavi spektar). Spektri su snimani u KBr pastili pri  $\theta = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Iz IR spektara prikazanih na slici 34. vidljivo je kako se hidroksiapatit nije u potpunosti uklonio u slučaju njegova uklanjanja s EDTA. U oba spektra najizraženije vrpce su karakteristične vrpce hidroksiapatita po čemu se može zaključiti da se on i dalje nalazi u sustavu sa sferama od slabih polielektrolita u najvećoj količini. Jedina značajnija razlika spektra čistog hidroksiapatita i spektra sfera tretiranih s EDTA je izraženija vrpca pri  $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$  koja bi mogla odgovarati istežanju karbonilne skupine poli(akrilne kiseline). Iz intenziteta vrpce može se zaključiti kako ima manje hidroksiapatita u sustavu nakon uklanjanja EDTA ali nije u potpunosti uklonjen zbog čega se ne mogu asignirati vrpce polielektrolita.

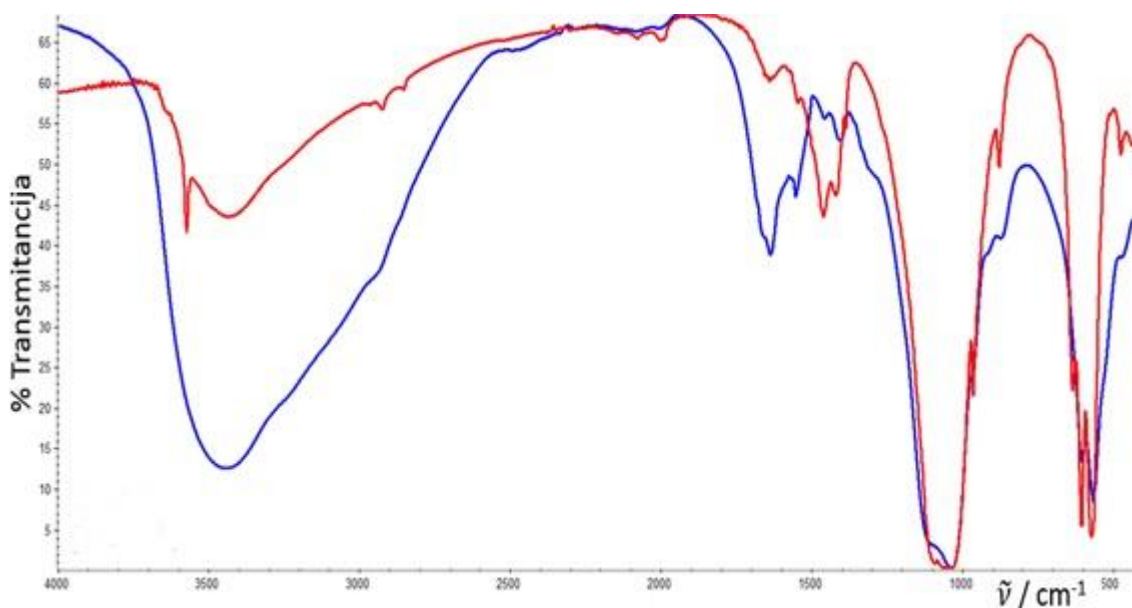
Slika 35. prikazuje usporedbu spektra čistog hidroksiapatita (crveni spektar) i spektra sfera od polielektrolita tretiranih otopinom klorovodične kiseline pH-vrijednosti 3 (plavi spektar). Kao i u slučaju uklanjanja jezgre s EDTA, i u ovom slučaju vidi se da nije došlo do uklanjanja hidroksiapatita iz sustava. Najizraženije vrpce u oba spektra vrpce su karakteristične za hidroksiapatit iz čega se zaključuje da je njegov udio u sustavu najveći. U odnosu na tretiranje s EDTA, pri tretiranju s klorovodičnom kiselinom ( $\text{pH} = 3$ ) na spektru je izraženija vrpca karbonilne skupine što dovodi do zaključka kako je od te dvije metode uklanjanja supstrata, tretiranje s klorovodičnom kiselinom bolje rješenje, iako nedovoljno dobro.



Slika 35. Usporedba IR spektara čistog hidroksiapatita (crveni spektar) i sfera nakon uklanjanja hidroksiapatita otopinom klorovodične kiseline pH-vrijednosti 3 (plavi spektar).

Spektri su snimani u KBr pastili pri  $\theta = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Na slici 36. prikazana je usporedba spektra čistog hidroksiapatita (crveni spektar) i spektra sfera od polielektrolitnih višeslojeva nakon uklanjanja hidroksiapatita otopinom klorovodične kiseline pH-vrijednosti oko 1,5 (plavi spektar). Intenzivne vrpce pri  $\sim 1000\text{ cm}^{-1}$  i  $\sim 600\text{ cm}^{-1}$  ukazuju na prisutnost hidroksiapatita u sustavu. Razlika u odnosu na spektre tretiranja sfera s EDTA i otopinom klorovodične kiseline je širenje vrpce pri  $\sim 3500\text{ cm}^{-1}$  koja se može pripisati prisustvu vlage u uzorku ili zbog svojeg specifičnog oblika i intenziteta. Dodatan razlog širenju te vrpce može biti prisutnost vode u higroskopnom KBr-u od kojeg je načinjena pastila za snimanje. Također, u odnosu na spektre prikazane na slikama 34. i 35., vrpce pri  $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$  i  $1700\text{ cm}^{-1}$  na spektru prikazanom na slici 36. izraženije su što može značiti da su u slučaju uklanjanja jezgre klorovodičnom kiselinom pH-vrijednosti oko 1,5 poli(akrilna kiselina) i poli(alilamin hidroklorid) prisutni u većem udjelu. Navedene činjenice dovele su do zaključka kako se je od izabranih metoda uklanjanja hidroksiapatita najuspješnijom pokazala metoda tretiranja otopinom klorovodične kiseline pH-vrijednosti oko 1,5. Zbog prisustva vlage u uzorku ili KBr-u vrpce PAH-a i PAA ne vide se ni u jednom od snimljenih spektara što je rezultiralo odabirom druge metode za kvalitativnu analizu šupljih sfera načinjenih od polielektrolitnih višeslojeva.

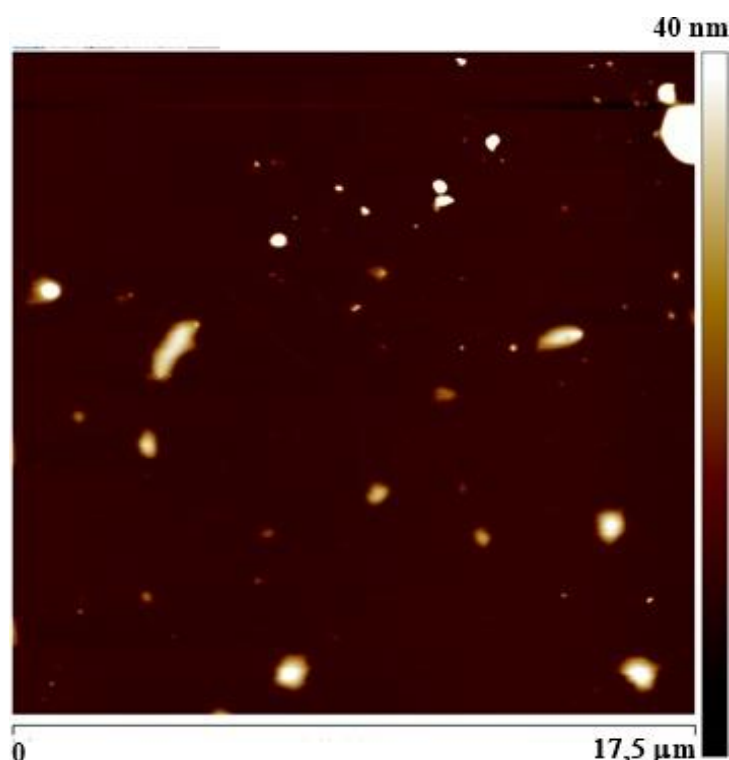


Slika 36. Usporedba IR spektara čistog hidroksiapatita (crveni spektar) i sfera nakon uklanjanja hidroksiapatita otopinom klorovodične kiseline pH-vrijednosti 1,5 (plavi spektar). Spektri su snimani u KBr pastili pri  $\theta = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Uzorci sfera načinjenih od polielektrolita nakon uklanjanja supstrata pripremljeni su tako da su se suspenzije sfera s reagensima za uklanjanje jezgre podvrgnule centrifugi. Supernatant je uklanjan a talog sušen preko noći u eksikatoru i pripremljen u obliku KBr pastile. Uzorci su nakon tretiranja reagensima za uklanjanje hidroksiapatita isprani 3 puta deioniziranom vodom čija je pH-vrijednost bila podešena na 8,8. Tretiranje suspenzije sfera klorovodičnom kiselinom pH-vrijednosti oko 1,5 rezultiralo je vidljivo najboljim uklanjanjem hidroksiapatita to jest nakon 21 sat miješanja skoro je sav hidroksiapatit bio otopljen. Razlog prisutstva vrpce istezanja fosfatnih skupina hidroksiapatita u svim spektrima nedovoljan je broj ispiranja i nemogućnost uklanjanja fosfatnih iona iz sustava centrifugiranjem suspenzije. Zbog te činjenice šuplje sfere podvrgnute su EDX analizi čiji će rezultati biti prikazani u kasnijem odlomku.

#### 5.4. Mjerenja mikroskopom atomskih sila

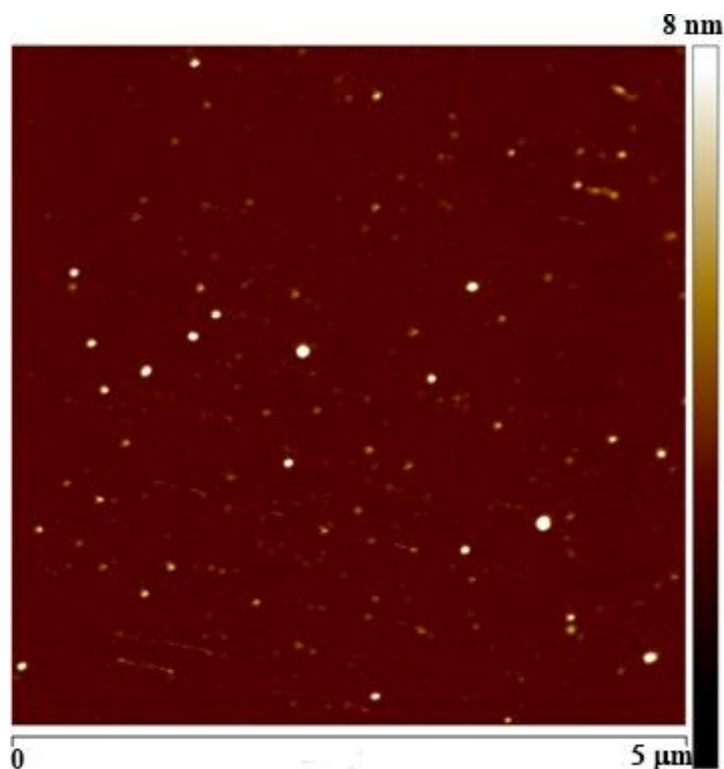
Mikroskopom atomskih sila dobivene su informacije o morfologiji čestica, njihovom obliku i veličini. Uzorci su bez prethodne pripreme nakapani na površinu silicijske pločice, a snimanja su provedena u tapkajućem načinu rada. Prije sinteze sfera na kalcijevom karbonatu, njegove su čestice okarakterizirane pomoću mikroskopa atomskih sila. Slika 37. prikazuje čestice kalcijeva karbonata snimane u području površine  $17,5 \mu\text{m} \times 17,5 \mu\text{m}$ .



Slika 37. AFM prikaz  $17,5 \mu\text{m} \times 17,5 \mu\text{m}$  površine silicija s deponiranim česticama kalcijeva karbonata snimljen u ambijentalnim uvjetima.

Veličina snimljenih čestica raznolika je poput njihova oblika. Visina čestica je u rasponu od 8 do 40 nm a njihova širina poprima vrijednosti od 200 nm do  $1 \mu\text{m}$ . Duljina manjih čestica iznosi otprilike 100 nm, a kod većih čestica ta vrijednost približava se  $2 \mu\text{m}$ . Iz tih raspona vrijednosti može se, kao i iz slike 37., zaključiti da sustav posjeduje široku raspodjelu veličina čestica te da vjerojatno sadrži i agregirane čestice koje poprimaju različite oblike.

Uz određivanje hidrodinamičkog promjera dinamičkim raspršenjem svjetlosti, veličina čestica hidroksiapatita određena je korištenjem mikroskopa atomskih sila. Slika 38. prikazuje snimljenu površinu  $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$  čestica hidroksiapatita.



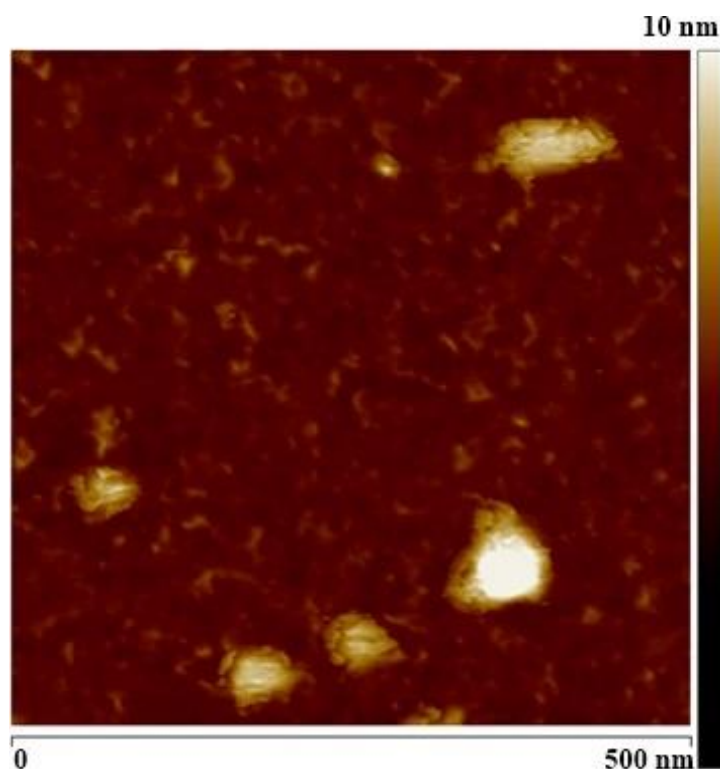
Slika 38. AFM prikaz  $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$  površine silicija s deponiranim česticama hidroksiapatita snimljene u ambijentalnim uvjetima.

Duljina čestica hidroksiapatita poprima raspon vrijednosti 40–200 nm, širina 80–130 nm a visina 2–8 nm. U usporedbi s česticama kalcijeva karbonata, čestice hidroksiapatita uniformnije su i pravilnijih oblika. Iako čestice na slici izgledaju pravilno sferično, njihov oblik sličan je nanodisku. Što se tiče veličine, u slučaju hidroksiapatita te su vrijednosti mnogo manje kao i sami rasponi istih od onih kalcijeva karbonata.

Pri snimanju površine prikazane na slici 38., dolazilo je do pomicanja sitnih čestica AFM šiljkom, zbog čega prikaz sadrži bijele linije koji bi mogli ukazivati na nepravilnost površine, ali to nije slučaj.

Nakon formiranja višesloja od slabih polielektrolita na površini čestica hidroksiapatita, one su također snimljene mikroskopom atomskih sila kako bi se dobile informacije o njihovom obliku i veličini. Slika 39. prikazuje sfere načinjene od PAH i PAA na česticama hidroksiapatita.

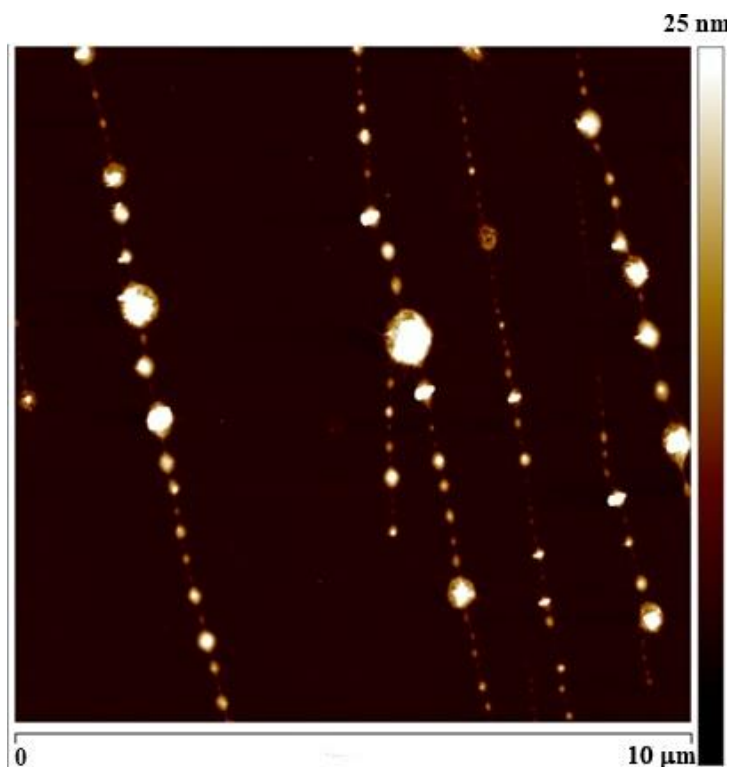




Slika 39. AFM prikaz 500 nm × 500 nm površine silicija s deponiranim česticama hidroksiapatita obavijenim PAH/PAA višeslojem snimljen pri ambijentalnim uvjetima.

Na slici 39. vidljivo je kako polielektrolitni višesloj na česticama hidroksiapatita ne poprima oblik sfere u potpunosti i kako su oblici pomalo nepravilni. Uz sfere, mogu se vidjeti strukture koje nalikuju polimernom lancu. Jedno od mogućih objašnjenja je da neke interakcije oslabljuju i polimerni lanci se desorbiraju sa sfera. Još jedna mogućnost je da je to nevezani polimer koji se nije uspješno uklonio postupcima ispiranja suviška polimera. Visina dobivenih struktura poprima vrijednosti u rasponu 3–10 nm, njihova duljina 30–90 nm, a širina 35–80 nm. Iz navedenog se zaključuje da spomenuti nanosustav zadržava formu samih čestica supstrata, odnosno čestice imaju morfologiju nanodiskova.

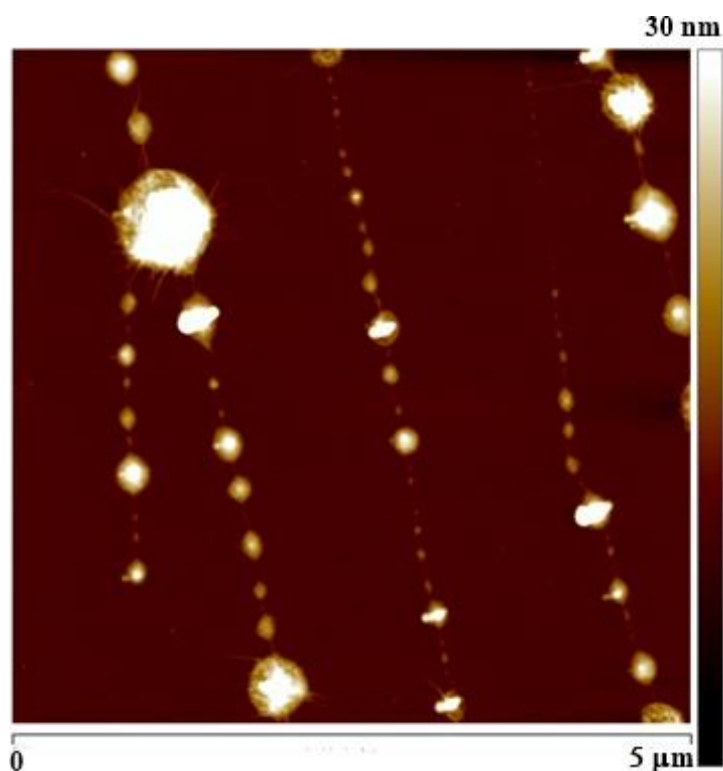
Uklanjanjem čestica hidroksiapatita odnosno otapanjem jezgre sfera, dobivaju se šuplje sfere. Na slikama 40. i 41. prikazane su snimke šupljih sfera od slabih polielektrolita dobivene pomoću mikroskopa atomskih sila. Slika 40. je prikaz površine 10 μm × 10 μm, a slika 41. manje površine 5 μm × 5 μm.



Slika 40. AFM prikaz  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$  površine silicija s deponiranim šupljim sferama od polielektrolitnih PAH/PAA višeslojeva nakon uklanjanja hidroksiapatitne jezgre snimljen u ambijentalnim uvjetima.

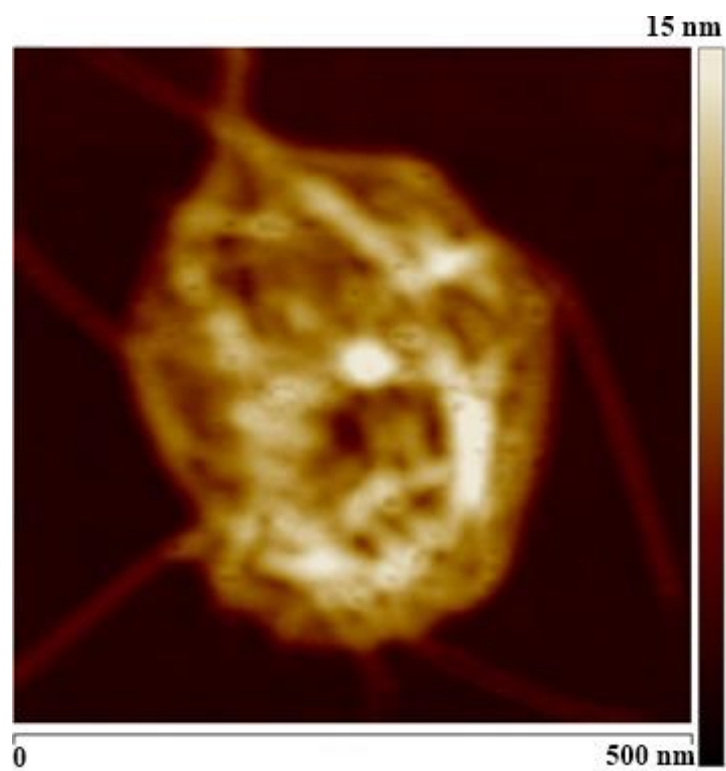
Iz AFM prikaza na slici 40. može se vidjeti kako ima mnogo čestica različitih veličina, ali slične morfologije. U nekim slučajevima jezgra je uspješno otopljena odnosno hidroksiapatit se uglavnom uklonio iz sustava, dok se u slučaju većih čestica nazire jezgra to jest čestice hidroksiapatita. Sfere s polielektrolitnim višeslojevima izgledaju kao da su povezane u lanac i može se pretpostaviti da su veće sfere agregati nastali prilikom isparavanja otapala što je narušilo stabilnost koloidnog sustava i pojačalo tendenciju za agregiranjem.

Slika 41. zapravo predstavlja uvećanje slike 40. odnosno dio slike površine  $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ . Najmanje sfere na slici 41. duljine su oko 150 nm dok najveća sfera ima duljinu oko 800 nm. Širina sfera poprima vrijednosti u rasponu 100–700 nm dok su vrijednosti njihove visine u rasponu 10–30 nm.



Slika 41. AFM prikaz  $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$  površine silicija s deponiranim šupljim sferama od polielektrolitnih PAH/PAA višeslojeva nakon uklanjanja hidroksiapatitne jezgre snimljen u ambijentalnim uvjetima.

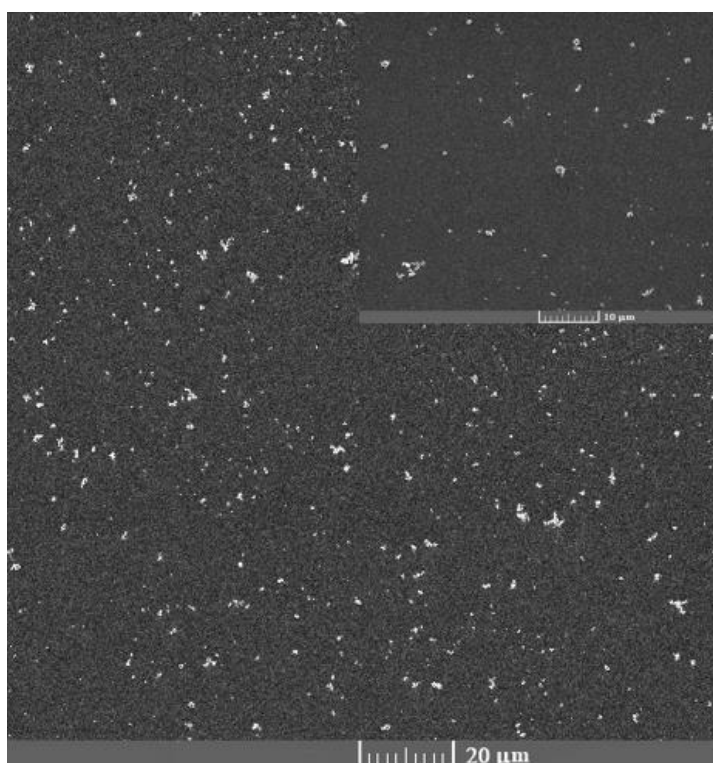
Kako bi se dobio bolji uvid u strukturu šupljih sfera, snimljen je prikaz površine  $500\ \text{nm} \times 500\ \text{nm}$  koji je prikazan na slici 42. Iz prikaza manje površine na kojoj se nalazi samo jedna sfera može se vidjeti kako je u slučaju te sfere jezgra vrlo vjerojatno uklonjena. Polimerni lanci strše sa strane i vidljivo je kako morfologija nije pravilna sferična već poput pomalo spljoštene sfere. Visina šuplje sfere prikazane na slici 42. iznosi otprilike  $7\ \text{nm}$ , njezina duljina je  $390\ \text{nm}$  a širina oko  $300\ \text{nm}$ .



Slika 42. AFM prikaz  $500 \text{ nm} \times 500 \text{ nm}$  površine jedne  $(\text{PAH/PAA})_2$  šuplje sfere snimljene pri ambijentalnim uvjetima.

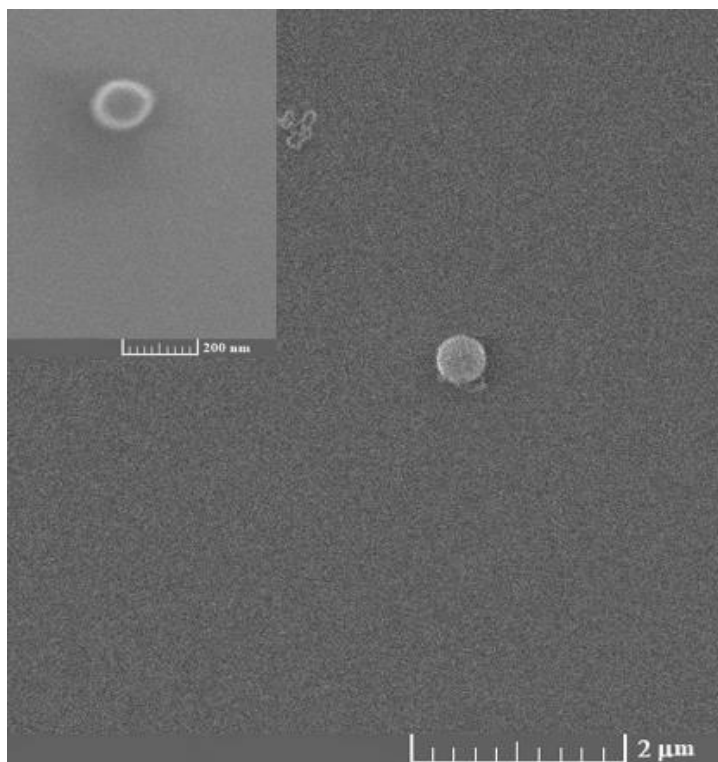
### 5.5. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Skenirajućim elektronskim mikroskopom snimljene su čestice hidroksiapatita, čestice hidroksiapatita s polielektrolitnim višeslojevima na njima te šuplje sfere nakon otapanja hidroksiapatita. Za iste uzorke pomoću EDS detektora provedena je elementna analiza. Uzorci su za snimanje pripremljeni nakapavanjem na silicijsku pločicu i isparavanjem otapala preko noći. Na slici 43. nalazi se površina čestica hidroksiapatita, a umetak na istoj slici predstavlja uvećanje od 2 puta.



Slika 43. SEM prikaz površine silicija s česticama hidroksiapatita snimljen u ambijentalnim uvjetima. Umetak na slici prikaz je dva puta uvećane površine.

Iz slike 43. vidljivo je kako su čestice hidroksiapatita različitih oblika i veličina. Za veće čestice može se pretpostaviti da su agregati. Kako bi se dobile detaljnije informacije o strukturi i veličini čestica, snimljena je manja površina koja je prikazana na slici 44. Umetak na slici 44. prikaz je jedne čestice pravilnog sferičnog oblika.

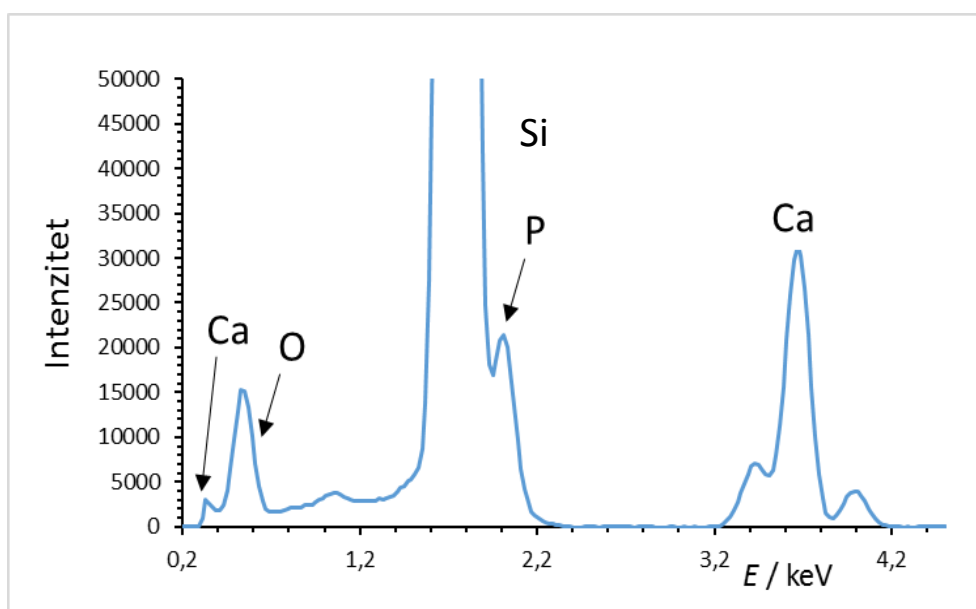


Slika 44. SEM prikaz površine silicija s česticom hidroksiapatita snimljen u ambijentalnim uvjetima. Umetak na slici prikaz je 10 puta uvećane iste površine.

Iz prikaza površine na slici 44. kao i iz prikaza uvećanja 10 puta, može se procijeniti kako je veličina te čestice oko 150 nm. Uz skeniranje površine, za čestice hidroksiapatita provedena je i elementna analiza.

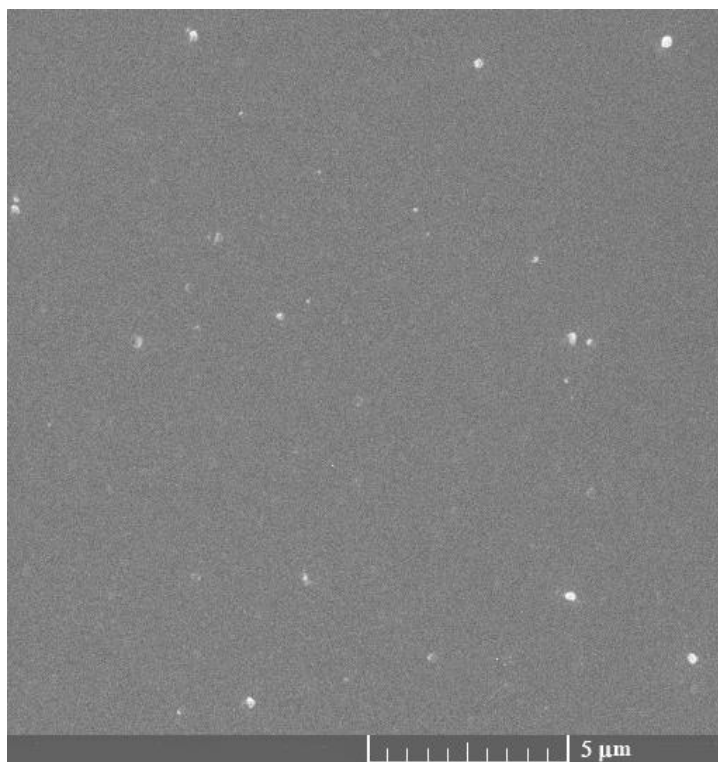
Interakcijom uzorka sa snopom elektrona dolazi do difrakcije rendgenskog zračenja. Pobuđivanjem elektrona u jezgri atoma uzorka i njihovim izbacivanjem iz atoma nastaje šupljina. Elektron iz vanjske ljuske koja je više energije popunit će prazno mjesto pri čemu dolazi do emisije rendgenskog zračenja. Emitirani spektar rendgenskog zračenja sastoji se od kontinuiranog i karakterističnog rendgenskog zračenja. Ukoliko apsorpcija energije dovodi do izbijanja elektrona iz K ljuske i nastala šupljina se popuni elektronom iz L ljuske, govorimo o  $K_{\alpha}$  zračenju. Ako se pak prazno mjesto popuni elektronom iz M ljuske to zračenje nazivamo  $K_{\beta}$  zračenjem. Budući da svaki element ima karakterističnu strukturu atoma, valne duljine rendgenskog zračenja svakog elementa različite su to jest karakteristični emisijski spektar svakog elementa ima različite pikove pomoću kojih se vrši elementna analiza uzorka. Energija rendgenskog zračenja detektira se pomoću EDS detektora skenirajućeg elektronskog mikroskopa.

Rezultati kvalitativne analize čestica hidroksiapatita prikazani su na slici 45. Pik najvećeg intenziteta kojem odgovara energija zračenja od otprilike 1,7 keV predstavlja silicij od kojeg se sastoji pločica na koju je nanesen uzorak. Iz tog razloga pik nije prikazan u potpunosti kako bi se bolje prikazali intenziteti pikova važni za kvalitativnu analizu uzorka. Karakteristično zračenje energije približno 3,7 keV i 4,0 keV odgovara  $K_{\alpha}$  i  $K_{\beta}$  zračenju kalcija. Osim spomenutih energija, kalciju pripada i pik energije oko 0,3 keV što odgovara njegovom  $L_{\alpha}$  zračenju koje nastaje izbijanjem elektrona iz L ljuske i popunjavanjem praznine elektronom iz M ljuske. Energija karakterističnog zračenja od približno 2 keV odgovara  $K_{\alpha}$  zračenju fosfora dok energija oko 0,5 keV odgovara  $K_{\alpha}$  zračenju kisika. Spektar prikazan na slici 45. u skladu je s literaturno dostupnim podacima.<sup>75</sup>

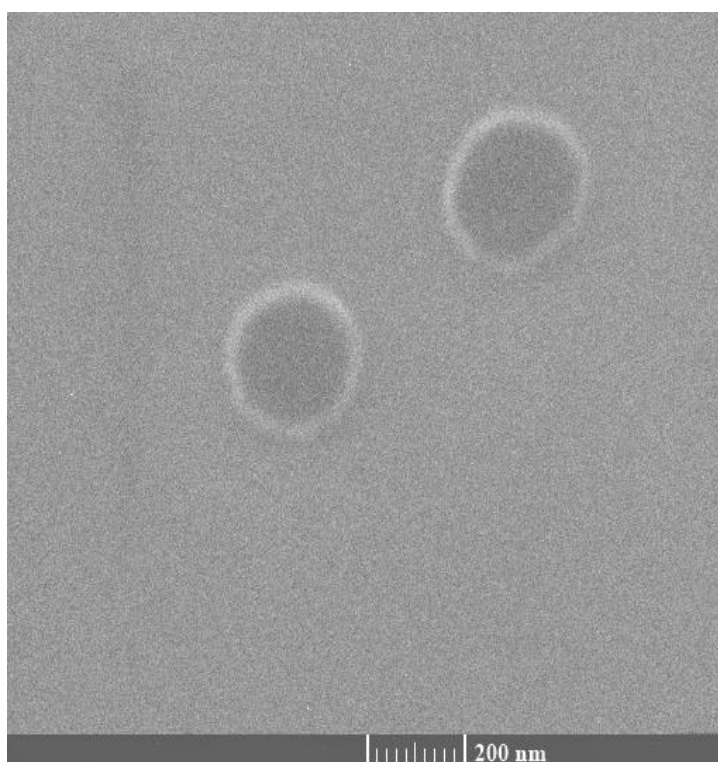


Slika 45. Kvalitativna analiza čestica hidroksiapatita na površini silicija određena pomoću EDS detektora skenirajućeg elektronskog mikroskopa.

SEM snimka višesloja slabih polielektrolita na česticama hidroksiapatita prikazana je na slici 46. Iz prikaza površine na slici 46. vidljivo je kako ima dosta čestica približno sferične geometrije. Gruba procjena veličine snimljenih čestica sa slike 46. je oko 200 nm. Za detaljnije informacije o morfologiji sfera snimljena je ista površina uvećana 25 puta i prikazana na slici 47.



Slika 46. SEM prikaz površine čestica hidroksiapatita obavijenih s dva PAH/PAA dvosloja snimljen u ambijentalnim uvjetima.

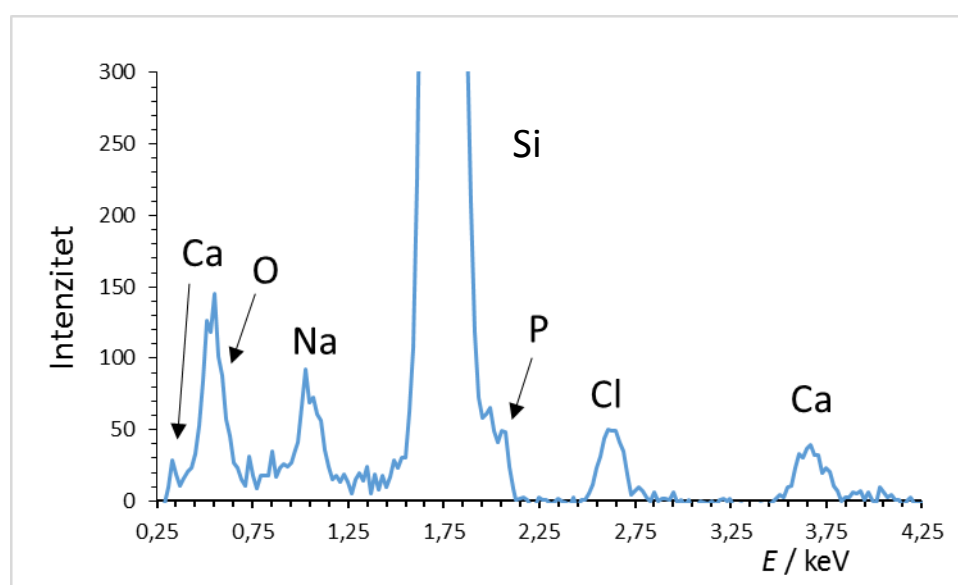


Slika 47. SEM prikaz površine dvije sferične čestice hidroksiapatita obavijene (PAH/PAA)<sub>2</sub> višeslojem snimljen pri ambijentalnim uvjetima.



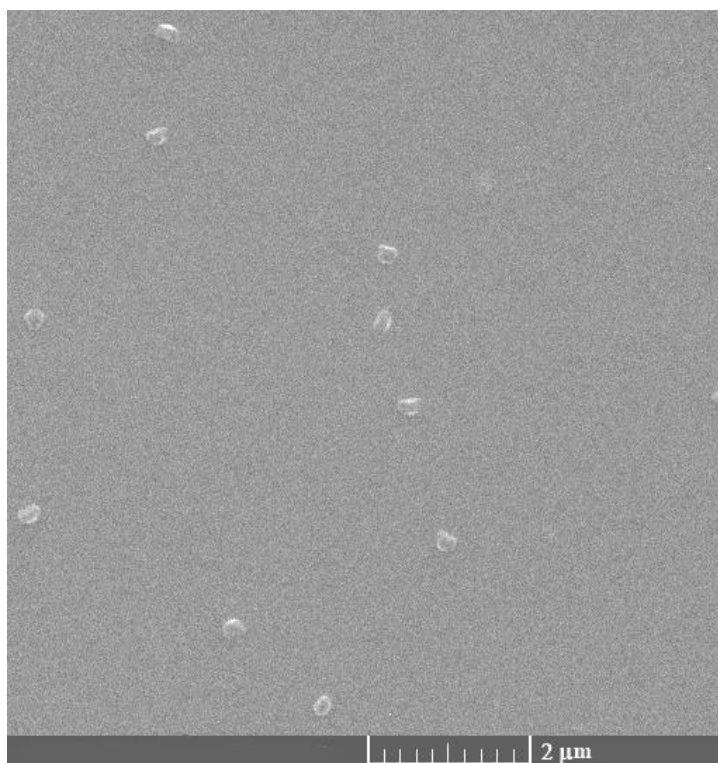
Iz prikaza na slici 47. vidi se kako su čestice prilično pravilne sferne geometrije i veličine otprilike 280 nm. Svjetliji omotač na tamnijem supstratu može se pripisati polielektrolitnom višesloju.

Za uzorak polielektrolitnog višesloja na česticama hidroksiapatita provedena je i elementna analiza čiji su rezultati prikazani na slici 48. Kao i u slučaju čestica čistog hidroksiapatita, i uzorak sfera s hidroksiapatitom snimljen je na površini od silicija. Pik koji odgovara siliciju iz istog je razloga najvećeg intenziteta. U odnosu na spektar čistog hidroksiapatita, spektar prikazan na slici 48. posjeduje 2 nova pika. Karakteristično zračenje energije oko 1 keV odgovara  $K_{\alpha}$  zračenju natrija dok ono energije oko 2,6 keV odgovara  $K_{\alpha}$  zračenju klora. Ostali pikovi koji pripadaju kalciju, fosforu i kisiku, pikovi su karakteristični za hidroksiapatit i okarakterizirani su u elementnoj analizi hidroksiapatita prikazanoj na slici 47. Pojavljivanje natrija u elementnoj analizi sfera s hidroksiapatitom može se objasniti činjenicom da je prisutan u natrijevom perkloratu koji je pozadinski elektrolit u otopinama slabih polielektrolita PAH i PAA korištenih pri formiranju sfera. Poput natrija, klor je također prisutan u pozadinskom elektrolitu, kao i u polielektrolitu poli(alilamin hidrokloridu) što može objasniti njegovu prisutnost. Moguće je da su ioni natrija i klora iz pozadinskog elektrolita asocirani u polielektrolitnom višesloju formiranom na česticama hidroksiapatita i detektirani kvalitativnom analizom.



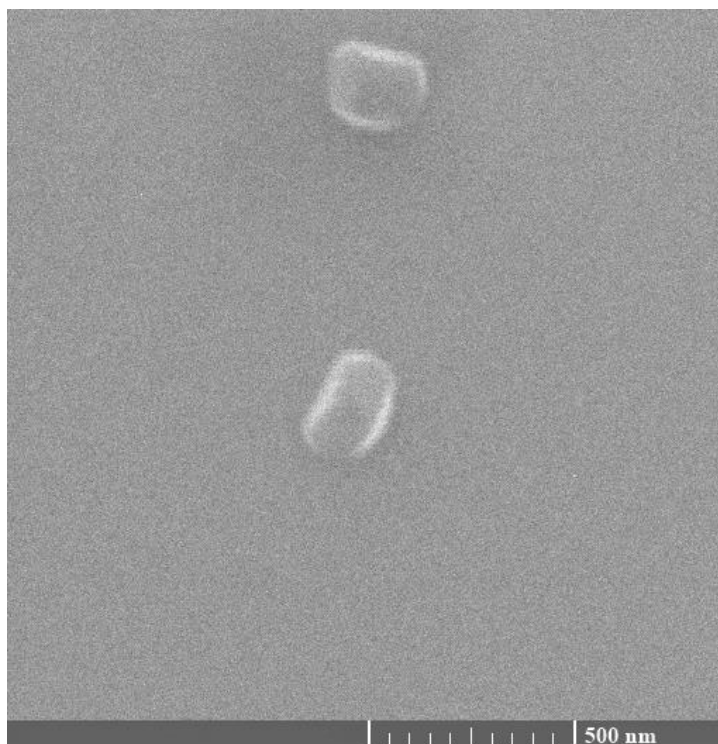
Slika 48. Kvalitativna analiza čestica hidroksiapatita obloženih  $(PAH/PAA)_2$  višeslojem određena pomoću EDS detektora skenirajućeg elektronskog mikroskopa.

Nakon uklanjanja hidroksiapatita metodom otapanja klorovodičnom kiselinom pH-vrijednosti oko 1,5 i ispiranja deioniziranom vodom snimljen je SEM prikaz dobivenih šupljih sfera koji je prikazan na slici 49.



Slika 49. SEM prikaz površine šupljih sfera snimljen pri ambijentalnim uvjetima.

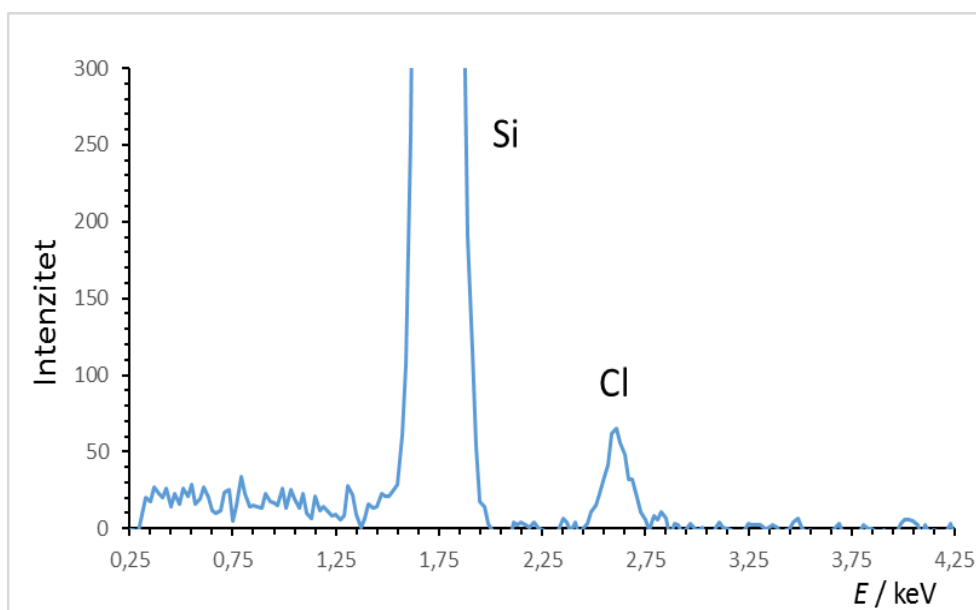
Kao i iz AFM prikaza može se vidjeti da šuplje sfere nemaju u potpunosti pravilan oblik, ali prema SEM prikazu veličina šupljih sfera ne poprima tako velik raspon vrijednosti u prikazima površine dobivenim mikroskopom atomskih sila, to jest što se veličine tiče šuplje sfere prilično su uniformne. Veličina sfera prikazanih na slici 49. procjenjuje se na 200 nm. Površina prikazana na slici 49. uvećana je 4 puta kako bi se mogla bolje procijeniti veličina čestica. Na slici 50. prikazane su 2 šuplje sfere čija je veličina približno 250 nm. Za razliku od čestica hidroksiapatita s polielektrolitnom ovojnicom (slika 47.), snimljene šuplje sfere dobivene otapanjem jezgre su nepravilnog oblika. Pretpostavlja se da je nepravilna morfologija nanokapsula posljedica njihove velike fleksibilnosti.



Slika 50. SEM prikaz površine (PAH/PAA)<sub>2</sub> šupljih sfera snimljen pri ambijentalnim uvjetima.

Da bi se provjerila uspješnost uklanjanja hidroksiapatita, šuplje sfere podvrgnute su elementnoj analizi provedenoj pomoću EDS detektora SEM-a. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 51. Jedini jasno vidljivi pikovi na spektru sa slike 51 su karakteristični pik silicija na čijoj je površini sniman uzorak šupljih sfera i pik klora energije približno 2,6 keV koja odgovara  $K_{\alpha}$  zračenju klora. Usporedbom EDX spektara prikazanih na slikama 48. i 51. odnosno spektra sfera s hidroksiapatitnom jezgrom i spektra šupljih sfera dolazi se do zaključka kako je hidroksiapatit uspješno uklonjen. Karakteristični pikovi kalcija, fosfora i kisika iz hidroksiapatita u slučaju spektra šupljih sfera izostaju što znači da nije prisutan u uzorku. Prisutnost klora može se objasniti, kao i u prethodnom slučaju spektra sfera s hidroksiapatitom, time da dolazi iz pozadinskog elektrolita natrijeva perklorata i slabog polielektrolita poli(alilamina hidroklorida). U odnosu na spektar sfera s hidroksiapatitom, u spektru šupljih sfera izostaje pik natrija karakteristične energije od približno 1 keV. Izostanak natrija u spektru može se pripisati većoj količini prisutnog šuma u spektru na slici 51. koja vjerojatno pokriva pik natrija slabijeg intenziteta. Iz rezultata dobivenih infracrvenom spektroskopijom i kvantitativnom analizom na slici 51. vidi se kako je metoda uklanjanja hidroksiapatita otopinom

klorovodične kiseline pH-vrijednosti oko 1,5 najuspješnija od primjenjivanih metoda za otapanje jezgre i dobivanje šupljih sfera. Zanimljivo je da su šuplje sfere ostale stabilne tretiranjem otopinom tako niskog pH unatoč tome što je stupanj ionizacije PAA pri tom pH jako mali odnosno velika većina monomernih jedinica poli(akrilne kiseline) je nenabijena.<sup>5</sup> Ovakav rezultat ukazuje na to da za stabilnost šupljih sfera nisu odgovorne samo elektrostatske interakcije između polielektrolitnih lanaca, već i druge interakcije poput vodikovih veza.



Slika 51. Kvalitativna analiza šupljih sfera određena pomoću EDS detektora skenirajućeg elektronskog mikroskopa.

Tong i Gao priredili su sfere od PAH i PAA slabih polielektrolita na česticama kalcijeva karbonata i supstrat uklanjali otopinom EDTA. Metoda kojom su provodili kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzorka bila je EDX analiza koja je pokazala prisutnost kalcija u udjelu oko 1,5 %. Rezultati spomenutih autora potvrdili su kako je EDX analiza prikladna metoda za potvrdu otapanja jezgre i analizu šupljih sfera i njihovi rezultati u skladu su s dobivenim.<sup>76</sup>

## § 6. ZAKLJUČAK

Šuplje nanosfere poli(alilamin hidroklorida) i poli(akrilne kiseline) dobivene su adsorpcijom slabih polielektrolita sloj po sloj metodom na česticama hidroksiapatita i uklanjanjem supstrata. Provedena je adsorpcija polielektrolita na česticama kalcijeva karbonata koja je rezultirala nestabilnom koloidnom otopinom nepogodnom za fizikalno-kemijsku karakterizaciju mikroskopskim metodama i metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti. Formiranje PAH/PAA polielektrolitnog višesloja na česticama hidroksiapatita rezultiralo je koloidno stabilnim sustavom i potvrđena je dobra reproducibilnost tog procesa. Uzastopna adsorpcija PAH i PAA na oba supstrata uspješno je praćena mjerenjima elektrokinetičkog potencijala koja su u oba slučaja pokazala kako dolazi do prenašanja površine, uvjeta nužnog za nastajanje polielektrolitnih višeslojeva.

Kako bi se sintetizirale kapsule od PAH/PAA polielektrolita, ispitane su tri metode uklanjanja hidroksiapatitne jezgre iz sustava: tretiranje otopinom EDTA te otopinama klorovodične kiseline pH-vrijednosti 3 i približno 1,5. Od ispitanih metoda najuspješnijom se pokazala metoda otapanja hidroksiapatita otopinom klorovodične kiseline pH-vrijednosti oko 1,5 što je potvrđeno analizom uzorka infracrvenom spektroskopijom i EDX analizom.

Česticama kalcijeva karbonata, hidroksiapatita, šupljim sferama slabih polielektrolita te šupljim sferama nakon stajanja 40 dana pri  $\theta = 4$  °C određen je efektivni hidrodinamički promjer i raspodjela hidrodinamičkog promjera čestica prema intenzitetu raspršenog zračenja. Dobivene vrijednosti efektivnih hidrodinamičkih promjera su:  $(1,6 \pm 0,2)$   $\mu\text{m}$  za kalcijev karbonat,  $(216 \pm 7)$  nm za hidroksiapatit,  $(142 \pm 2)$  nm za šuplje sfere te  $(214 \pm 22)$  nm za šuplje sfere nakon stajanja. Raspodjele hidrodinamičkog promjera čestica prema intenzitetu raspršenog zračenja bimodalne su u slučaju čestica kalcijeva karbonata, hidroksiapatita i šupljih sfera dok je u slučaju sfera nakon stajanja ista raspodjela unimodalna.

Mikroskopom atomskih sila okarakterizirane su čestice kalcijeva karbonata, hidroksiapatita, čestice hidroksiapatita s polielektrolitnim nanofilmom na površini te šuplje sfere. Analiza šupljih sfera AFM-om pokazala je kako je raspon njihovih veličina prilično velik. Oblik čestica također varira, pa tako sustav sadrži pravilne sfere i pomalo spljoštene sfere. Budući da su snimljene sfere različitih veličina, određeni su rasponi njihovih veličina koji su u skladu s dobivenim rezultatima metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti.

Skenirajućim elektronskim mikroskopom snimljene su površine uzoraka hidroksiapatita, sfera s hidroksiapatitom te šupljih sfera. Dobiveni prikazi površina snimljenih uzoraka pokazali su kako šuplje sfere nemaju potpuno pravilan sferičan oblik, što je u skladu sa snimkama dobivenim mikroskopom atomskih sila. Veličina čestica hidroksiapatita obavijenih PAH/PAA nanofilmom pomoću SEM snimki procijenjena je na 280 nm dok je veličina šupljih sfera približno 250 nm. Dobiveni rezultati razlikuju se od dobivenih metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti, ali razlika nije značajna.

Pomoću EDS detektora skenirajućeg elektronskog mikroskopa provedena je kvalitativna analiza uzoraka hidroksiapatita, hidroksiapatita s polielektrolitnim višeslojem i šupljih sfera. Iz dobivenih spektara zaključeno je kako je hidroksiapatit uspješno uklonjen iz sustava sfera s polielektrolitnim višeslojem PAH/PAA. Karakteristični pikovi hidroksiapatita izostaju, a prisutnost klora u slučaju hidroksiapatita s višeslojem i šupljih sfera objašnjava se asociranjem kloridnih iona iz natrijeva perklorata, koji je pozadinska sol, u polielektrolitni višesloj.

Prema pregledanoj literaturi, ovaj rad predstavlja prvi primjer uspješne sinteze stabilnih polielektrolitnih šupljih sfera nanometarskih dimenzija.

## § 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AFM – eng. *atomic force microscope* (mikroskop atomskih sila)

CLSM – eng. *confocal laser scanning microscope* (konfokalni laserski skenirajući mikroskop)

DLS – eng. *dynamic light scattering* (dinamičko raspršenje svjetlosti)

DNA – eng. *deoxyribonucleic acid* (deoksiribonukleinska kiselina)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

EDX – eng. *energy dispersive X-ray spectroscopy* (energijski disperzijska spektroskopija rendgenskih zraka)

FT-IR – eng. *Fourier transform infrared spectroscopy* (infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom)

LbL – eng. *layer-by-layer* (sloj po sloj)

PAA – poli(akrilna kiselina)

PAH – poli(alilamin hidroklorid)

PDADMAC – poli(dialildimetilamonijev kation)

PEI – poli(etilenimin)

PMA – poli(metakrilna kiselina)

PSS – poli(stiren sulfonat)

P(VAm-alt-AA) – poli[(vinilamin)-alt-(akrilna kiselina)]

PVP – poli(4-vinilpiridin)

PXRD – eng. *powder X-ray diffraction* (difrakcija rendgenskog zračenja na polikristalnom uzorku)

QCM – eng. *quartz crystal microbalance* (kvarc kristalna mikrovaga)

RMS – eng. *root mean square* (srednja kvadratna vrijednost)

RNA – eng. *ribonucleic acid* (ribonukleinska kiselina)

SE – eng. *standard error* (standardna pogreška)

SEM – eng. *scanning electron microscope* (skenirajući elektronski mikroskop)

TEM – eng. *transmission electron microscope* (trnsmisijski elektronski mikroskop)

## § 8. LITERATURNI IZVORI

1. T. Mauser, *Multilayer capsules with stimuli-sensitive properties: pH-response and carbohydrate-sensing*, Doktorski rad, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, der Universität Potsdam, 2007, str. 3–20.
2. O. Wuye, *Dispersed and deposited polyelectrolyte complexes and their interactions to chiral compounds and proteins*, der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften, der Technischen Universität Dresden, 2009, str. 3–9.
3. J. Salopek, *Interakcije suprotno nabijenih polielektrolita u otopini i na površini*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2017, str. 5–8.
4. M. Vrancken, G. Smets, *J. Polym. Sci.* **14** (1954) 521–534.
5. J. Choi, M. F. Rubner, *Macromolecules* **38** (2005) 116–124.
6. G. Decher, J. D. Hong, J. Schmitt, *Thin Solid Films* **210–211** (1992) 831–835.
7. M. A. C. Stuart, W. T. S. Huck, J. Genzer, M. Müller, C. Ober, M. Stamm, G. B. Sukhorukov, I. Szleifer, V. V. Tsukruk, M. Urban, F. Winnik, S. Zauscher, I. Luzinov, S. Minko, *Nat. Mater.* **9** (2010) 101–113.
8. D. V. Andreeva, D. Fix, H. Möhwald, D. G. Shchukin, *J. Mater. Chem.* **18** (2008) 1738–1740.
9. D. Kovačević, R. Pratnekar, K. G. Torkar, J. Salopek, G. Dražić, A. Abram, K. Bohinc, *Polymers.* **8** (2016).
10. X. Zhu, X. Jun Loh, *Biomater. Sci.* **3** (2015) 1505–1518.
11. L. Séon, P. Lavalley, P. Schaaf, F. Boulmedais, *Langmuir* **31** (2015) 12856–12872.
12. R. R. Costa, J. F. Mano, *Chem. Soc. Rev.* **43** (2014) 3453–3479.
13. S. Bai, C. Sun, H. Yan, X. Sun, H. Zhang, L. Luo, X. Lei, P. Wan, X. Chen, *Small* **11** (2015) 5807–5813.
14. H. Kerdjoudj, N. Berthelemy, F. Boulmedais, J. F. Stoltz, P. Menu, J. C. Voegel, *Soft Matter* **6** (2010) 3722–3734.
15. Y. Lu, Y. Wu, J. Liang, M. R. Libera, S. A. Sukhishvili, *Biomaterials* **45** (2015) 64–71.
16. J. D. Hong, K. Lowack, J. Schmitt, G. Decher, *Prog. Colloid Polym. Sci.* **93** (1993) 98–102.



17. G. Decher, J. B. Schlenoff, *Multilayer Thin Films*, Wiley-VCH, Weinheim, 2003, str. 3–6.
18. E. D. Cranston, D. G. Gray, *Biomacromolecules* **7** (2006) 2522–2530.
19. R. V. Klitzing, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **8** (2006) 5012–5033.
20. N. A. Kotov, *Nanostructured Mater.* **12** (1999) 789–796.
21. J. H. Cheung, W. B. Stockton, M. F. Rubner, *Macromolecules* **30** (1997) 2712–2716.
22. P. G. He, T. Takahashi, T. Hoshi, J. Anzai, Y. Suzuki, T. Osa, *Mater. Sci. Eng. C* **2** (1994) 103–106.
23. R. Polak, T. Crouzier, R. M. Lim, K. Ribbeck, M. M. Beppu, R. N. M. Pitombo, R. E. Cohen, M. F. Rubner, *Biomacromolecules* **15** (2014) 3093–3098.
24. V. A. Izumrudov, B. K. Mussabayeva, K. B. Murzagulova, *Russ. Chem. Rev.* **87** (2018) 192–200.
25. S. T. Dubas, J. B. Schlenoff, *Macromolecules* **32** (1999) 8153–8160.
26. M. Salomäki, P. Tervasmäki, S. Areva, J. Kankare, *Langmuir* **20** (2004) 3679–3683.
27. J. Požar, K. Bohinc, V. Vlachy, D. Kovačević, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13** (2011) 15610–15618.
28. C. Porcel, P. Lavalley, V. Ball, G. Decher, B. Senger, J.C. Voegel, P. Schaaf, *Langmuir* **22** (2006) 4376–4383.
29. A. G. Skirtach, A. Muñoz Javier, O. Kreft, K. Köhler, A. Piera Alberola, H. Möhwald, W. J. Parak, G. B. Sukhorukov, *Angew. Chemie. Int. Ed.* **45** (2006) 4612–4617.
30. B. G. De Geest, A. G. Skirtach, A. A. Mamedov, A. A. Antipov, N. A. Kotov, S. C. De Smedt, G. B. Sukhorukov, *Small* **3** (2007) 804–808.
31. H. Xia, Y. Zhao, R. Tong, *Adv. Exp. Med. Biol.* **880** (2016) 365–384.
32. T. Mauser, C. Déjugnat, G.B. Sukhorukov, *Macromol. Rapid Commun.* **25** (2004) 1781–1785.
33. S. De Koker, B.N. Lambrecht, M.A. Willart, Y. Van Kooyk, J. Grooten, C. Vervaet, J.P. Remon, B.G. De Geest, *Chem. Soc. Rev.* **40** (2011) 320–339.
34. M. Dierendonck, S. De Koker, C. Vervaet, J.P. Remon, B.G. De Geest, *J. Control. Release* **161** (2012) 592–599.
35. Y. Itoh, M. Matsusaki, T. Kida, M. Akashi, *Chem. Lett.* **33** (2004) 1552–1553.
36. Y. Xiao, J. Du, *J. Mater. Chem. B* **8** (2020) 354–367.
37. T. Shutava, Z. Zheng, V. John, Y. Lvov, *Biomacromolecules* **5** (2004) 914–921.

38. D. G. Shchukin, G. B. Sukhorukov, H. Möhwald, *J. Phys. Chem. B* **108** (2004) 19109–19113.
39. C. M. Jewell, D. M. Lynn, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60** (2008) 979–999.
40. L. L. Del Mercato, P. Rivera-Gil, A. Z. Abbasi, M. Ochs, C. Ganas, I. Zins, C. Sönnichsen, W. J. Parak, *Nanoscale* **2** (2010) 458–467.
41. T. Mauser, C. Déjugnat, H. Möhwald, G. B. Sukhorukov, *Langmuir* **22** (2006) 5888–5893.
42. P. Schuetz, F. Caruso, *Adv. Funct. Mater.* **13** (2003) 929–937.
43. N. Gaponik, I. L. Radtchenko, M. R. Gerstenberger, Y. A. Fedutik, G. B. Sukhorukov, A. L. Rogach, *Nano Lett.* **3** (2003) 369–372.
44. G. B. Sukhorukov, D. V. Volodkin, A. M. Günther, A. I. Petrov, D. B. Shenoy, H. Möhwald, *J. Mater. Chem.* **14** (2004) 2073–2081.
45. N. A. S. Mohd Pu'ad, P. Koshy, H.Z. Abdullah, M.I. Idris, T.C. Lee, *Heliyon* **5** (2019) e01588.
46. R. Murugan, S. Ramakrishna, *Cryst. Growth Des.* **5** (2005) 111–112.
47. S. Pai, M.S. Kini, R. Selvaraj, *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2019).
48. M. P. Ferraz, F. J. Monteiro, C. M. Manuel, *J. Appl. Biomater. Biomech.* **2** (2004) 74–80.
49. M. Shirkhazadeh, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **9** (1998) 67–72.
50. M. Prakasam, J. Locs, K. Salma-Ancane, D. Loca, A. Largeteau, L. Berzina-Cimdina, *J. Funct. Biomater.* **6** (2015) 1099–1140.
51. P. W. Brown, R. I. Martin, *J. Phys. Chem. B* **103** (1999) 1671–1675.
52. Z. F. Chen, B. W. Darvell, V. W. H. Leung, *Arch. Oral Biol.* **49** (2004) 359–367.
53. B. Palazzo, M. C. Sidoti, N. Roveri, A. Tampieri, M. Sandri, L. Bertolazzi, F. Galbusera, G. Dubini, P. Vena, R. Contro, *Mater. Sci. Eng. C* **25** (2005) 207–213.
54. R. Rogojan, E. Andronescu, C. Ghitulica, M. Birsan, G. Voicu, S. Stoleriu, A. Melinescu, A. Ianculescu, *Adv. Mater. Res.* **590** (2012) 63–67.
55. I. Sopyan, M. Mel, S. Ramesh, K. A. Khalid, *Sci. Technol. Adv. Mater.* **8** (2007) 116–123.
56. Y. Boyjoo, V. K. Pareek, J. Liu, *J. Mater. Chem. A* **2** (2014) 14270–14288.
57. T. A. Ostomel, Q. Shi, P. K. Stoimenov, G. D. Stucky, *Langmuir* **23** (2007) 11233–11238.
58. H. J. Butt, B. Cappella, M. Kappl, *Surf. Sci. Rep.* **59** (2005) 1–152.

59. R. N. Jagtap, A. H. Ambre, *Indian J. Eng. Mater. Sci.* **13** (2006) 368–384.
60. T. Klačić, *Površinski potencijal na međupovršini (111) fluorit/vodena otopina elektrolita*, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2017, str. 27.
61. Y. Leng, *Materials Characterization: Introduction to Microscopic and Spectroscopic Methods*, Wiley-VCH, Weinheim, 2013, str. 127–161.
62. D. L. Parkhurst i C. A. J. Appelo, *User's guide to PhreeqC (Version 2)*, US Geological Survey, Denver, 1999, 9–60.
63. D. F. Evans, H. Wennerström: *The Colloidal Domain*, Wiley-VCH, New York, 1999, 5 poglavlje
64. *4- Instruction Manual for 90Plus/BI-MAS. Multi Angle Particle Sizing Option Operation Manual*, Brookhaven Instruments Corporation, New York, 1995.
65. *Brookhaven Instruments Corporation ZetaPlus*, Brookhaven Instruments Corporation, New York, 2002.
66. *Thermo Fisher Scientific OMNIC FTIR Software*, Waltham, MA, USA
67. *NanosScope Analysis 2.0 User Manual*, Bruker, 2019.
68. *Espirit 2.1 User Manual*, Bruker, 2019.
69. N. Kato, P. Schuetz, A. Fery, F. Caruso, *Macromolecules* **35** (2002) 9780–9787.
70. J. Salopek, A. Sadžak, D. Kuzman, J. Požar, D. Kovačević, *Croat. Chem. Acta* **90** (2017) 281–287.
71. F. Caruso, H. Lichtenfeld, E. Donath, H. Möhwald, *Macromolecules* **32** (1999) 2317–2328.
72. J. Dong, Y. Ozaki, K. Nakashima, *Macromolecules* **30** (1997) 1111–1117.
73. P. Wang, R. K. Kankala, B. Chen, R. Long, D. Cai, Y. Liu, S. Wang, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **9999** (2018) 1–9.
74. H. Gheisari, E. Karamian, M. Abdellahi, *Ceramics International* (2015)
75. C. S. Kumar, K. Dhanaraj, R. M. Vimalathithan, P. Ilaiyaraja, G. Suresh, *J. Asian Ceram. Soc.* (2020) 1–9.
76. W. Tong, C. Gao, *Polym. Adv. Technol.* **16** (2005) 827–833.

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Nikolina Peranić

Datum rođenja: 16. siječnja 1996.

Mjesto rođenja: Zadar

### Obrazovanje

2002.–2010. Osnovna škola Antuna Gustava Matoša, Novalja

2010.–2014. Pazinski kolegij-klasična gimnazija s pravom javnosti, Pazin

2014.–2018. Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2018. 11. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka, Prirodoslovno-matematički fakultet