

Priprava mikročestica primjenom mikroreaktora

Malbaša, Zoran

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:697795>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-08**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I
TEHNOLOGIJE SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Zoran Malbaša

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidat **Zoran Malbaša**

Predao je izrađen diplomski rad dana: 09. srpnja 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

Izv. prof. dr. sc. Anamarija Rogina, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Prof. dr. sc. Marica Ivanković, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije
Dr. sc. Leonard Bauer, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije
Prof. dr. sc. Krešimir Košutić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 12. srpnja 2024.

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

Zoran Malbaša

Priprava mikročestica primjenom mikroreaktora

DIPLOMSKI RAD

Mentor: izv. prof. dr. sc. Anamarija Rogina Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Članovi ispitnog povjerenstva:

Izv. prof. dr. sc. Anamarija Rogina, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Prof. dr. sc. Marica Ivanković, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Dr. sc. Leonard Bauer, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Prof. dr. sc. Krešimir Košutić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

Zagreb, srpanj 2024.

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

Određivanje oblika i veličine čestica provedeno je na pretražnom fluorescentnom mikroskopu nabavljenom iz Europskog fonda za regionalni razvoj, Operativni program Konkurentnost i kohezija 2014.-2020., Europski strukturni i investicijski fondovi u sklopu Poziva „Jačanje kapaciteta za istraživanje, razvoj i inovacije“ projekt br. KK.01.1.1.07.0014, „Biorazgradive 3D tiskane strukture za augmentaciju kostiju“.

Zahvaljujem mentorici, izv. prof. dr. sc. Anamariji Rogina, na prihvaćenom mentorstvu te stručnom vodstvu i savjetima tijekom izrade rada.

Veliko hvala i asistentici Andrei Lončarević Vrabec na pomoći i savjetima pri izvedbi eksperimentalnog dijela, kao i pisanju cijelog rada.

Hvala svim prijateljima koji su bili uz mene, pogotovo L.S. i M.B.

Ono najvažnije, hvala roditeljima i sestri Anamariji na svim oblicima podrške i savjetima.

Hvala vam svima!

SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je pripremiti mikročestice na temelju kompleksa kitozana i bakrovih(II) iona (CHT-Cu) primjenom mikroreaktora napravljenog *de novo*. Promjenom brzine protoka kontinuirane i dispergirane faze cilj je bio dobiti usku raspodjelu veličina mikročestica.

U eksperimentalnom dijelu rada, strojnom obradom napravljen je mikroreaktor na temelju poli(metil-metakrilata) (PMMA) geometrije poprečnog protoka (T-spoj) s kanalima promjera $940 \pm 50 \mu\text{m}$. Kao dispergirana faza korištena je otopina CHT-Cu kompleksa, dok je kontinuirana faza bila suncokretovo ulje s ili bez emulgatora (SPAN 85). Ispitivan je utjecaj promjene brzine protoka kontinuirane i dispergirane faze kao i upotreba različitog sastava neutralizacijskog medija. Kao neutralizacijski medij je korištena $1,25 \text{ mol dm}^{-3}$ otopina natrijeva hidroksida (NaOH) ili smjesa otopine NaOH i 96 vol. % etanola (volumni omjer 1:1). Također, ispitivane su različite modifikacije mikroreaktora, kao što su primjena metalne igle i crijeva za lakše odvođenje produkta (otopine) na izlazu iz mikroreaktora, te primjena teflonskog sloja na izgled i veličinu nastalih CHT-Cu mikročestica.

Dobivene CHT-Cu mikročestice bile su prosječne širine $567 \pm 190 \mu\text{m}$ i dužine $1091 \pm 250 \mu\text{m}$, neovisno o primijenjenim brzinama protoka kontinuirane i dispergirane faze, ali različitog oblika uslijed upotrebe različitih sastava neutralizacijskog medija. Tijekom ispiranja i sušenja dolazi do smanjenja nastalih mikročestica uz zadržavanje nepravilnog, izduženog oblika, uz pojavu aglomerata. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (ATR-FTIR) pokazala je prisutnost elektrostatskih sila između metalnih iona i polimernog lanca kitozana bez pojave dodatnih apsorpcijskih vrpca, što je potvrdilo uspješnost primijenjenog postupka ispiranja i sušenja mikročestica. Kao obećavajući sustav su se pokazale CHT-Cu mikročestice dobivene primjenom $1,25 \text{ mol dm}^{-3}$ NaOH i 96 vol.% EtOH kao neutralizacijskog medija, uz brzine protoka kontinuirane i dispergirane faze od 50 i $0,5 \text{ mL h}^{-1}$.

Rezultati ovog rada ukazuju na potencijal korištenja mikroreaktora za dobivanje mikročestica na temelju kitozana i metalnih iona, a što može poslužiti kao podloga za daljnja istraživanja s ciljem optimizacije procesa kako bi se dobile mikročestice pravilnijih oblika s užom raspodjelom veličina, a za razvoj sustava za ciljanu dostavu lijekova.

Ključne riječi: kitozan, bakrovi(II) ioni, mikroreaktori, mikročestice.

Preparation of microparticles using microreactors

ABSTRACT

The aim of this study was to prepare microparticles based on chitosan-copper(II) ion complex (CHT-Cu) using a *de novo* microreactor. By manipulating the flow rates of the continuous and dispersed phases, the goal was to achieve a narrow size distribution of the CHT-Cu microparticles.

In the experimental part of this study, a poly(methyl-methacrylate) (PMMA) microreactor with T-junction geometry and channels of diameter $940 \pm 50 \mu\text{m}$ was prepared by surface machining technique using a milling machine. The dispersed phase was CHT-Cu complex solution, while the continuous phase was sunflower oil with or without an emulsifier (SPAN 85). The study examined the effects of varying the flow rates of the continuous and dispersed phases, as well as using different compositions of the neutralizing medium. The neutralizing medium was a 1.25 mol dm^{-3} sodium hydroxide (NaOH) solution or a mixture of NaOH solution and 96 vol. % ethanol (volume ratio 1:1). Additionally, different modifications of the microreactor were tested, such as the use of a metal needle and a tube (pipe) for easier removal of the product (solution) from the microreactor's outlet, and the use of a Teflon layer on the microreactor's surface, on the size and shape of the resulting CHT-Cu microparticles.

The obtained CHT-Cu microparticles were of average width $567 \pm 190 \mu\text{m}$ and length $1091 \pm 250 \mu\text{m}$, regardless of the applied flow rates of the continuous and dispersed phases, but varied in shape due to the use of different compositions of the neutralizing medium. During washing and drying, the resulting microparticles decreased in size while retaining an irregular, elongated shape and the formation of agglomerates. Fourier-transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) indicated the presence of electrostatic forces between the metal ions and the chitosan polymer chain without the appearance of new absorption bands, confirming the success of the applied washing and drying procedures. CHT-Cu microparticles obtained using $1,25 \text{ mol dm}^{-3}$ NaOH and 96 vol.% EtOH as a neutralization medium, with continuous and dispersed phase flow rates of 50 and $0,5 \text{ mL h}^{-1}$ proved to be a promising system.

The results of this study indicate the potential use of microreactors for obtaining microparticles based on chitosan and metal ions, which can serve as a basis for further research aimed at

optimizing the process to produce micro-particles with more regular shapes and narrower size distribution, for the development of targeted drug delivery systems.

Key words: chitosan, copper(II) ions, microreactor, microparticles.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Mikroreaktori	3
2.1.1. Materijali za izradu mikroreaktora.....	3
2.1.2. Izvedbe mikroreaktora	5
2.1.3. Tehnike izrade mikroreaktora	7
2.2. Mikročestice.....	12
2.2.1. Mikročestice na temelju kitozan-bakar(II) kompleksa	13
2.3. Literaturni pregled	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	20
3.1. Materijali.....	20
3.2. Proces izrade mikroreaktora	20
3.3. Priprava otopina	22
3.4. Priprava mikročestica.....	22
3.5. Ispitivani procesni parametri.....	24
3.6. Karakterizacija dobivenih mikročestica.....	24
3.6.1. Svjetlosni invertni mikroskop	24
3.6.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom.....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. Utjecaj parametara na dobivanje mikročestica	26
4.1.1. Proces pripreme CHT-Cu mikročestica	27
4.1.2. Ispitivanje utjecaja emulgatora	34
4.2. Određivanje veličine mikrogelova.....	35
4.3. Ispiranje i sušenje mikročestica	37
4.4. Karakterizacija dobivenih CHT-Cu mikročestica	38

4.4.1. Veličina i oblik suhih mikročestica	38
4.4.2. Kemijski sastav	42
4.5. Prijedlozi za daljnja istraživanja	44
5. ZAKLJUČAK	46
6. POPIS SIMBOLA.....	47
7. LITERATURA.....	48
8. PRILOZI	54
8.1. Izrada mikroreaktora	54
8.2. Izrada mikročestica na temelju kitozana.....	54
ŽIVOTOPIS.....	56

1. UVOD

U području biomedicine neprekidno se istražuju i razvijaju inovativni materijali sa svojstvima kao što su biorazgradljivost i biokompatibilnost, odnosno materijali koji su u skladu s biološkim zahtjevima ljudskog organizma pri čemu djeluju minimalno ili gotovo bez ikakvog štetnog utjecaja. Korištenje takvih materijala, temeljenih na biopolimerima, predstavlja alternativni pristup unapređenju medicinskih postupaka, istovremeno pružajući zaštitu i dobrobit ljudskom tijelu. Kao jedan od najčešće upotrebljivanih polimera ističe se kitozan, prirodni polimer dobiven iz hitina, čija ga biokompatibilnost, pH osjetljivost, niska toksičnost te razgradljivost ljudskim lizozimom čine idealnim materijalom za razvoj sustava za ciljanu dostavu lijeka. Među nadolazećim inovacijama u medicinskom istraživanju ističu se polimerne mikročestice čije su bitne karakteristike specifična površina i mogućnost inkapsulacije lijekova te primjena u obliku ciljane dostave [1].

Polimerne mikročestice mogu se modificirati s ciljem poboljšanja učinkovitosti pri dostavi lijeka, biorazgradljivosti ili primjene u različitim područjima. Kao moguća modifikacija materijala koriste se terapijski metalni ioni, poput bakrovih(II), cinkovih(II) i srebrovih(I) iona koji ostvaruju višestruko djelovanje pri čemu mogu utjecati na strukturu mikročestice te također djelovati antimikrobno ili antitumorski [1].

Mikročestice se najčešće dobivaju metodama poput elektroštrcanja, metodom sušenja raspršivanjem ili iz emulzija. Međutim, navedene metode imaju nedostatke kao što su nestabilan prinos, dugotrajni postupci i neujednačene veličine čestica sa širokom raspodjelom veličina. Kao alternativni pristup za proizvodnju polimernih mikročestica s uskom raspodjelom veličina te poznatog kemijskog sastava, kroz preciznu manipulaciju višefaznih tokova na mikroskali, ističe se primjena mikroreaktora [1, 2].

Priprava mikročestica primjenom mikroreaktora temelji se na upotrebi mikrovolumena različitih faza (kontinuirane i dispergirane faze) koje se susreću u geometriji spoja (npr. T-spoj) u mikroreaktoru. Uslijed razlike fizikalno-kemijskih svojstava faza, odnosno smične brzine, nastaju kapljice dispergirane faze koje se prenose u drugoj (kontinuiranoj) fazi do kolektora gdje se fizikalno ili kemijski umrežuju kako bi se dobile mikročestice [1, 2].

U ovom radu, naglasak je na procesu izrade mikroreaktora *de novo*, te primjeni istoga za dobivanje mikročestica na osnovi kompleksa kitozana i bakrovih(II) iona, a za koje je

pokazano da se mogu pripremiti drugim metodama [2, 3]. Kako bi se odredili kemijski sastav te veličina i raspodjela veličina dobivenih mikročestica korištene su infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR analiza) i svjetlosna mikroskopija.

2. OPĆI DIO

2.1. Mikroreaktori

Napredak u znanosti i tehnologiji rezultirao je znatnim razvojem mikroreaktorskih uređaja. Uporaba mikroreaktora posljednjih nekoliko desetljeća je uznapredovala uslijed bolje učinkovitosti mikroreaktora nad šaržnim procesima i postojećim kontinuiranim reaktorima makro veličine. Mikroreaktorski sustavi uglavnom nude mogućnost upravljanja visokoučinkovitim sintezama materijala visokog prinosa, stabilnosti, selektivnosti, manje potrošnje energije i poboljšane homogenosti. Stoga, mikročestice dobivene primjenom mikroreaktora potencijalno mogu zadovoljiti zahtjeve za biomedicinske primjene, a koji zahtijevaju mikročestice s uskom raspodjelom veličine čestica [1–4].

Pojam „mikroreaktor“ obično se odnosi na kemijski reaktor malih dimenzija koji se koristi u raznim kemijskim procesima. Mikroreaktori se primarno dizajniraju za rad s malim volumenima za kemijsku sintezu materijala, ali i za druge primjene. Mikroreaktori nude prednosti kao što su poboljšani prijenos topline i tvari, bolja kontrola nad uvjetima reakcije i mogućnost provođenja eksperimenata s malim količinama reagensa [1–5].

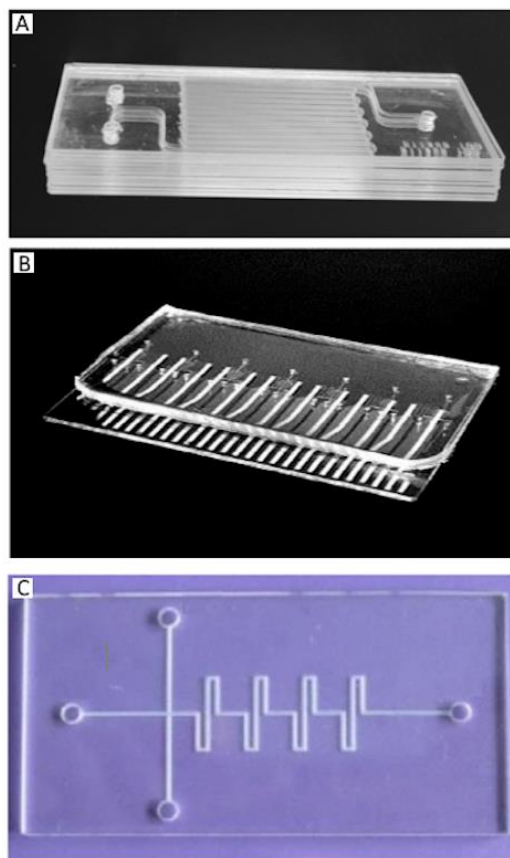
Princip rada ovisi o predviđenoj namjeni mikroreaktora. Svaki mikroreaktor se dizajnira i optimira za drugačiju primjenu koristeći se različitim analitičkim programskim sustavima. U osnovi, svaki mikroreaktor se temelji na primjeni različite brzine protoka malih volumena različitih faza koji protječu kroz predviđeni dizajn pogodan za kontroliranu željenu reakciju [1–5].

Kako bi se mikroreaktor mogao primijeniti za predviđenu namjenu, važno je definirati materijale od kojih će se izraditi kako bi se osigurala inertnost mikroreaktora na kemikalije te shodno tome odabrati pogodnu tehniku izrade samog uređaja i željene geometrije koja će rezultirati uspješnom reakcijom [4, 5].

2.1.1. Materijali za izradu mikroreaktora

Odabir materijala ovisi o raznim čimbenicima uključujući radne uvjete (tlak i temperatura, pH reaktanata i produkata), fizikalna svojstva reakcijske smjese, cijena, mogućnost masovne proizvodnje i jednostavnost izrade. Mikroreaktori se mogu proizvesti korištenjem širokog

raspona materijala kao što su staklo, keramika, polimeri, metali te kompozitni materijali (slika 1) [4, 5].



Slika 1. Primjeri mikroreaktora izrađenih od različitih materijala ovisno o željenoj primjeni: (A) stakleni mikroreaktor [6]; mikroreaktor na temelju (B) polidimetilsiloksana (PDMS) [7]; i (C) poli(metil-metakrilata) (PMMA) [8].

Stakleni mikroreaktori (slika 1A) nude prednost vizualizacije reakcije upravo zbog prozirnosti, ali su ograničeni u dizajnu reaktora zbog poteškoća s izradom kompleksnije geometrijske strukture na mikroreaktoru. Također, ukoliko je potrebna izmjena visokih i niskih temperatura, vrlo često dolazi do pucanja. Ipak, popularan su izbor za organske sinteze jer omogućuju elektroosmotski protok (engl. *electroosmotic flow*) s raznim polarnim otapalima [4, 9].

U današnje vrijeme razne vrste polimera privlače veliku pozornost kao potencijalni materijali za izradu mikroreaktora. Polimerni mikroreaktori pokazuju nekoliko prednosti, uključujući prilagodljiva mehanička svojstva, elastičnost, tvrdoću ili fleksibilnost, cjenovnu dostupnost, jednostavnost izrade i jednokratnu upotrebu. Polimerni mikroreaktori mogu se općenito podijeliti u dvije kategorije: mikroreaktori na temelju polidimetilsiloksana (PDMS) (slika 1B), te mikroreaktori na temelju termoplastičnih polimera (slika 1C) kao što su

poli(vinil-klorid) (PVC), polistiren (PS), polikarbonat (PC) i poli(metil-metakrilat) (PMMA). Ovakvi materijali omogućavaju izradu različitih geometrijskih mikrosustava upravo zbog kemijskih i mehaničkih svojstava, ali i cijene jer su relativno jeftini i lako dostupni [4, 9].

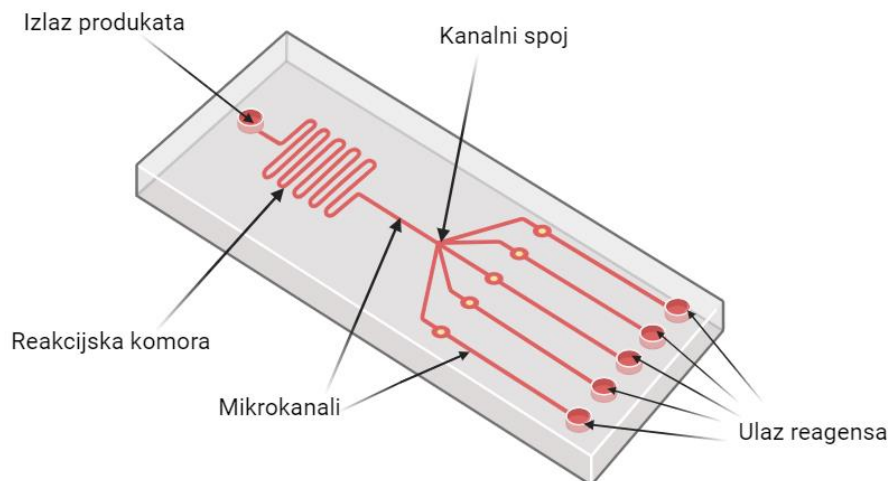
Kako bi se osigurala potpuna kontrola vođene reakcije, potrebno je odrediti najpogodniju geometrijsku izvedbu mikroreaktora. Stoga, u nastavku rada bit će dan pregled najčešće upotrebljivanih izvedbi mikroreaktora [4, 10].

2.1.2. Izvedbe mikroreaktora

Upotreba mikroreaktora za pripremu mikročestica se zasniva na upotrebi mikrovolumena (10^{-9} do 10^{-18} L) dviju nemješljivih faza koje prilikom doticaja u spoju na mikroreaktoru definirane geometrije tvore kapljicu. Pri tome je sporija faza dispergirana u bržoj, kontinuiranoj fazi. Da bi se to ostvarilo, tokovi faza moraju biti laminarni (vrijednost Reynoldsovog broja je manja od 1). Kapilarne nestabilnosti uzrokuju nastanak kapljica koje se očituju kao težnja dispergirane kapljevine da smanji međupovršinsku napetost pomoću smanjenja međupovršine faza. Viskoznost i inercijske sile djeluju u suprotnosti s napetošću površine; prve pokušavaju deformirati međupovršinu, dok se druge tome opiru. Važno je naglasiti da brzine protoka za stvaranje kapljica ovise o viskoznosti, temperaturi i prirodi pojedinih faza te spoju na odgovarajućoj izvedbi mikroreaktora [4, 10].

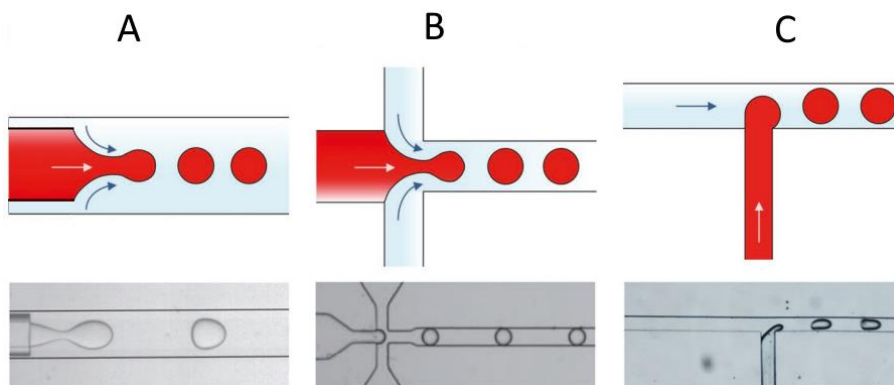
Promatrajući općenitu izvedbu mikroreaktora, svaki se mikroreaktor sastoji od ulaza i izlaza koji se koriste za uvođenje reagensa i uklanjanje produkata reakcije te mikrokanala često cilindričnih ili pravokutnih oblika kroz koje teku reagensi i produkti. Ako kao produkti reakcije nastaju mikročestice u sustavu koji zahtijeva upotrebu otopine za umreživanje, važno je pronaći odgovarajuće umreživalo te optimalnu koncentraciju. Kao najčešća umreživala za ionsko umreživanje koriste se otopine natrijevog tripolifosfata (Na-TPP) ili otopine hidroksida (najčešće otopina natrijeva hidroksida) različitih koncentracija [5, 11].

Vrlo važni dijelovi su elementi za miješanje, odnosno kanalni spoj – struktura spoja mikrokanala dizajnirana za poboljšanje miješanja reaktanata. Osim prethodno navedenih dijelova, mikroreaktori mogu imati reakcijske komore, odnosno područje u kojem se odvija kemijska reakcija ili poboljšano miješanje, te senzore za temperaturu, tlak i pH [12]. Uobičajeni geometrijski dijelovi mikroreaktora su prikazani na slici 2.



Slika 2. Shematski prikaz karakterističnih dijelova mikroreaktora izrađen prema ref. [12].

Najvažniji geometrijski dio svakog mikroreaktora je kanalni spoj koji predstavlja granicu tokova te njegova geometrija utječe na stvaranje kapljica. Najčešće mikroreaktorske geometrije koje se koriste za dobivanje kapljice prikazane su na slici 3. Najčešće se upotrebljavaju tri vrste korištenih struktura, odnosno tri sustava koji koriste smičnu silu (viskoznost faza) za stvaranje kapljica: geometrija zajedničkog protoka (koaksijalni protok; slika 3A), geometrija usmjerenog protoka (slika 3B) i geometrija poprečnog protoka (T-spoj; slika 3C). Postoje i druge izvedbe koje se temelje na varijacijama izvedbe kanala radi olakšavanja ili pokretanja nastanka kapljica, a kao što su postupna emulgacija, mikrokanalna emulzija i membranska emulzija. Nastale se kapljice prenose duž kontinuirane faze do kraja mikroreaktora gdje izlaze i dolaze u kontakt s kolektorom ili otopinom za umreživanje [4, 10, 11, 13, 14].



Slika 3. Shematski prikaz (gornji red) i stvarni prikaz (donji red) karakterističnih spojeva za dobivanje dispergiranih kapljica u različitim sustavima: (A) koaksijalni protok [4, 11], (B) geometrija usmjerenog protoka [4, 15], (C) poprečni protok (T-spoj) [4, 16].

Kod geometrije koaksijalnog protoka (engl. *co-flow geometry*), vidljivo na slici 3A gdje je takva izvedba korištena za stvaranje kapljica mješavine 80 % glicerola i 20 % dH₂O (demineralizirana voda) u silikonskom ulju. Fluidi dispergirane i kontinuirane faze susreću se u paralelnim tokovima, odnosno geometrijska izvedba je takva da je umetnut kanal dispergirane faze u kanal kontinuirane faze. Najčešći oblik nastanka kapljica je oblik pulsiranja pri čemu nastaju kapljice promjerom manjeg od promjera kanala dispergirane faze [11, 17, 18].

Geometrija usmjerenog protoka (engl. *flow-focusing geometry*), prikazana na slici 3B, korištena je za stvaranje kapljica heksadekana u dH₂O s dodatkom 0,5 mas. % surfaktanta natrijeva dodecilsulfata. Iznenađna kontrakcija kapljevine u otvor inducira visoku smičnu silu i stoga omogućuje stvaranje kapljica veće veličine nego dimenzija otvora kanala dispergirane faze [4, 11, 15].

Geometriju poprečnog protoka (engl. *cross-flow geometry*; slika 3C) karakterizira spoj kanala dispergirane faze s kanalom kontinuirane faze pod kutom θ ($0^\circ < \theta < 180^\circ$). Ukoliko se kanali nalaze pod pravim kutom, onda se ovakva geometrija naziva T-spoj. Geometrija poprečnog protoka omogućava pristup za proizvodnju pojedinačnih emulzija i uključuje relativno jednostavan proces izrade bez potreba za usklađivanjem kanala. [4, 11, 19]. U radu Ushikubo i suradnika [18], korišteni su mikroreaktori Y i T-spoja za stvaranje kapljica deionizirane vode u sojinom ulju s dodatkom 4 vol. % emulgatora poliglicerola.

Nakon odabira vrsta materijala za izradu mikroreaktora te željene geometrije sustava ovisno o kemijskoj reakciji koja će se provoditi, odabire se pogodna tehnika izrade mikroreaktora. U nastavku rada bit će dan pregled najčešćih tehnika izrade mikroreaktora [4, 12].

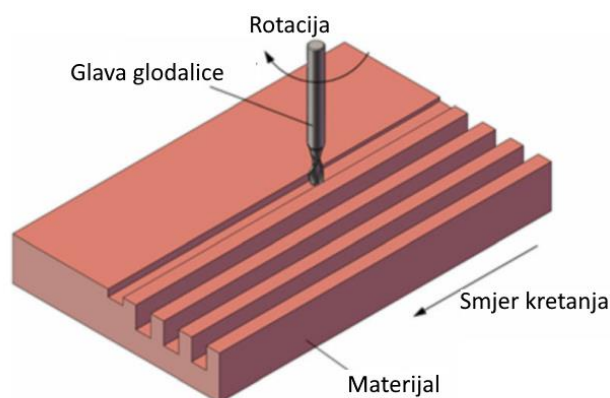
2.1.3. Tehnike izrade mikroreaktora

U današnje vrijeme, razvojem tehnologije, nastale su brojne tehnike izrade koje zadovoljavaju opće zahtjeve za konstrukciju učinkovitog i kompaktnog mikroreaktora. Ovisno o potrebnim svojstvima i krajnjoj primjeni, uobičajene metode za izradu mikroreaktora su strojna obrada (poput upotrebe glodalice), litografija, injekcijsko prešanje, ali i naprednije tehnike poput lasersko-ablacijskog oblikovanja ili u novije vrijeme aditivnom proizvodnjom [4, 20].

2.1.3.1. Strojna obrada

Strojna obrada za izradu mikroreaktora temelji se na upotrebi strojeva za ultraprecizno glodanje (princip rada vidljiv na slici 4), postupke tokarenja i grubog brušenja, a mogu se koristiti

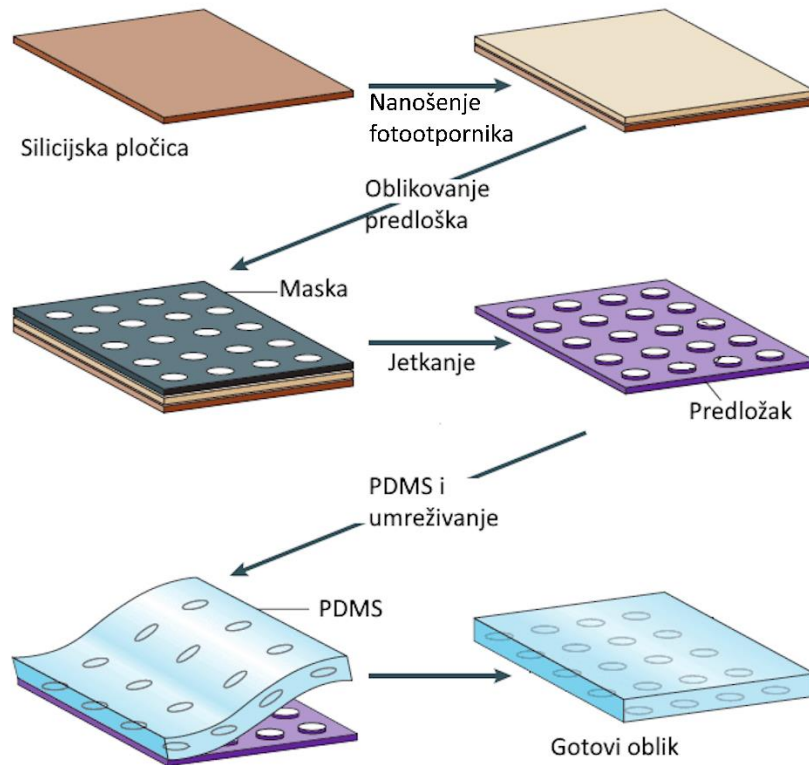
samostalno ili u kombinaciji. Kvaliteta obrade površine primjenom ovih procesa ovisi o karakteristikama korištenog materijala i parametara obrade te se mikroreaktori najčešće moraju dodatno obraditi kako bi se uklonio višak materijala. Najčešći postupci dodatne obrade su uklanjanje materijala taljenjem, isparavanjem, finim brušenjem ili kombinacijom ovih tehnika [4, 21]. Primjer termoplastičnog mikroreaktora izrađenog upotrebom ultrapreciznog glodanja vidljiv je u radu Guckenberger i suradnika [22].



Slika 4. Prikaz principa izrade kanala uporabom glodalice [21].

2.1.3.2. Litografija

Litografija je jedna od vrlo često korištenih tehnika izrade mikroreaktora na temelju PDMS-a. Temelji se na upotrebi pripremljene podloge (supstrata), često silicijska pločica ili stakleni čip, na koju se nanosi tanki sloj fotootpornika (materijala osjetljivog na svjetlost), pazeći da se osigura ravnomjerna raspodjela materijala. Potom se oblikuje željena geometrijska izvedba budućeg mikroreaktora. Supstrat se zatim izlaže UV svjetlu kroz masku koja sadrži željeni uzorak mikrokanala. Maska dopušta svjetlosti da prođe samo kroz određena područja, prenoseći geometrijski uzorak na fotootpornu podlogu. Predložak se obrađuje suhim ili mokrim jetkanjem kako bi se uklonio osvijetljeni ili neosvijetljen dio, ovisno o vrsti fotootpornika, otkrivajući površinu ispod maske. Dobiveni predložak često se dodatno obrađuje kako bi se u potpunosti formirali mikrokanali i drugi strukturni elementi mikroreaktora. Nadalje, sav preostali fotootpornik se uklanja, ostavljajući urezani uzorak geometrije sustava na predlošku na koji se nanosi PDMS. Nakon umreživanja i očvršćivanja dobiva se gotovi oblik; mikroreaktor [4, 23, 24]. Cijeli proces izrade mikroreaktora litografijom vidljiv je na slici 5, a u radu Bauer i suradnika [15] prikazana je izrada PDMS mikroreaktora dobivenog tehnikom litografije.

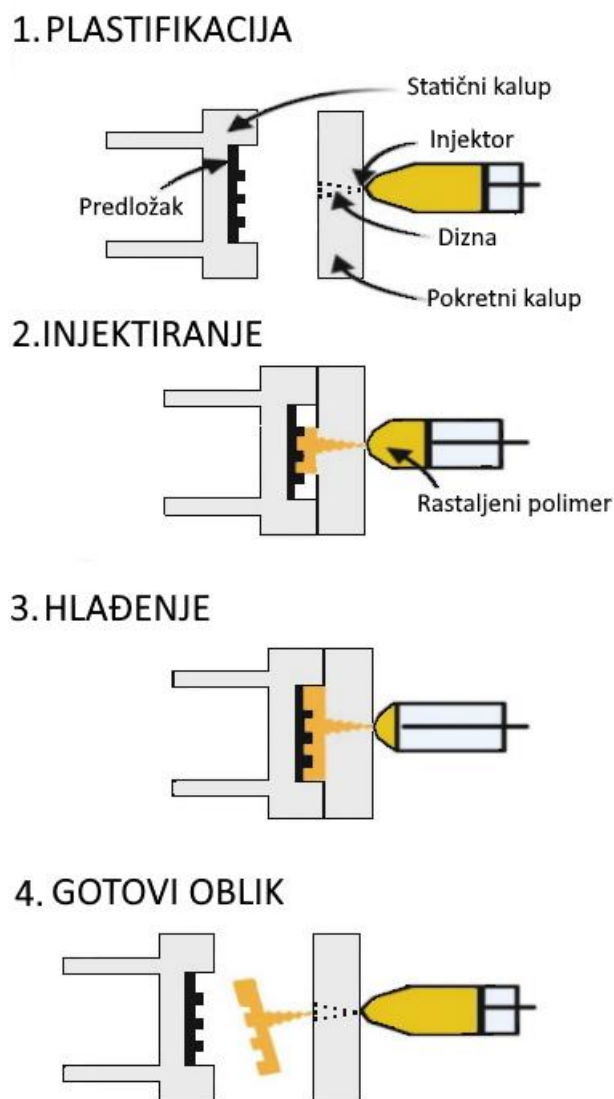


Slika 5. Shematski prikaz procesa izrade PDMS mikoreaktora primjenom litografije [24].

2.1.3.3. Injekcijsko prešanje

Injekcijsko prešanje je postupak koji se često koristi za izradu mikoreaktora. Ovaj proces uključuje ubrizgavanje najčešće rastaljenih polimernih ili drugih materijala u kalup kako bi se stvorile željene komponente. Na slici 6 vidljiv je shematski prikaz procesa izrade mikoreaktora injekcijskim prešanjem. Prema danoj shemi procesa, u prvom koraku se odvija priprema predložka buduće izvedbe mikoreaktora koja se stavlja u statični dio kalupa. Nasuprot statičnog dijela kalupa nalazi se pokretni dio na kojem je smještena dizna injektora. U sljedećem koraku, zatvara se kalup i kroz diznu se injektira rastaljeni polimer dok se kalup ne ispuni u potpunosti. Nakon uspješnog injektiranja, slijedi proces hlađenja i na kraju se dobije gotovi otpresak; mikoreaktor sa željenom geometrijom sustava. Ova tehnika omogućuje masovnu proizvodnju mikoreaktora s visokom preciznošću i ponovljivošću te se često koristi u industriji zbog svoje efikasnosti i sposobnosti proizvodnje složenih geometrija. Glavni nedostatak metode je izrada kalupa koji mora precizno definirati unutarnje kanale i detalje mikoreaktora, ali i optimalna temperatura rastaljene mase, odnosno viskoznost, kako bi se osigurala homogena raspodjela rastaljenog materijala duž čitavog kalupa, ali i omogućilo umreživanje polimera ukoliko se koriste duromeri za izradu mikoreaktora [4, 10, 25]. Primjer

uporabe tehnike injekcijskog prešanja za dobivanje PMMA mikroreaktora vidljiv je u radu Ma i suradnika [26].



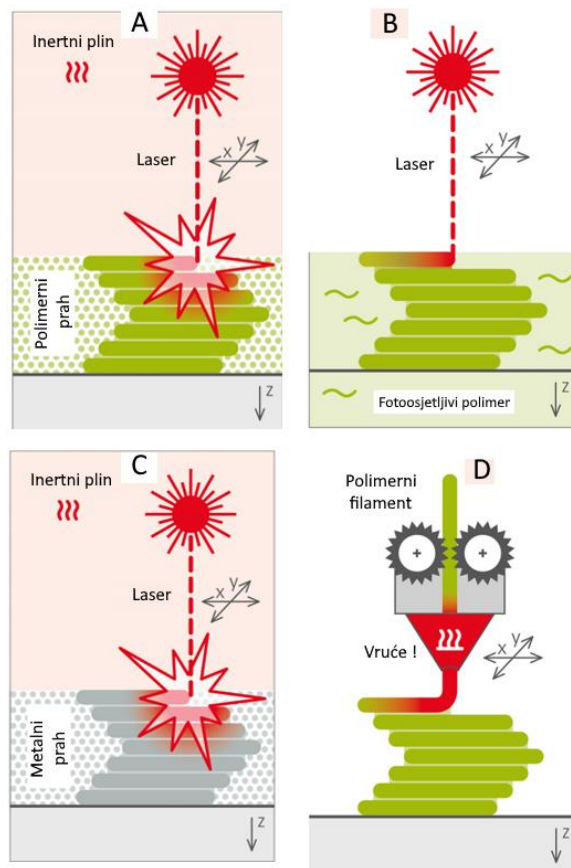
Slika 6. Shematski prikaz proizvodnje mikroreaktora injekcijskim prešanjem (prema ref. [25]).

2.1.3.4. Aditivna proizvodnja mikroreaktora

U zadnje vrijeme, izrada mikroreaktora primjenom različitih metoda aditivne proizvodnje dominira nad klasičnim metodama. Primjena određene metode aditivne proizvodnje ovisi o željenom materijalu od kojeg će biti izrađen mikroreaktor ili složenosti mikroreaktorskog sustava. Jedan takav primjer izrade staklenog mikroreaktora vidljiv je u radu Gal-Or i suradnika [27] uporabom aditivne proizvodnje. Najčešće tehnike aditivne proizvodnje mikroreaktora na

temelju termoplastičnih i duromernih polimera, te metalnih i kompozitnih materijala vidljive su na slici 7, a one su [9, 28]:

- selektivno lasersko sinteriranje,
- stereolitografija,
- izravno lasersko sinteriranje metala i
- očvršćivanje taloženjem.



Slika 7. Shematski prikaz principa rada tehnika aditivne proizvodnje: (A) selektivno lasersko sinteriranje, (B) stereolitografija, (C) izravno lasersko sinteriranje metala, i (D) tehnika očvršćivanja taloženjem [29].

Selektivno lasersko sinteriranje (engl. *selective laser sintering*, SLS) koristi laser velike snage za selektivno stapanje materijala u prahu (npr. plastike, metala) sloj po sloj, omogućujući proizvodnju izdržljivih i složenih dijelova [28].

Stereolitografija (engl. *stereolithography*, SLA) se zasniva na upotrebi UV lasera za stvrdnjavanje tekućeg, fotoosjetljivog polimera (najčešće smole) sloj po sloj, proizvodeći dijelove visoke razlučivosti s glatkom površinom [28].

Izravno lasersko sinteriranje metala (engl. *direct metal laser sintering*, DMLS) se temelji na sličnoj tehnologiji kao i SLS, ali se primjenjuje isključivo za metalne prahove, što omogućuje proizvodnju metalnih mikroreaktora složenih geometrija [28].

Izrada očvršćivanje taloženjem (engl. *fused filament fabrication*, FFF) se temelji na istiskivanju termoplastične niti kroz grijanu mlaznicu, stvarajući slojeve za stvaranje željenog oblika. FFF je relativno jeftin i nudi širok raspon materijala, ali može imati ograničenja u postizanju visoke rezolucije, odnosno kvalitete izrade detalja [28].

Odabirom odgovarajuće tehnike izrade mikroreaktora moguće je proizvesti mikroreaktore kojima se izrađuju novi sustavi za ciljanu dostavu lijekova (engl. *drug delivery system*, DDS), poput mikročestica. Prilikom proizvodnje mikročestica, poželjno je optimizirati proces kako bi se dobile mikročestice pravilnijih oblika i ujednačenijih veličina. U sljedećem poglavlju detaljnije će se opisati mikročestice kao sustavi za isporuku lijekova.

2.2. Mikročestice

Mikročestice predstavljaju čestice s promjerom između 1 i 1000 μm . Mogu biti različitih oblika; pravilnih i nepravilnih. Kada se radi o pravilnim mikročesticama najčešće se govori o mikrosferama ili mikrokapsulama. Njihova relativno mala veličina donosi brojne prednosti u odnosu na veće čestice, makročestice, upravo zbog većeg omjera površine i volumena. Ova karakteristika posebno je značajna kod mikročestica s poroznom strukturom. Materijali od kojih se mogu izrađivati mikročestice obuhvaćaju različite prirodne i sintetičke materijale poput polimera, stakla i keramike [1].

Kao sustavi za dostavu lijekova, mikročestice su pokazale poboljšanu učinkovitost različitih medicinskih tretmana. Njihove prednosti uključuju:

- zaštitu lijekova, proteina i malih molekula,
- sposobnost postizanja kontrolirane brzine otpuštanja inkapsuliranih lijekova tijekom vremena od nekoliko sati ili mjeseci, te
- ciljanu dostavu lijekova.

Upotrebom materijala sa svojstvima biorazgradljivosti te biokompatibilnosti mikročestice je moguće direktno administrirati na ciljano mjesto te time osigurati dolazak lijeka do oboljele stanice. Također, nakon liječenja nije potrebno dodatno uklanjanje sustava za dostavu, već će zbog biorazgradljivosti i djelovanja enzima (poput lizozima) doći do razgradnje pri čemu ne nastaju štetni produkti [30].

Vežanje lijeka je omogućeno poroznom strukturom pri čemu se lijek smješta između polimernih lanaca te ostvaruje slabe disperzijske sile koje omogućuju lako otpuštanje lijeka, ali i dovoljnu stabilnost vezanog lijeka [31].

Mikročestice je moguće modificirati kako bi se poboljšala primjenska svojstva pri čemu je moguće poboljšati antimikrobno djelovanje i stabilnost mikročestica. Upotrebom iona terapijskih metala, poput bakrovih(II) ili srebrnih(I) iona, moguće je dodatno utjecati na stabilnost, veličinu te raspodjelu veličine mikročestica. Osim toga, terapijski metalni ioni imaju sposobnost samostalnog djelovanja pa tako mogu poboljšati antimikrobno djelovanje [31–34].

Kao jedan od mogućih nosioca lijeka za tzv. pametnu dostavu, mikročestice na temelju polimera kitozana sve više privlače pažnju istraživača [1, 35, 36]. U nastavku ovog rada, dan je pregled najvažnijih svojstava mikročestica temeljenih na kitozanu, kao i metode kojima se mogu pripremiti ovakvi sustavi.

2.2.1. Mikročestice na temelju kitozan-bakar(II) kompleksa

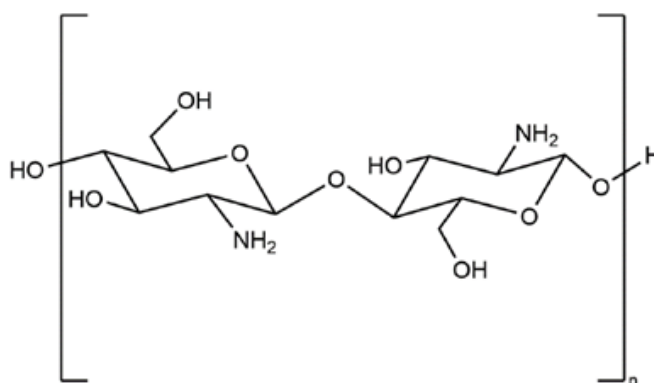
Hitin, linearni polisaharid, osnovni je materijal za proizvodnju kitozana (CHT), polimernog derivata koji postaje sve važniji u biomedicinskom sektoru zbog svojih povoljnih primjenskih svojstava. Uz celulozu, kitozan je jedan od najraširenijih biopolimera, ističući se netoksičnošću, biorazgradljivošću i biokompatibilnošću. Svojstva kitozana, uključujući njegovu učinkovitost u sprječavanju bakterijskih infekcija, značajno ovise o njegovoj čistoći, što ga čini dragocjenim za biomedicinske primjene [1, 37–39].

Najvažniji parametri prilikom uporabe kitozana su prosječna molekulska masa i stupanj deacetilacije (engl. *degree of deacetylation*, DD). Prosječna molekulska masa kitozana varira od 10 do 1000 kDa, ovisno o sirovini i načinu proizvodnje [1, 39, 40], dok stupanj deacetilacije predstavlja postotak primarnih amino skupina u polimernom lancu te se kreće između 50 i 99 % (kod komercijalnog kitozana DD je između 70 i 95 %). Ovi parametri utječu na fizikalno-kemijska svojstva, antibakterijske učinke i primjenu kitozana [40, 41].

Topljivost kitozana ovisi o protoniranju amino skupine i pH vrijednosti medija. Viskoznost otopine povećava se povećanjem koncentracije otopine polimera i stupnjem deacetilacije, a smanjuje s povećanjem temperature ili smanjenjem pH medija. Antimikrobna svojstva kitozana ovise o viskoznosti i stupnju deacetilacije, jer viši DD povećava sadržaj

amino skupina koje djeluju protiv bakterija, narušavajući njihove stanične membrane i inhibirajući njihov rast [40, 42].

Zahvaljujući prisutnosti amino ($-NH_2$) i hidroksidnih skupina ($-OH$) u strukturi (slika 8), kitozanski lanac može djelovati kao ligand u reakcijama kompleksiranja s prijelaznim metalima kao što su cink, bakar i srebro, otvarajući mogućnosti za poboljšanje bioloških svojstava polimera [1, 43]. Reakcijom kompleksiranja, koristeći kitozan te ione prijelaznih metala moguće je kreirati stabilne sferične čestice čija morfologija ovisi o količini iona u strukturi, ali i fizikalno-kemijskim svojstvima kitozana koje je ključno poznavati [2].



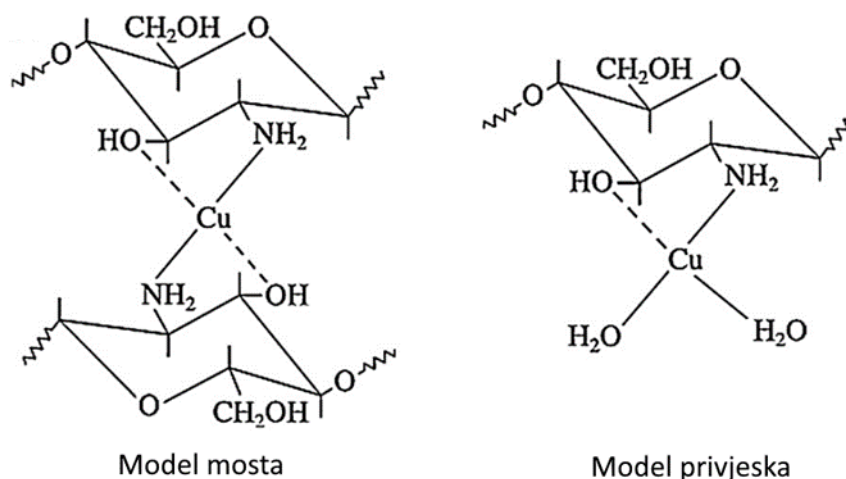
Slika 8. Struktura monomerne jedinice kitozana [44].

Ioni *d*-bloka prijelaznih metala, kao što su bakrovi(II), srebrovi(I) i cinkovi(II) ioni, često se koriste u biomedicini zbog svojih terapijskih svojstava. Takvi ioni mogu imati dvojako djelovanje: poboljšavaju kemijsku i mehaničku stabilnost materijala uslijed stvaranja stabilnih kompleksa s funkcionalnim skupinama polimera (kao što su amino te hidroksilne skupine u kitozanu), te mogu utjecati na antimikrobno djelovanje materijala [33, 36, 45].

Bakrovi(II) ioni ostvaruju snažne interakcije s ligandima, tj. drugim molekulama ili ionima koji sadrže atome kisika, dušika i sumpora, upravo zbog svoje elektronske konfiguracije (slobodnih elektronskih orbitala). U trenutku stvaranja fizikalnih interakcija između metalnih iona s odgovarajućim ligandima, dolazi do međudjelovanja elektronskih orbitala između metala i liganda. Metalni ion privlači ligand putem elektrostatskih sila što rezultira stvaranjem stabilnog koordinacijskog kompleksa u kojem je metalni ion u centru strukture okružen ligandima, pri čemu oblik i stabilnost kompleksa ovise o broju i vrsti liganda koji su prisutni [46, 47].

Tijekom stvaranja kelata između bakrovih(II) iona i funkcionalnih skupina kitozana slobodni elektronski par dušika u amino skupinama kitozana ostvaruju elektrostatske

interakcije s ionima bakra. Moguća su dva modela koordinacijskih kompleksa bakra(II) i kitozana (slika 9): „model mosta“ gdje metalni ioni ostvaruju interakcije s dvije amino skupine iz istog lanca ili iz različitih lanaca, preko inter- i intramolekulskog kompleksiranja te „model privjeska” u kojem metalni ion ostvaruje interakciju samo s jednom amino skupinom iz jedne monomerne jedinice polimernog lanca. Atomi kisika iz –OH skupina i molekula vode mogu se uključiti u koordinaciju te dodatno stabilizirati nastali kompleks [46, 48].



Slika 9. Stvaranje kelata kitozana s bakrovim(II) ionima: model mosta (lijevo) i model privjeska (desno) [46, 48].

Za pripravu mikročestica na temelju kompleksa kitozana i bakrovih(II) iona, vrlo je važno pronaći pogodnu metodu jer to može utjecati na konačne rezultate i potencijalnu primjenu dobivenih mikročestica. S obzirom da mikročestice mogu biti pravilnog oblika (mikrosfere), također moguće je dobiti i mikročestice nepravilnog oblika te upravo zato važno je poznavati odabranu metodu dobivanja i procesne parametre.

S obzirom na postupke, moguće je klasificirati metode pripreme mikročestica kao elektrohidrodinamičko štrcanje, emulziju, mikroreaktor, metodama sušenja raspršivanjem te polimerizacijom. U novije vrijeme, najčešće korištene metode za pripravu mikročestica na temelju kitozana uključuju primjenu elektrohidrodinamičko štrcanja ili dobivanje iz emulzije. Te metode često imaju nestabilan prinos, dugotrajni su postupci i daju neujednačene veličine čestica sa širokom raspodjelom veličina [2, 11, 20, 31, 49].

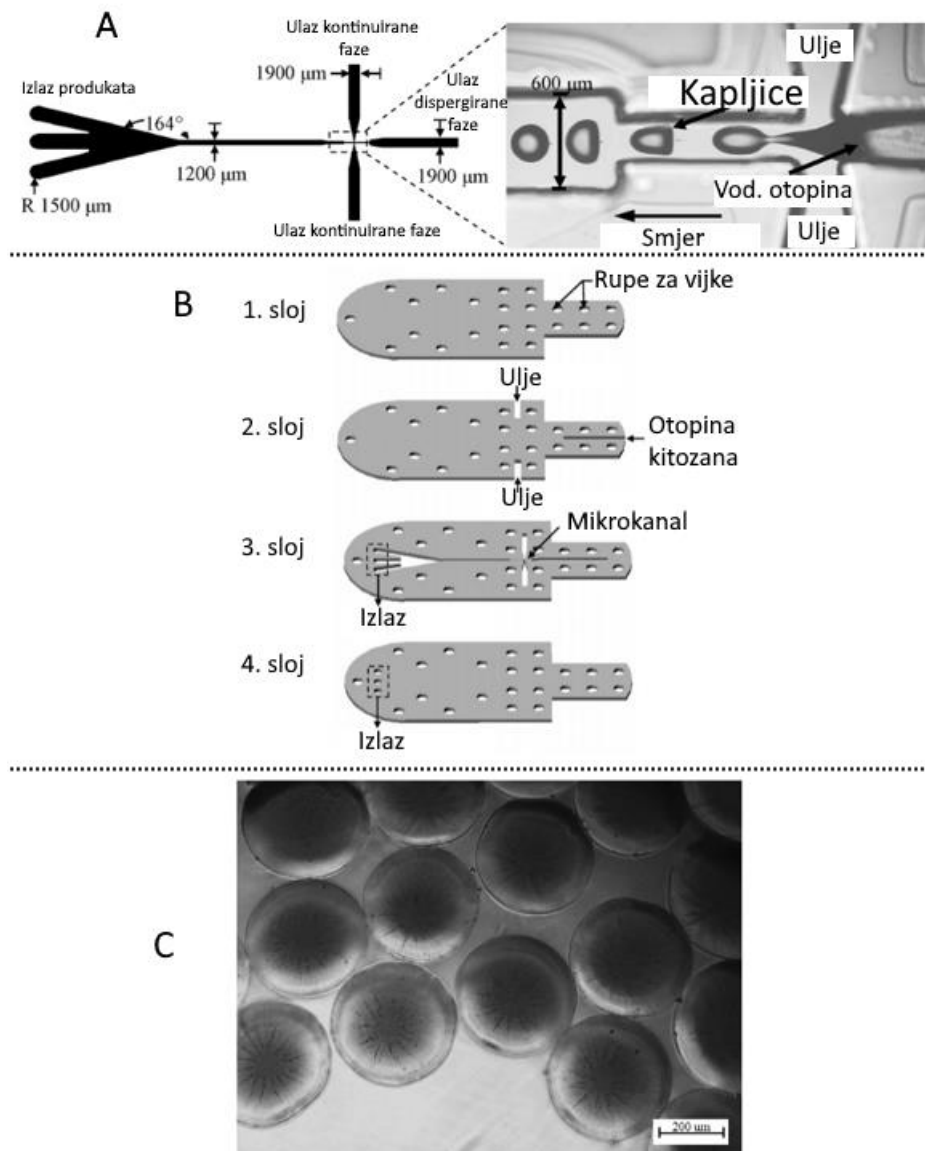
Kao alternativna metoda koja omogućava bolju manipulaciju raspodjele veličine čestica uz veći prinos sve više se koristi metoda upotrebe mikroreaktora za dobivanje mikročestica [31, 38, 50–52]. Stoga, u nastavku rada, dan je literaturni pregled upotrebe mikroreaktora za

dobivanje mikročestica na temelju kitozana, s naglaskom na vrstu korištenog mikroreaktora, reagens te primijenjene procesne parametre.

2.3. Literaturni pregled

Najveći problem prilikom pripreme mikročestica je dobiti monodisperznu raspodjelu veličina, međutim u radu Yang i suradnika [5] uspješno su dobivene mikročestice na temelju kitozana umreženoga s Na-TPP-om primjenom PMMA mikroreaktora s geometrijom poprečnog spoja mikrokanala (slika 10A). U radu je korištena 1 mas. % otopina kitozana srednje molekulske mase (40 kDa) kao vodena (dispergirana) faza, a jestivo suncokretovo ulje (55 mPa s) kao kontinuirana faza. Korišteni mikroreaktor bio je sastavljen od četiri zasebna sloja međusobno spojena vijcima (slika 10B). Transportirane kapljice na izlazu iz mikroreaktora dolaze do površine otopine za umreživanje (otopina Na-TPP). Kapljice vodene faze reagiraju s $P_3O_{10}^{5-}$ ionima na granici između uljne i vodene faze te se spontano talože na dnu kolektora uslijed razlike u gustoći. Nakon 20 minuta očvršćivanja u Na-TPP otopini, uočavaju se mikročestice TPP-kitozana. Brzine protoka vodene i uljne faze bile su 0,012 i 1,800 mL min⁻¹. Pri tome je vodena faza komprimirana silom smicanja u oblik strijele te razdvojena u kapljice promjera oko 210 μm (slika 10A). Dobivene mikrosfere na kraju procesa bile su promjera 360 ± 15 μm i vidljive su na slici 10C.

Autori su također zamijetili da se različitom brzinom protoka dobiva različita raspodjela veličina mikročestica. Rezultati ukazuju da pri konstantnoj brzini vodene faze dolazi do smanjenja veličine mikrosfera povećanjem prosječne brzine protoka ulja. Drugim riječima, pri konstantnoj brzini uljne faze, povećanjem brzine protoka vodene faze dolazi do povećanja veličine mikročestica. Također, primijećeno je da kapljice ne nastaju kada je omjer brzine protoka kontinuirane i dispergirane faze između 16:1 i 100:1 [5].



Slika 10. Shematski prikaz geometrije mikroreaktora: (A) dimenzije mikroreaktora te nastanak kapljica u mikrokanalima, (B) višeslojna izvedba mikroreaktora. (C) Mikrografija dobivenih kitozanskih mikročestica u 10 mas. % otopini Na-TPP prije sušenja [5].

U novijem radu Yang i suradnika [34] prikazana je uporaba iste geometrije spoja mikrokanala za izradu kompozita nanočestica srebra i kitozana (CHT-Ag). U radu je korišten PMMA mikroreaktor jednake izvedbe kao u prethodnom radu, s razlikom da se mikroreaktor sastojao od tri sloja PMMA pločica na koje su urezani mikrokanali. Međutim, za pripremu kompozitnih mikročestica koristili su suspenziju srebrovih nanočestica (AgNO_3) u otopini različitih koncentracija kitozana srednje molekulske mase (150 kDa). Rezultati ukazuju da se veličina čestica povećavala s koncentracijom kitozana, ali i smanjivala povećanjem koncentracije otopine za geliranje u kolektoru (NaOH) pri konstantnoj brzini protoka

dispergirane i kontinuirane faze (podatci vidljivi u tablici 1). Stoga, moguće je zaključiti da se veličina čestica može regulirati brzinom protoka i koncentracijom kitozana ili umreživala. Autori pretpostavljaju da veličina čestica varira ovisno o koncentraciji otopine kitozana jer koncentrirana otopina kitozana ima veću viskoznosti što utječe na smičnu silu u mikrokanalima. Također, povećanjem koncentracije otopine NaOH dolazi do povećanja osmotskog tlaka i difuzibilnosti otopine, što rezultira redukcijom veličine kompozitnih čestica.

Tablica 1. Odnos između prosječne veličine dobivenih CHT-Ag kompozitnih čestica i koncentracije otopina kitozana i NaOH. *RSO* predstavlja relativno standardno odstupanje [34].

Otopina CHT (mas. %)	Otopina NaOH (mas. %)	Veličina mikročestica	
		Prosječna veličina (μm)	<i>RSO</i> (%)
1	10	353,4	2,2
	20	335,1	2,1
	30	310,9	2,6
1,5	10	361,5	2,0
	20	345,2	2,0
	30	320,7	2,3
2	10	377,3	2,4
	20	357,3	2,2
	30	327,5	2,8

Mikroreaktorom s geometrijom poprečnog spoja mikrokanala izrađenog pomoću mikrogloodalice s umetnutom teflonskom kapilarom promjera 0,5 mm moguće je pripremiti kitozanske mikročestice s uskom raspodjelom veličina čestica. U radu Xu i suradnika [52] korištena je 2 mas. % otopina kitozana srednje molekulske mase (200 kDa), a kao kontinuirana faza korišten je *n*-oktan s dodatkom emulgatora (SPAN 80). Kao otopina za umreživanje korištena je kontinuirana faza uz dodatak glutaraldehyda. Rezultati tog rada ukazali su na to da je kontroliranjem vremena geliranja moguće pripremiti mikrosfere s tri različite strukture: porozna struktura, struktura jezgra-ljuska i čvrsta struktura. Autori pretpostavljaju da duljim izlaganjem difuziji molekula glutaraldehyda u unutrašnjost mikročestica dolazi do stvaranja sve debljeg čvrstog sloja ljuske na površini do potpuno očvrsele jezgre nastale umreživanjem kitozana i glutaraldehyda, što u konačnici rezultira potpuno čvrstom strukturom mikročestice.

Također, kontroliranjem protoka kontinuirane faze nastale su mikročestice prosječnog promjera od 55 do 135 μm [52].

Kao što je već rečeno, vrlo je važno poznavati sve čimbenike koji utječu na proces pripreme mikročestica kako bi se tijekom procesa moglo njima manipulirati te na taj način ostvariti što bolje rezultate, ovisno o uporabi konačnog proizvedenog materijala.

Prema pregledu literature, vidljivo je da je moguće izraditi mikroreaktor specifične geometrije spojnih elemenata kojim bi se, manipulacijom brzina protoka faza, mogle pripremiti mikročestice na temelju kompleksa kitozana i bakrovih(II) iona s užom raspodjelom veličine čestica i boljim prinosom materijala što ih čini pogodnim za upotrebu u sustavima za ciljanu dostavu lijekova. Stoga će u nastavku rada biti dan detaljan pregled procesa izrade mikroreaktora putem strojne obrade, modifikacija istog, te ispitivanja brzina protoka faza s ciljem dobivanja mikročestica temeljenih na kompleksima kitozana i bakrovih(II) iona.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Za pripravu otopine kompleksa kitozana i bakrovih(II) iona korištene kemikalije su:

- kitozan visoke čistoće (CHT) ; Chitoscience chitosan 85/200; stupanj deacetilacije 83,2 %; (Hepe Medical Chitosan GmbH; Halle (Saale), Njemačka),
- 1 %-tna octena kiseline (HAc) pripravljena razrjeđivanjem iz 99,8 %-tne otopine (Lach-Ner s.r.o., Tovarni, Republika Češka).
- bakrov(II) acetat monohidrat, $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times \text{H}_2\text{O}$; VWR International BDH; Leuven, Belgija)

Kao kontinuirana faza korišteno je jestivo suncokretovo ulje (S-Budget).

Korišten je emulgator SPAN 85, $\text{C}_{60}\text{H}_{108}\text{O}_8$ (Merck KGaA, Njemačka).

Za pripremu otopina u kolektoru korišteni su:

- natrijev hidroksid (NaOH; Honeywell, Seelze, Njemačka),
- etanol (EtOH; LabExpert, KEFO d.o.o., Ljubljana, Slovenija).

Tijekom procesa sušenja dobivenih mikročestica korišten je aceton (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska).

Svi korišteni reagensi su analitičkog stupanja čistoće, a za pripravu vodenih otopina korištena je demineralizirana voda (dH_2O).

Pri procesu izrade mikroreaktora korišteni su :

- pločica na temelju poli(metil-metakrilata) (PMMA), dimenzija $100 \times 100 \times 5$ mm
- metalne pločice
- vijci M 5×30 mm
- glodalica

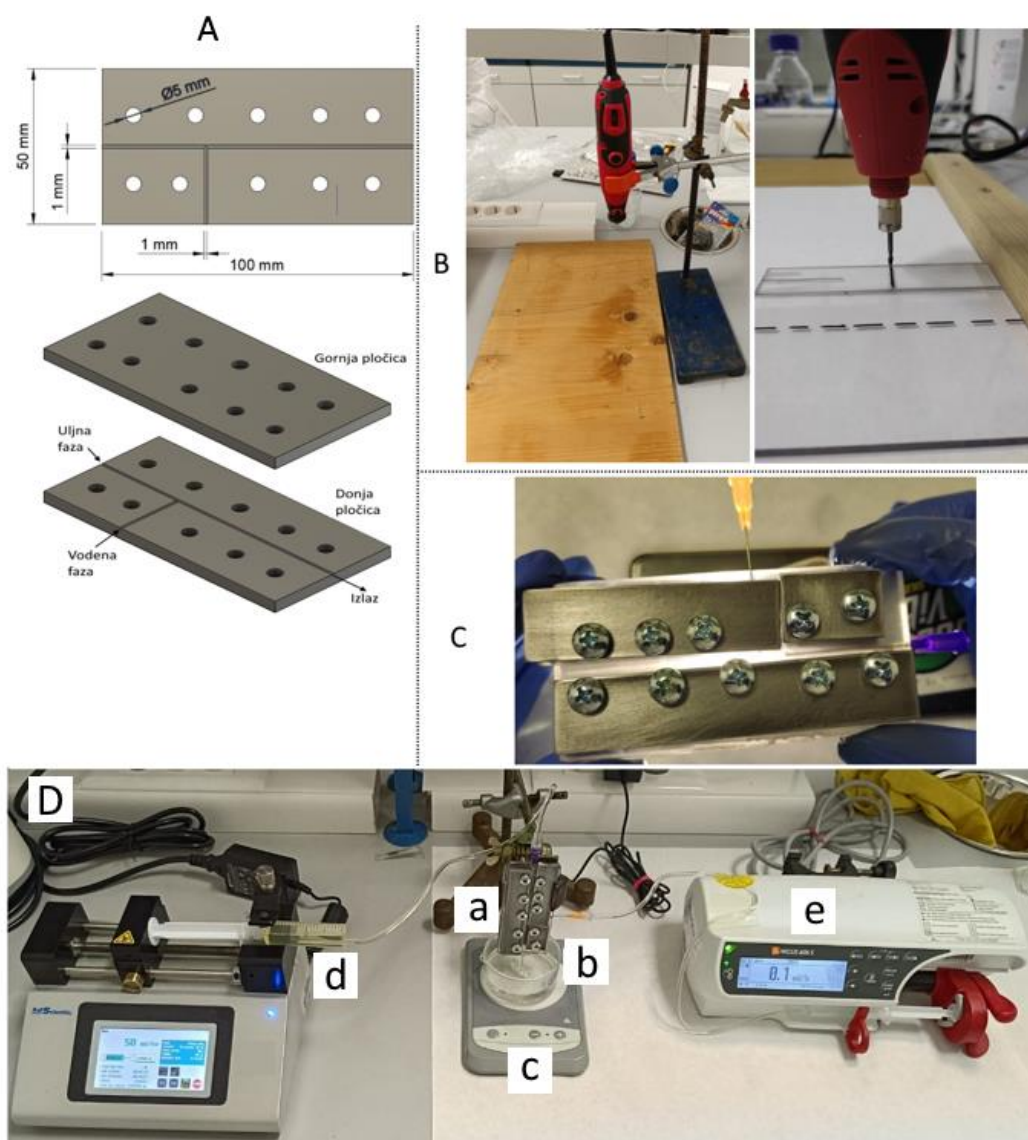
3.2. Proces izrade mikroreaktora

U ovom radu odabrana je i korištena geometrija poprečnog spoja (T-spoj) dimenzija prikazanih na shemi slike 11A. Za izradu mikroreaktora korištena je tehnika strojne obrade površine PMMA pločice pomoću glodalice prikazane na slici 11B. Od početne PMMA pločice dimenzija 100×100 mm izrađena su dva jednaka dijela (50×100 mm) koji su služili za izradu dvoslojnog

mikroreaktora. Na donju pločicu su pomoću glodalice urezani mikrokanali promjera $940 \pm 50 \mu\text{m}$. Mikrokanali su obrušeni brusnim papirom granulacija 800, 1000 i 1200 te očišćeni 70 %-tnim EtOH i dH₂O.

Potom su izbušene rupe za vijke koje su služile za povezivanje (stezanje) dva sloja mikroreaktora. Korišteno je ukupno 10 vijaka promjera 5 mm koji su stegnuti zajedno s čeličnim pločicama kako ne bi došlo do izlivanja faza između slojeva. Korištena aparatura za dobivanje mikročestica uz izrađeni mikroreaktor prikazana je na slici 13D.

Cjelokupna izrada mikroreaktora te primjena napravljenog mikroreaktora za dobivanje mikročestica dana je u videu; URL link i QR kod u *Prilogu* ovoga rada.



Slika 11. (A) Shematski prikaz mikroreaktora s dimenzijama. (B) Korištena glodalica i dio aparature korišten pri izradi mikroreaktora. (C) Napravljeni mikroreaktor s metalnim iglama

različitih promjera: ljubičasta igla je unutarnjeg promjera 21 G, a narančasta 23 G. (D)

Aparatura za pripremu mikročestica CHT-Cu primjenom mikroreaktora: *a* označava mikroreaktor, *b* kolektor s otopinom za umreživanje, *c* magnetska miješalica, *d* pumpa sa špricom za kontinuiranu (uljnu) fazu, te *e* pumpa sa špricom za dispergiranu (vodenu) fazu.

3.3. Priprava otopina

Početna 1 mas. % otopina kitozana pripravljena je otapanjem polimernog praha u 1 vol. %-tnoj HAc tijekom 24 sata pri sobnim uvjetima. Dobivena otopina kitozana zatim je filtrirana kako bi se uklonile moguće nečistoće i netopivi dijelovi.

Potom je pripremljena otopina bakrovih(II) iona s obzirom na zadani množinski omjer metalnih iona i amino skupina u kitozanu, $n(-\text{NH}_2):n(\text{Cu}^{2+}) = 1:0,0915$. Otopina kompleksa CHT-Cu pripremljena je miješanjem odgovarajućeg volumena otopine kitozana s otopinom Cu^{2+} iona uz zadržavanje volumnog omjera 7,33 uz miješanje 4 sata. To je dalo ~3 mas. % bakrovih(II) iona u konačnom materijalu. Navedeni se postupak temelji na protokolu iz literature [2].

Nadalje, pripremljene su otopine za dvije izvedbe kolektora: otopina $1,25 \text{ mol dm}^{-3}$ NaOH, te smjesa $1,25 \text{ mol dm}^{-3}$ otopine NaOH i 96 vol. % EtOH u volumnom omjeru 1:1. Otopina NaOH dobivena je otapanjem odgovarajuće količine NaOH mikroperli u demineraliziranoj vodi.

Za pojedine sustave, za dobivanje mikročestica korišten je dodatak emulgatora (SPAN 85) u kontinuiranu fazu. Emulgator je dodan u 2 vol. % udjelu u uljnu fazu te je smjesa homogenizirana uz miješanje 10 min pri temperaturi od 22 °C.

Tijekom procesa priprave mikročestica sve otopine su svježe pripremljene.

3.4. Priprava mikročestica

CHT-Cu mikročestice su dobivene primjenom mikroreaktora poprečnog spoja. Prvo su napunjene šprice (Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, Francuska) s 10 mL pripravljene otopine CHT-Cu kompleksa (dispergirana faza), odnosno uljne faze (kontinuirana faza). Kao kolektor je korištena kristalizerka s 50 mL $1,25 \text{ mol dm}^{-3}$ NaOH otopine ili 50 mL smjese NaOH/EtOH. Za održavanje zadanih protoka dispergirane i kontinuirane faze korištene su pumpe za kontinuiranu fazu KDS Legato 100 (Legato, Indija) i za dispergiranu fazu Codan Argus 606s (Codan, Njemačka), a korištene igle bile su promjera 21 G za uljnu fazu i 23 G za vodenu fazu.

Mikročestice dobivene primjenom mikroreaktora su pohranjene u epruvete zajedno s neutralizacijskim medijem tijekom 24 sata, nakon čega su isprane tri puta 50 %-tnom otopinom etanola uz izmjenu svakih 30 minuta. Uzorci su potom dehidrirani s 96 %-tnim etanolom uz izmjenu svakih 30 minuta (tri puta). Za sušenje mikročestica korišten je aceton uz tri izmjene svakih 20 minuta. Potom su mikročestice ostavljene pri sobnim uvjetima kako bi otapalo isparilo.

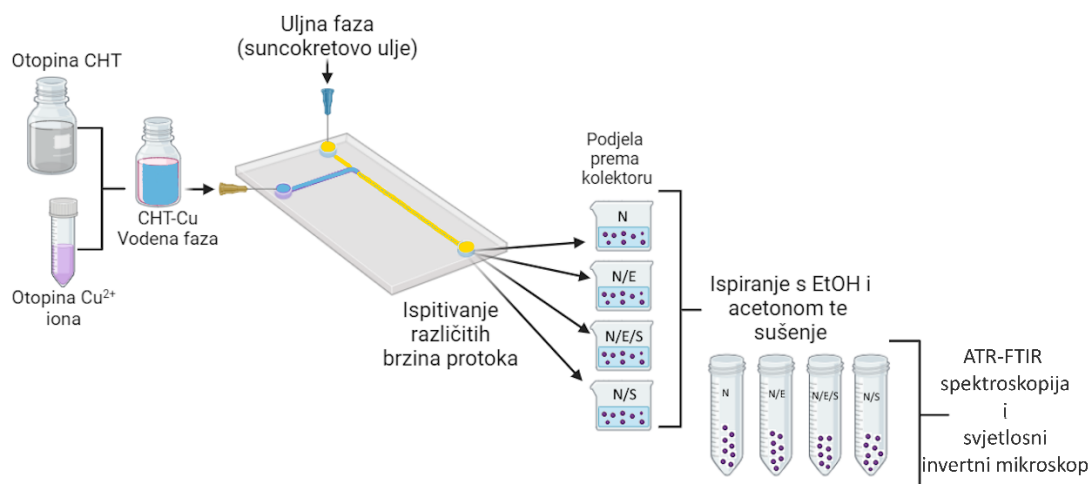
Oznake mikročestica određene su prema sastavu neutralizacijskog medija i prisutnosti emulgatora u kontinuiranoj fazi te su dane u tablici 2.

Tablica 2. Oznake dobivenih mikročestica prema korištenom neutralizacijskom mediju uz ili bez prisutnosti emulgatora (SPAN 85) u uljnoj fazi.

Oznaka	Sastav kolektora	Dodatak emulgatora u uljnoj fazi
N	1,25 mol dm ⁻³ otopina NaOH	Ne
N/E	1,25 mol dm ⁻³ otopina NaOH i 96 % EtOH u volumnom omjeru 1:1	Ne
N/E/S	1,25 mol dm ⁻³ otopina NaOH i 96 % EtOH u volumnom omjeru 1:1	Da
N/S	1,25 mol dm ⁻³ otopina NaOH	Da

Na slici 12 dan je shematski prikaz provedbe procesa dobivanja CHT-Cu mikročestica primjenom napravljenoga mikroreaktora.

Mikročestice na temelju kitozana (CHT) koristile su se kao kontrolni uzorci, a detaljan opis procesa dobivanja mikročestica primjenom mikroreaktora, kao i veličina i oblik dobivenih mikročestica, dani su u *Prilogu* ovog rada.



Slika 12. Tijek procesa pripreme mikročestica i primijenjene metode karakterizacije.

3.5. Ispitivani procesni parametri

U ovom radu, ispitan je utjecaj promjene brzine protoka pojedinih faza uz prilagodbe sastava otopine kolektora te potrebne modifikacije mikroreaktora kao i ispitivanje upotrebe emulgatora na dobivanje CHT-Cu mikročestica. U tablici 3 dane su vrijednosti ispitanih brzina protoka uljne i vodene faze.

Tablica 3. Brzine protoka uljne (kontinuirane faze) i vodene (dispergirane; otopina CHT-Cu kompleksa) faze te njihovi omjeri.

Kontinuirana faza (mL h ⁻¹)	Dispergirana faza (mL h ⁻¹)	Omjeri brzina protoka kontinuirane i dispergirane faze
20	5	4:1
10	1	10:1
100	10	
200	20	
10	0,1	100:1
20	0,2	
50	0,5	
50	0,1	500:1

3.6. Karakterizacija dobivenih mikročestica

3.6.1. Svjetlosni invertni mikroskop

Veličina i oblik mokrih i suhih CHT-Cu mikročestica istraženi su primjenom svjetlosnog invertnog mikroskopa (Olympus IX-83 s kamerom Hamamatsu ORCA-Flash 4.0) uz softver

za analizu slike CellSens, s vremenom ekspozicije od 500 ms i uvećanjem 4×. Za određivanje veličine čestica korišten je program ImageJ.

3.6.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

Za identifikaciju suhih mikročestica pri sobnoj temperaturi primijenjena je infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom prigušene totalne refleksije (ATR-FTIR) koristeći instrument Bruker Vertex 70 (Bruker Optics, Ettlingen, Njemačka). Raspon mjernog područja iznosio je od 4000 do 400 cm^{-1} , s 32 snimanja i spektralnom rezolucijom od 4 cm^{-1} .

4. REZULTATI I RASPRAVA

U eksperimentalnom dijelu rada je napravljen PMMA mikroreaktor u obliku T-spoja *de novo*. Kako bi se ispitala učinkovitost napravljenog mikroreaktora, pripravljena je otopina kitozan-Cu²⁺ kompleksa, za koju je literaturno pokazano da daje stabilne mikročestice dobivene iz emulzije i procesom elektroštrcanja [2, 3], te je ista korištena kao dispergirana faza. Veličina i oblik dobivenih CHT-Cu mikrogelova te suhih mikročestica istraženi su primjenom mikroskopije, dok je kemijski sastav suhih uzoraka istražen primjenom infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (ATR-FTIR spektroskopija).

4.1. Utjecaj parametara na dobivanje mikročestica

Nakon izrade mikroreaktora te sastavljanja aparature, započeto je s pripravom mikročestica na temelju kompleksa kitozana i bakrovih(II) iona (CHT-Cu) pri čemu se ispitivao utjecaj brzina protoka faza na nastajanje, kao i na veličinu nastalih mikročestica. Kao kontinuirana faza korišteno je suncokretovo ulje, a kao dispergirana faza korištena je CHT-Cu otopina. Kako bi nastale kapljice vodene faze u mikroreaktoru mogle zadržati sferičan oblik i u suhom stanju, kapljice CHT-Cu otopine je potrebno prevesti u mikrogelove. Za to se koriste kolektori s neutralizacijskim agensom – otopinom koja će u trenutku doticaja kapljice iz mikroreaktora stvoriti sloj gela na površini kapljice. Mikrogel nastaje ionskim umreživanjem pozitivno nabijenih amino skupina ($-NH_3^+$) kitozana i NaOH što rezultira stvaranjem mreže i stabilizacijom mikrogelova. Sloj gela se širi s površine prema unutra uslijed difuzije otopine kroz kapljicu. U trenutku kada cijela kapljica reagira s neutralizacijskim agensom i prijeđe u oblik gela, geliranje je završeno te nastaju mikrogelovi koji se potom suše kako bi se dobile konačne mikročestice [5].

U ovom radu, kao prva otopina u kolektoru je ispitana 1,25 mol dm⁻³ otopina NaOH (N) [2]. Kako bi se razbila površinska napetost uljne faze (čime dolazi do bržeg doticaja otopine kompleksa s otopinom natrijeva hidroksida), kao druga vrsta kolektora je korištena smjesa NaOH otopine s 96 vol. % EtOH (N/E).

U nastavku rada dan je pregled ispitivanja utjecaja brzina protoka kontinuirane i dispergirane faze na veličinu čestica te upotreba različitih sastava kolektora. Osim toga, uslijed problema nakupljanja kapljica kontinuirane faze (produkta) na izlazu iz mikroreaktora te prolasku kontinuirane faze između pločica mikroreaktora, bilo je potrebno provesti

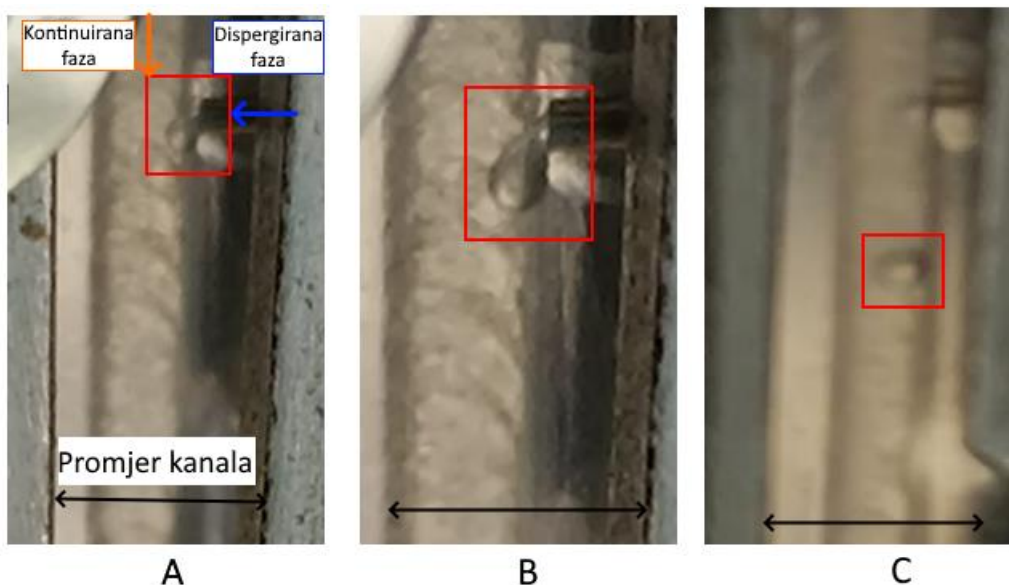
modifikacije mikroreaktora: upotreba metalne igle, direktnog uranjanja mikroreaktora u kolektor, nanošenja teflonskog sloja i upotreba polimernog crijeva na izlazu.

Nadalje, ispitan je i utjecaj emulgatora (SPAN 85) na oblik i veličinu mikročestica te su uzorci pripremljenih mikročestica podijeljeni prema korištenom neutralizacijskom mediju, uz ili bez prisutnosti emulgatora u uljnoj fazi. Uzorci koji su dobiveni u kolektoru s $1,25 \text{ mol dm}^{-3}$ NaOH uz prisutnost emulgatora u kontinuiranoj fazi označeni su kao N/S, a ukoliko je kolektor bila otopina NaOH i EtOH, uz prisutnost emulgatora u kontinuiranoj fazi, uzorci su označeni kao N/E/S. Nakon svakog pokušaja dobivanja mikročestica, dobivenim mikrogelovima je istražen oblik i veličina primjenom svjetlosnog mikroskopa.

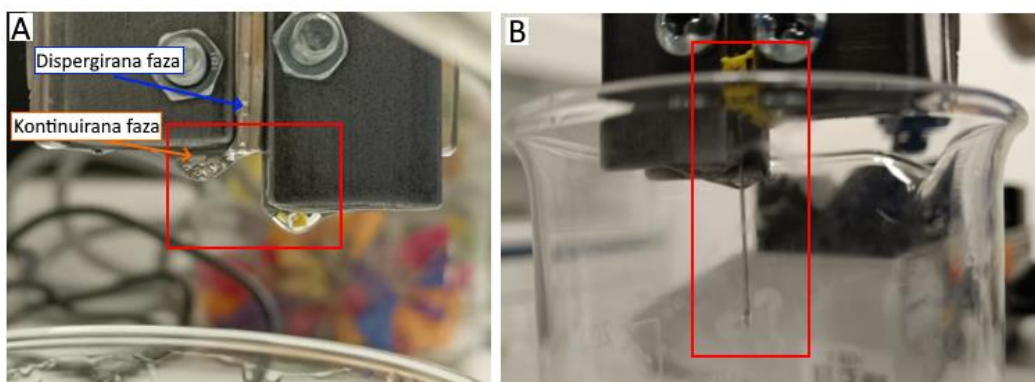
4.1.1. Proces pripreve CHT-Cu mikročestica

Kako bi se ispitalo gibanje otopina kroz mikrokanale mikroreaktora, odnosno ustanovilo mogu li se održati stabilni tokovi faza kroz mikroreaktor, prvo su primijenjene brzine protoka uljne i vodene faze 10:1 mL h^{-1} u omjeru 10:1 pri čemu je korištena $1,25 \text{ mol dm}^{-3}$ NaOH kao otopina za geliranje. Pri tim uvjetima, nije došlo do stvaranja dispergiranih kapljica vodene faze u kontinuiranoj, već su se uspostavila dva paralelna protoka. Prema literaturi [5], kapljice ne mogu nastati kada je omjer brzine protoka kontinuirane i dispergirane faze veći od 16:1, odnosno manje od 100:1. Stoga, ispitano je dobivanje CHT-Cu kapljica (dispergirane faze) uz omjer brzina protoka kontinuirane i dispergirane faze od 100:1 (10 i 0,1 mL h^{-1}). Pri tome je ponovno korištena NaOH otopina (N) kao neutralizacijski medij. Uporabom ovih brzina protoka, bilo je moguće dobiti vidljive dispergirane kapljice otopine CHT-Cu kompleksa u kontinuiranoj fazi (slika 13). Proces stvaranja dispergirane kapljice je tekao vrlo polaganim istjecanjem vodene faze na vrhu igle, a pri kritičnom volumenu, uslijed djelovanja brže, uljne faze, dolazi do otkidanja kapljice. Kapljice su nastajale u jednakim vremenskim intervalima i nošene su prema izlazu mikroreaktora. Također, tijekom eksperimenta, u mikroreaktoru je bilo moguće vidjeti golim okom nastanak sferičnih kapljica koje se u trenutku doticaja s neutralizacijskim medijem u kolektoru deformiraju.

Nadalje, uslijed jakih kapilarnih sila te površinske napetosti kontinuirane faze došlo je do nakupljanja uljne faze s nastalim kapljicama vodene faze (produktom) na izlazu iz mikroreaktora (slika 14A), a što je otežavalo neutralizaciju polimerne otopine u doticaju s površinom medija za geliranje. Kako bi se spriječilo daljnje nakupljanje uljne faze, bilo je potrebno provesti prvu modifikaciju mikroreaktora. Za to je korištena metalna igla stavljena s bočne strane mikroreaktora (slika 14B).



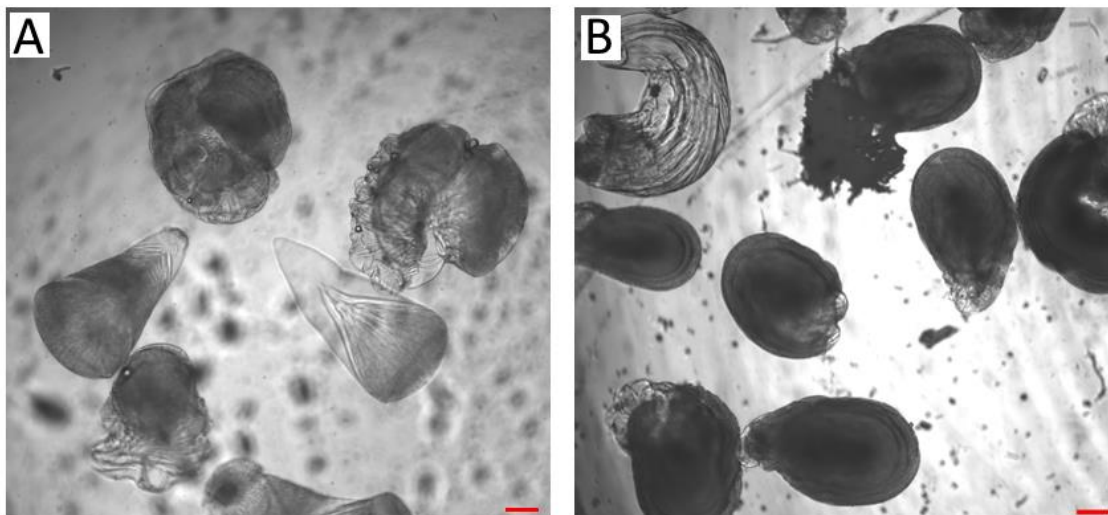
Slika 13. Proces stvaranja dispergiranih kapljica CHT-Cu otopine u kontinuiranoj fazi. (A) stvaranje kapljice CHT-Cu otopine, (B) postupno odnošenje kapljice, i (C) otkinuta kapljica CHT-Cu otopine koja prolazi kroz mikroreaktor u kontinuiranoj fazi.



Slika 14. (A) Prikaz nakupljanja uljne faze u koju su uklopljene kapljice dispergirane faze. (B) Modifikacija mikroreaktora dodatkom metalne igle.

Uvođenje igle kojom se brže odvodi produkt iz mikroreaktora te dovodi u kontakt s neutralizacijskim medijem, rezultiralo je stvaranjem mikročestica nepravilnog oblika (slika 15A). Kako bi se dobile čestice pravilnijeg oblika uz povećan prinos, brzine protoka kontinuirane i dispergirane faze povećane su na 20:5 mL h⁻¹ (omjer brzina faza od 4:1). Takav omjer, prema literaturi [5] bi trebao biti stabilan za nastanak kapljica dispergirane faze u mikrokanalima. Uporaba nižeg omjera brzina protoka rezultirala je stvaranjem nepravilnih (mikro)čestica (slika 15B). Kao otopina za geliranje, korištena je 1,25 mol dm⁻³ NaOH.

U radu Yang i suradnika [5], promjer mikrokanala iznosio je 1200 μm , dok mikroreaktor u ovom radu ima promjer kanala $940 \pm 50 \mu\text{m}$. Na temelju toga, moguće je pretpostaviti da osim omjera brzina protoka, na nastanak dispergirane faze u kontinuiranoj, ključnu ulogu igra i veličina (promjer) mikrokanala.

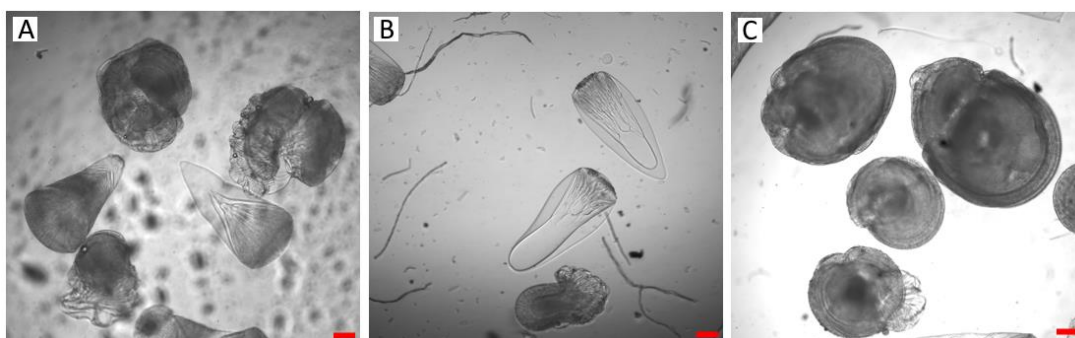


Slika 15. CHT-Cu mikrogelovi dobiveni pri brzinama protoka uljne i vodene faze: (A) 10 i 0,1 mL h^{-1} , odnosno (B) 20 i 5 mL h^{-1} . Korišteni neutralizacijski medij je 1,25 mol dm^{-3} NaOH otopina. Uvećanje iznosi 4 \times , a skala predstavlja 200 μm .

Nadalje, s obzirom na to da pri nižem omjeru brzina protoka (4:1) ne nastaju mikročestice pravilnijih oblika, pretpostavljeno je da je uzrok nastanka nepravilnih mikročestica otežana difuzija OH^- iona kroz uljnu fazu, a što u konačnici rezultira deformacijom oblika mikrogelova. Stoga, kako bi se razbila površinska napetost uljne faze, čime dolazi do bržeg doticaja otopine natrijeva hidroksida s otopinom kompleksa [53], odlučeno je koristiti smjesu NaOH otopine s 96 vol. % EtOH (N/E). Primijenjeni omjer brzina protoka iznosio je 100:1 (brzine protoka kontinuirane i dispergirane faze bile su 10 i 0,1 mL h^{-1}). Uporabom ovih procesnih parametara, nastajali su CHT-Cu mikrogelovi izrazito nepravilnog oblika (slika 16A), uz slab prinos. Mogući razlog nastanka izrazito nepravilnih mikrogelova je nizak prinos nastalih kapljica u mikrokanalima, što je značilo da na izlazu iz mikroreaktora akumulirani volumen u većem udjelu sadržava samo ulje, bez dispergirane faze. Time pak dolazi do kapanja čistog ulja na površinu otopine za neutralizaciju, što izrazito onemogućava difuziju otopine NaOH do kapljice dispergirane faze što uzrokuje ravnomjerno umreživanja CHT-Cu mikrogelova.

Kako bi se ispitao utjecaj brzine protoka na prinos, odlučeno je povećati brzine zadržavajući jednak omjer na 20:0,2 mL h⁻¹. Kao što je na slici 16B vidljivo, veće brzine protoka nisu utjecale na oblik nastalih (mikro)gelova. S duge strane, prinos se povećao i nastajalo je više kapljica dispergirane faze duž mikrokanala koje su se nakupljale na izlazu i sporo otkidale unatoč upotrebi metalne igle. Kako bi se riješilo sporo otkidanje produkta, odlučeno je dodatno povećati brzine protoka faza uz zadržavanje omjera brzina protoka.

Stoga su primijenjene brzine protoka kontinuirane/dispergirane faze od 50:0,5 mL h⁻¹. Na slici 16C vidljivo je da nastaju mikrogelovi pravilnijeg oblika u odnosu na prethodno dobivene mikročestice pri nižim brzinama protoka kontinuirane/dispergirane faze.

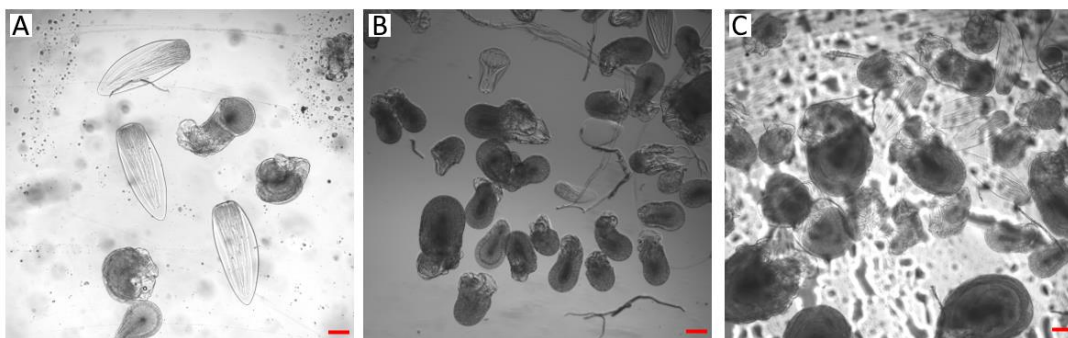


Slika 16. Nastali CHT-Cu mikrogelovi u N/E kolektoru dobivene pri brzinama protoka uljna/vodena faza: (A) 10:0,1 mL h⁻¹; (B) 20:0,2 mL h⁻¹; (C) 50:0,5 mL h⁻¹. Uvećanje je 4×, a skala predstavlja 200 μm.

Međutim, pri višim brzinama protoka od 20:0,2 mL h⁻¹, nastaju mikročestice veće u odnosu na mikročestice dobivene pri 10:0,1 mL h⁻¹ i 20:0,2 mL h⁻¹. Također, akumulirani volumen nedovoljno brzo otkidao s igle i time bi volumen uljne faze s dispergiranim kapljicama sporo kapao u neutralizacijski medij, što bi rezultiralo sporom difuzijom NaOH otopine kroz ulje do kapljica dispergirane faze. Kako bi se pripravili mikrogelovi manji od 1000 μm te riješio problem nakupljanja produkta na izlazu iz mikroreaktora, u sljedećem koraku je ispitano direktno uranjanje mikroreaktora u otopinu za geliranje.

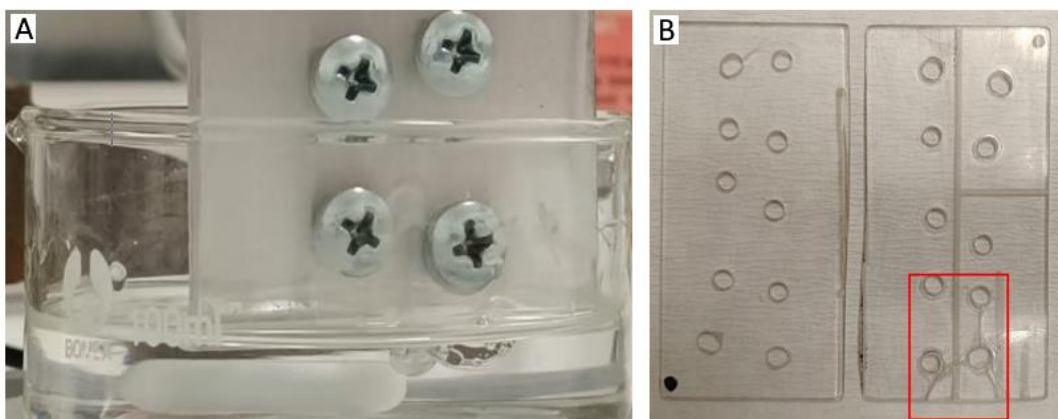
Kako bi se spriječila neželjena kontaminacija neutralizacijskog medija metalnim ionima iz korištenih čeličnih pločica (koje služe za stabilizaciju i učvršćivanje slojeva mikroreaktora), a time i krajnjih CHT-Cu mikročestica, prije uranjanja mikroreaktora u otopinu kolektora, pločice su uklonjene. Kako bi se potvrdilo da u omjer brzina kontinuirane/dispergirane faze ovisi o veličini mikrokanala, proveden je eksperiment u kojem je korišten omjer brzina 10:1, uz direktno uranjanje mikroreaktora u otopinu za neutralizaciju.

Stoga, proveden je eksperiment u kojem su korištene brzine kontinuirane/dispergirane faze bile $100:10 \text{ mL h}^{-1}$, a kao neutralizacijski medij korišten je sustav N/E. Dobiveni mikrogelovi bili su nepravilnog izgleda te su vidljivi na slici 17A. Uslijed uporabe mikroreaktora bez metalnih pločica, primijećeno je izlivanje kontinuirane faze između slojeva mikroreaktora te je mikroreaktor dodatno modificiran, odnosno, provedena je modifikacija površine mikroreaktora primjenom teflonskog spreja.



Slika 17. Mikrografije CHT-Cu mikrogelova nastalih (A) uranjanjem mikroreaktora u medij za neutralizaciju uz brzine protoka kontinuirane i dispergirane faze od $100:10 \text{ mL h}^{-1}$, odnosno primjenom mikroreaktora s obrađenom površinom (teflonska obloga) uz omjer brzina protoka uljne i vodene faze od (B) $100:10 \text{ mL h}^{-1}$, i (C) $200:20 \text{ mL h}^{-1}$. Uvećanje je $4\times$, a skala predstavlja $200 \mu\text{m}$.

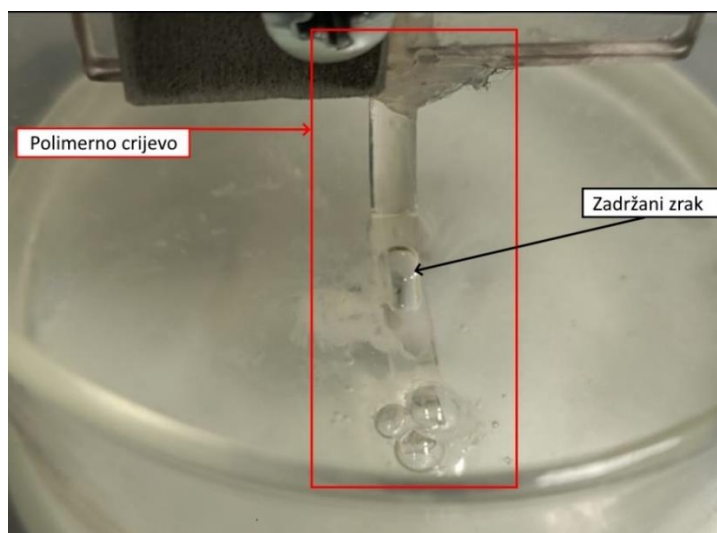
Nakon čišćenja PMMA pločica 70 vol. % etanolom i dH_2O , na suhe pločice nanosen je tanki sloj teflonske obloge pri čemu je došlo do zamućenja površine pločice te gubitka providnosti (slika 18A). Kako bi se ispitalo utjecaj provedenih modifikacija na nastanak dispergirane faze u kontinuiranoj, te konačno dobivanje CHT-Cu mikrogelova, primijenjeni su sljedeći uvjeti: brzine protoka kontinuirane i dispergirane faze iznosile su 100 i 10 mL h^{-1} (kako bi se osigurao dovoljan prinos dispergirane faze), a $1,25 \text{ mol dm}^{-3}$ NaOH otopina je korištena kao medij za neutralizaciju. Tijekom sastavljanja mikroreaktora u ovom procesu, odnosno stezanjem PMMA slojeva mikroreaktora bez upotrebe metalnih pločica, došlo je do oštećenja pločica vidljivih na slici 18B.



Slika 18. (A) Prikaz upotrjebljene modifikacije površine mikroreaktora nanošenjem teflonskog sloja s direktnim uranjanjem u medij za neutralizaciju, i (B) oštećenje donjeg dijela mikroreaktora uslijed direktnog stezanja vijcima.

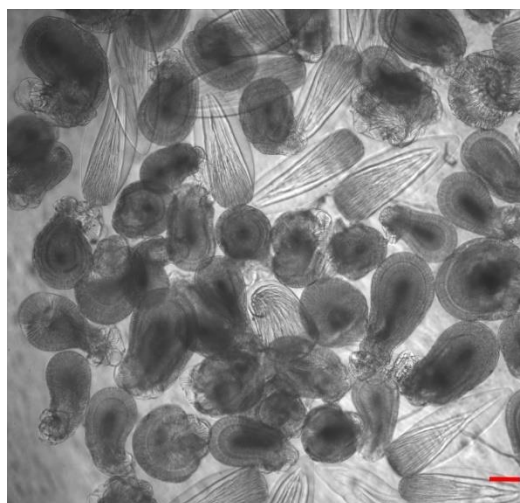
Mikrogelovi dobiveni uronjenim mikroreaktorom u kolektor pri brzinama protoka kontinuirane i dispergirane faze od $100:10 \text{ mL h}^{-1}$ te ponovnim provođenjem procesa pri istim brzinama protoka nakon nanošenja teflonskog sloja, vidljive su na slikama 18A i 18B. Usporede li se te dvije mikrografije, vidljivo je da teflonski sloj nema utjecaja na veličinu i oblik mikrogelova. S obzirom da promjena površine mikrokanala ne utječe na veličinu i oblik mikročestica, odlučeno je ispitati utjecaj promjene brzina protoka kontinuirane i dispergirane faze, zadržavajući omjer brzina protoka od $100:1$. Upotrjebljeni su protoci faza $200:20 \text{ mL h}^{-1}$, pri čemu je upotrjebljena modifikacija površine teflonskim slojem te je mikroreaktor bio direktno uronjen u otopinu za neutralizaciju. Dobiveni mikrogelovi vidljivi su na slici 18C, pri čemu je moguće zaključiti da niti povišenjem brzina protoka faza, uz direktno uranjanje mikroreaktora s nanesenim teflonskim slojem, nema znatnije promjene veličine niti oblika dobivenih mikročestica. Također, u konačnici moguće je zaključiti da omjer brzina kontinuirane i dispergirane faze ovisi o konkretnom mikroreaktoru, ali i da je moguće dobiti mikročestice uporabom omjera brzina predloženim u literaturi [5].

Kao što je već spomenuto, uslijed direktnog stezanja slojeva mikroreaktora bez upotrebe metalnih pločica, došlo je do oštećenja jedne od pločica mikroreaktora, stoga je u nastavku istraživanja izlaz mikroreaktora modificiran dodatkom PVC crijeva (uz upotrebu metalnih pločica) (slika 19).



Slika 19. Modifikacija izlaza mikroreaktora upotrebom crijeva.

Međutim, bilo je potrebno ispitati utječe li uporaba crijeva na veličinu čestica u istom mediju za neutralizaciju; N/E. Stoga je ponovljen proces pripreme mikročestica pri brzinama protoka uljne i vodene faze od 100:10 mL h⁻¹, a rezultati su vidljivi na mikrografijama 18A i 20. Usporede li se mikrografije mikročestica dobivenih uranjanjem mikroreaktora u kolektor i mikročestice dobivene uporabom polimernog crijeva, vidljivo je da nema razlike u veličini i obliku. Stoga, odlučeno je da će se koristiti crijevo kao modifikacija za bolje otjecanje produkta u sustav za geliranje u daljnjim ispitivanjima. Upotreba crijeva poboljšala je otjecanje kontinuirane faze s kapljicama dispergirane faze u otopinu za neutralizaciju (slika 19).

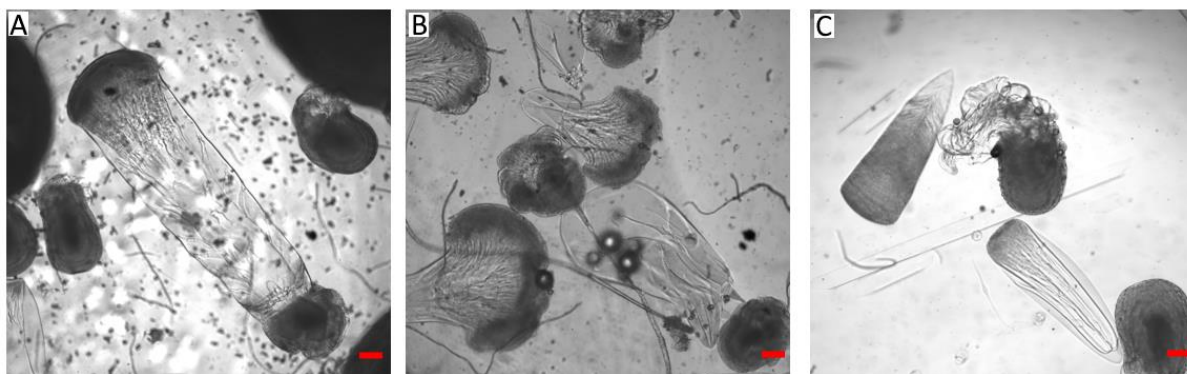


Slika 20. Mikrogelovi dobiveni brzinama protoka kontinuirane i dispergirane faze 200:20 mL h⁻¹ u otopini za geliranje nastale pri upotrebi PVC crijeva. Uvećanje na mikrografiji iznosi 4×, a skala predstavlja 200 μm.

U konačnici, vidljivo je da nastali mikrogelovi nemaju pravilan oblik bez obzira na upotrijebljene brzine protoka i omjere, kao niti primijenjene modifikacije samog reaktora. U konačnici, moguće je zaključiti da je upotrebom omjera brzina faza manjim od 16:1 moguće pripremiti mikrogelove. Prema literaturi [52], moguće je uporabom emulgatora dobiti sferične mikročestice, ali višim omjerom brzina faza od 100:1. Stoga, kako bi kapljice dispergirane faze zadržale sferičan oblik i nakon procesa neutralizacije, u nastavku rada je ispitan utjecaja dodatka emulgatora na oblik i veličinu mikročestica uz upotrebu omjera brzina većeg od 100:1.

4.1.2. Ispitivanje utjecaja emulgatora

Ispitivanje utjecaja promjene brzine kontinuirane i dispergirane faze i njihovih omjera te modifikacija mikroreaktora, ukazalo je da nema utjecaja na veličinu i oblik nastalih (mikro)čestica. Prema literaturi [49, 52], na oblik i veličinu mikročestica moguće je utjecati upotrebom emulgatora. Kao što je već spomenuto, prema literaturi [5] uporabom omjera brzina kontinuirane/dispergirane faze veće od 100:1 trebalo bi doći do uspostave stabilnih tokova kapljevina koji bi stvarali kapljice dispergirane faze. Stoga, odlučeno je ispitati viši omjer brzina faza od 100:1 kao i utjecaj dodatka emulgatora (SPAN 85) na oblik i veličinu nastalih CHT-Cu mikrogelova. Prvo je ispitan omjer brzina kontinuirane i dispergirane faze utjecaj u sustavu za geliranje N/E koristeći se brzinama protoka uljne i vodene faze 500 i 0,1 mL h⁻¹ (omjer 500:1), a potom je ispitan utjecaj dodatka emulgatora pri istim uvjetima te upotrebu otopine NaOH (N) i smjese s etanolom (N/E). Prema mikrografiji 21A, vidljivo je da je moguće pripremiti mikročestice koristeći se višim omjerom, što se slaže s literaturom [5] te da i takvi mikrogelovi nemaju pravilan oblik. Vizualnom usporedbom CHT-Cu mikrogelova dobivenih pri istim uvjetima, ali bez prisustva emulgatora u kontinuiranoj fazi, rezultati ovog provedenog ispitivanja ukazuju na to da dodatak emulgatora nije imao znatnijeg utjecaja na oblik i veličinu nastalih mikrogelova (mikrografije 21A i B). Također, usporedbom mikrografija 21B i C, moguće je zaključiti da pri istim brzinama protoka, no upotrebom različitih medija za neutralizaciju, moguće je dobiti mikrogelove jednakog veličinskog razreda te da dodatak 96 vol. % EtOH ne čini razliku s obzirom na veličinu i oblik dobivenih mikrogelova.



Slika 21. Mikrogelovi u otopinama za geliranje nastale pri brzinama protoka $50:0,1 \text{ mL h}^{-1}$ uz uporabu 2 % SPAN 85 u sustavima za geliranje: (A) $1,25 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaOH}$ i 96 % EtOH (B) $1,25 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaOH}$. Uvećanje je $4\times$, a skala predstavlja $200 \text{ }\mu\text{m}$.

4.2. Određivanje veličine mikrogelova

Kako bi se točnije odredila veličina i oblik dobivenih mikročestica u otopinama za neutralizaciju, provedena je analiza veličine mikročestica. Veličina mikrogelova u otopinama za geliranje određivana je na temelju mikrografija dobivenih primjenom svjetlosnog mikroskopa, a prema ilustraciji na slici 22 promatrane su dimenzije nastalih mikročestica. Pripravljenim mikrogelovima određena je dužina i širina, te omjer L/d koji predstavlja odnos dužine i širine, ukazujući na sferičnost nastalih čestica – ukoliko taj odnos iznosi 1, nastali mikrogelovi su sferičnoga oblika. Dimenzije su određene na temelju 10-15 mikrogelova po ispitivanom sustavu. U tablici 4 su prikazani rezultati provedene analize određivanja dimenzija nastalih CHT-Cu mikrogelova u mediju za neutralizaciju (dani kao srednja vrijednost korigirana sa standardnom devijacijom).



Slika 22. Ilustracija mjerenja dužine i širine dobivenih nepravilnih mikročestica.

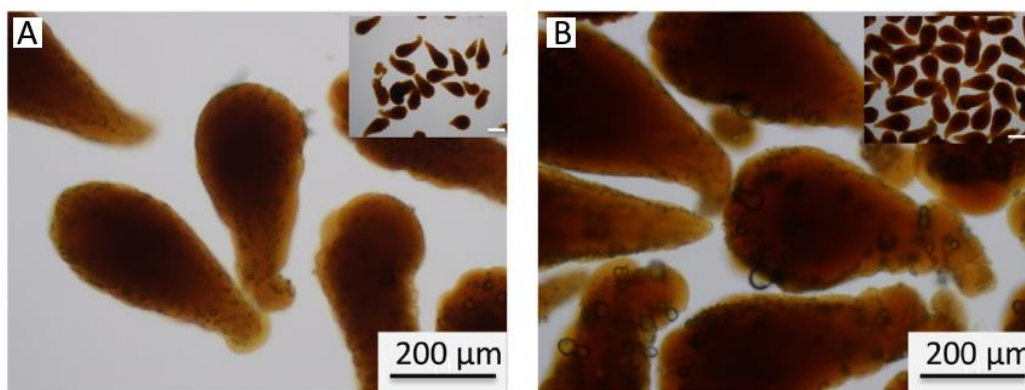
Tablica 4. Određene vrijednosti širina i dužina CHT-Cu mikrogelova dobivenih primjenom mikroreaktora uz različite ispitane modifikacije mikroreaktora: (a) mikroreaktor s dodatkom metalne igle, (b) primjena teflonskog sloja, (c) uranjanje mikroreaktora u neutralizacijski medij, te (d) upotreba crijeva.

Vrsta modifikacije mikroreaktora	Sustav	Uljna faza (mL h ⁻¹)	Vodena faza (mL h ⁻¹)	Širina (μm)	Dužina (μm)	L/d omjer
(a)	N	10	0,1	629,57 ± 131,37	1045,51 ± 129,27	1,72
(a)	N/E	20	0,2	553,20 ± 111,51	1195,10 ± 129,53	2,21
(b)		50	0,5	1054 ± 245,45	1311,53 ± 236,92	1,46
(c)		100	10	571,47 ± 95,84	996,56 ± 115,66	1,80
		100	10	682,63 ± 265,92	1239,04 ± 164,67	1,99
		100	10	569,70 ± 269,25	1270,60 ± 282,57	2,49
(d)			200	20	281,53 ± 42,03	669,49 ± 128,5
(d)	N/S	50	0,1	631,08 ± 63,91	979,73 ± 72,70	1,56
(d)	N/E/S	50	0,1	616,30 ± 40,20	925,39 ± 69,42	1,51
(d)	CHT	50	0,5	908,03 ± 212,14	1360,45 ± 374,89	1,50

Rezultati (tablica 4) ukazuju na nastajanje mikrogelova izrazito nepravilnog oblika prosječne širine $567 \pm 190 \mu\text{m}$ i dužine $1091 \pm 250 \mu\text{m}$, te omjera dužine i širine $\sim 2,1$. Promatrajući rezultate analize veličine različitih brzina protoka međusobno, koristeći brzine kontinuirane i dispergirane 50:0,5 mL h⁻¹ u sustavu N/E nastaju najveći mikrogelovi, ali s najnižim omjerom L/d što ukazuje da je tim sustavom brzina i otopine za neutralizaciju bilo moguće dobiti mikrogelove s najvišim stupnjem sferičnosti ($\sim 1,46$). Također, vidljivo je da upotrebom brzina protoka faza 200:0,1 mL h⁻¹ moguće je pripremiti mikročestice najmanje širine i dužine te s najužom raspodjelom veličina, no i s visokom vrijednošću omjera L/d . Sustav kojim se dobije najviša vrijednost L/d omjera ($\sim 2,49$) je upotreba brzina protoka 100:10 mL h⁻¹ u N/E otopini za neutralizaciju.

Usporede li se veličine dobivenih mikrogelova sa širinom mikrokanala mikroreaktora (koji iznosi $\sim 940 \pm 50 \mu\text{m}$), vidljivo je da nastaju mikročestice manje širine u odnosu na promjer kanala što je u skladu s literaturom [18].

Nepravilni oblik nastalih mikrogelova je zabilježen i u radu Yang i suradnik [54] u kojem su pripravili mikročestice kompleksa kitozana (udjela 3 mas. %) i željezovih(II) te željezovih(III) iona koristeći se mikroreaktorom, a kao neutralizacijski medij je korištena 20 vol. % NaOH. Prema njihovim rezultatima prilikom uporabe dviju različitih brzina dispergirane faze; $0,02 \text{ mL h}^{-1}$ (slika 23A) i $0,2 \text{ mL h}^{-1}$ (slika 23B), pri konstantnoj brzini kontinuirane faze (30 mL h^{-1}), nastaju mikrogelovi nepravilnih oblika jednakih veličina. Kao pojašnjenje nastanka mikročestica oblika „punoglavca“ pretpostavljaju da u trenutku dodira kapljice kompleksa kitozana i željezovih iona s površinom otopine NaOH, u trenutku umreživanja, kapljica prvo dobiva oblik „repa“. Uslijed primarnog očvršćivanja u obliku nastanka repa, smanjuje se napetost na međupovršini koja bi inače vraćala kapljicu u njen prvobitni oblik, a daljnjom difuzijom OH^- iona kroz kapljicu dolazi do potpunog geliranja i u konačnici nastaju čestice nepravilnog oblika. Usporedbom CHT-Cu mikrogelova dobivenih protocima faza 200:0,1 mL h^{-1} u ovom radu s rezultatima Yang i sur. [54], može se zaključiti da je moguće dobiti usku raspodjelu veličine te da oblik ne ovisi o omjeru brzina protoka ulje/vodne faze, ipak nastaju nepravilni oblici mikrogelova.



Slika 23. Mikročestice u otopini za umreživanje pri različitim brzinama dispergirane faze, dok je brzina kontinuirane faze konstantna (30 mL h^{-1}): (A) $0,02 \text{ mL h}^{-1}$; (B) $0,2 \text{ mL h}^{-1}$ [54].

Nakon analize mokrih mikročestica, slijedi proces ispiranja i sušenja CHT-Cu mikrogelova.

4.3. Ispiranje i sušenje mikročestica

Da bi se dobile suhe CHT-Cu mikročestice, potrebno je provesti ispiranje i sušenje. Prema rezultatima analize veličine mokrih mikročestica, vidljivo je da su uzorci dobivenih mikročestica podjednake veličine s obzirom na ispitivanje utjecaja promjene brzine faza na

veličinu. Stoga, uzorci su podijeljeni u odnosu na korišteni neutralizacijski medij i u ovisnosti o upotrebi emulgatora.

U ovom radu, za uklanjanje uljne faze s površine mikročestica te suvišaka otopine NaOH u prvom koraku ispiranja korišten je 50 vol. %-tni etanol. Kod sustava u kojem je neutralizacijski medij bila NaOH otopina, te je u kontinuiranoj fazi dio dodan emulgator SPAN 85(N/S), dodatkom 50 vol. % etanola došlo je do zamućenja. Mogući razlog nastanka zamućenja uslijed upotrebe visoke koncentracije etanola koja može uzrokovati faznu separaciju između ulja i vodene faze, u prisutnosti emulgatora stvarajući emulzije s bijelim zamućenjem. Etanol može promijeniti interakcije između molekula ulja i vode, uzrokujući stvaranje sitnih kapljica koje raspršuju svjetlost i stvaraju zamućenje, što je pojašnjeno u radu Motoyamae i suradnika [55]. Kako bi se pokušalo ukloniti zamućenje, odnosno sedimentirati CHT-Cu mikrogelovi, sustav N/S podvrgnut je centrifugiranju pri 4200 okr. min⁻¹ tijekom 10 minuta. Međutim, centrifugiranjem sustava N/S nije došlo do sedimentiranja mikrogelova, a mogući razlog za to je da otopina kompleksa CHT-Cu nije bila dovoljno neutralizirana, već je emulgator omogućio da se otopina kompleksa CHT-Cu zadrži kao dispergirana faza. Dodatkom etanola kapljicama, uklanja se emulgator i kapljica se „razlijeva“, a pri tome dolazi do zamućenja cijele otopine te zato, sustav N/S nije karakteriziran.

Sustavi N (neutralizacijski medij je NaOH otopina), N/E (NaOH otopina i EtOH u volumenom omjeru 1:1) i N/E/S (NaOH/EtOH otopina kao neutralizacijski medij, uz prisustvo emulgatora u kontinuiranoj fazi) su uspješno isprani s 50 %tnim etanolom te su dehidrirani s 96 vol. %-tnim etanolom. Za uklanjanje etanola, korišten je aceton, a nakon čega su uzorci ostavljeni pri sobnim uvjetima kako bi otapalo isparilo.

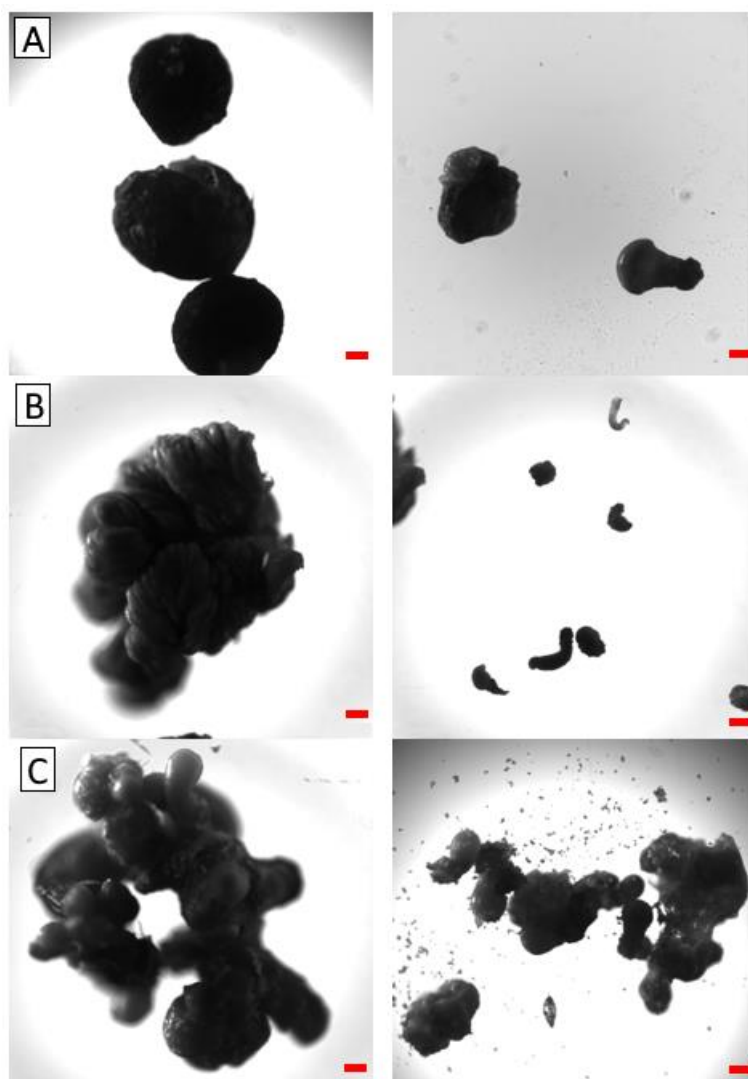
4.4. Karakterizacija dobivenih CHT-Cu mikročestica

Suhe mikročestice na temelju kompleksa bakrovih(II) iona i kitozana (CHT-Cu) pripravljene primjenom mikroreaktora, podvrgnute su metodama karakterizacije kako bi se odredila veličina i oblik čestica te kemijski sastav nakon provedenog ispiranja i sušenja. Za to su primijenjeni svjetlosni invertni mikroskop i ATR-FTIR analiza.

4.4.1. Veličina i oblik suhih mikročestica

Dobivene suhe mikročestice su promatrane svjetlosnim mikroskopom kako bi se vidjela promjena dimenzija nakon postupaka ispiranja i sušenja (slika 24).

Na prikazu 24A moguće je vidjeti da se mikročestice u N sustavu otopine za geliranje međusobno razlikuju veličinski. Također je vidljivo da čestice posjeduju određeni stupanj sferičnosti, a izračunati omjer dužine i širine iznosi $\sim 1,24$ (ukoliko bi mikročestice bile sferične, taj bi omjer iznosio 1). S druge strane, na slici 24B vidljivo je da mikročestice dobivene primjenom sustava N/E zadržavaju oblik „punoglavca“ (L/d omjer $\sim 2,00$), no također dolazi i do aglomeriranja istih nakon sušenja. Ovako dobiveni rezultati mogu ukazivati na to da dodatak etanola direktno u neutralizacijski medij utječe na smanjenje nastalih mikrogelova (iako su mikrogelovi imali slične veličine). Razlog povećanja omjera mogao bi biti utjecaj etanola pri čemu alkohol smanjuje površinsku napetost ulja na kapljici u trenutku fizikalnog umreživanja s otopinom NaOH, što u konačnici utječe na geliranje i nastali oblik, kao što je pojašnjeno u radu Yang i suradnika [54]. Sličan trend je vidljiv i kod uporabe emulgatora SPAN 85, no omjer L/d je nešto niži, što bi značilo da emulgator stvara stabilnije kapljice tijekom procesa umreživanja, odnosno bolja je kontrola difuzije otopine NaOH tijekom geliranja. Također, usporede li se vrijednosti veličine čestica prije i nakon sušenja pri svim brzina kontinuirane i dispergirane faze vidljivo je da dolazi do smanjenja dimenzija mikročestica nakon ispiranja, a što je i očekivano uslijed uklanjanja suviška vodene otopine NaOH, ali i ulja s površine mikročestice tijekom postupaka ispiranja i sušenja. Na slici 24C vidljivi su aglomerati mikročestica dobivenih upotrebom emulgatora u sustavu za geliranje N/E.



Slika 24. Suhe mikročestice dobivene primjenom mikroreaktora s kolektorom: (A) $1,25 \text{ mol dm}^{-3}$ otopina NaOH (N), (B) $1,25 \text{ mol dm}^{-3}$ otopina NaOH i 96 % EtOH u volumnom omjeru 1:1 (N/E), te (C) $1,25 \text{ mol dm}^{-3}$ otopina NaOH i 96 vol. % EtOH u volumnom omjeru 1:1 uz prisutnost emulgatora u kontinuiranoj fazi (N/E/S). Uvećanje je $4\times$, a skala predstavlja $200 \mu\text{m}$.

Nadalje, provedena je analiza veličine na temelju 10-15 analiziranih mikročestica, a rezultati su prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Određene vrijednosti širina i dužina CHT-Cu mikročestica dobivenih primjenom mikroreaktora nakon sušenja.

Sustav	Širina (μm)	Dužina (μm)	<i>L/d</i> omjer
N	816,04 \pm 215,55	982,30 \pm 171,75	1,24
N/E	183,89 \pm 38,77	353,84 \pm 99,83	2,00
N/E/S	282,27 \pm 53,57	454,69 \pm 76,98	1,67
CHT- N/E	584,34 \pm 145,49	1116,04 \pm 522,20	1,91

Na temelju rezultata prikazanih u tablici 5, vidljivo je da u sustavima N/E i N/E/S nastale mikročestice imaju užu raspodjelu u odnosu na mikročestice u sustavu za geliranje 1,25 mol dm⁻³ NaOH.

Prema rezultatima mikrografija i tablice 5, vidljivo je da nakon sušenja mikročestice dobivene u otopini 1,25 mol dm⁻³ natrijeva hidroksida i dalje imaju pravilniji oblik u odnosu na ostale mikročestice, no ne u potpunosti kao u radovima Yang i suradnika [5, 34]. Mogući razlog nastanka ovakvih nepravilnih mikročestica je opisani spori proces geliranja otopine kompleksa kitozana i Cu²⁺ iona zbog prisutnosti uljne faze na površini kapljice, ali i utjecaj uporabe različitih koncentracija kako otopine dispergirane faze, tako emulgatora i otopine u kolektoru.

Pojašnjenje utjecaja različitih koncentracija otopina kitozana, NaOH i emulgatora vidljivo je u radu Lim i suradnika [49], gdje je detaljno ispitan utjecaj promjene koncentracija otopine kitozana (1, 2 i 3 mas. %), otopine NaOH (koncentracije 0,5, 1 i 3 mol dm⁻³) te dodatka emulgatora (SPAN 85; udjela 2, 4 i 6 vol. %) na oblik i veličinu mikrosfera dobivenih metodom razdvajanja emulzijske faze. Primijenjena metoda uključuje sljedeće korake: dobivanje emulzije gdje se prvo stvara emulzija dispergirane otopine kitozana u kontinuiranoj fazi (izo-oktan) te fazna separacija, pri čemu dolazi do umreživanja dispergirane faze (kitozana) upotrebom otopine za geliranje (NaOH otopina). Rezultati njihovog istraživanja pokazali su da pri istoj koncentraciji otopine kitozana (2 mas. %) upotrebom više koncentracije NaOH (3 mol dm⁻³) nastaju velike, hrapave i izdužene mikročestice što potiče agregiranje mikročestica izduženog oblika. Preniska koncentracija (0,5 mol dm⁻³) otopine NaOH ne stvara mikrosfere dovoljnog integriteta. Također, porastom udjela emulgatora u kontinuiranoj fazi nastaju veće čestice oblika urušenih sfera. Rezultati istraživanja Lim i suradnika jasno ukazuju na značajan

utjecaj koncentracije otopina kitozana, NaOH i emulgatora na morfologiju i veličinu mikrosfera te se slažu s rezultatima istraživanja Yang i suradnika [5, 34], ali i eksperimentalno dobivenim rezultatima u ovom radu.

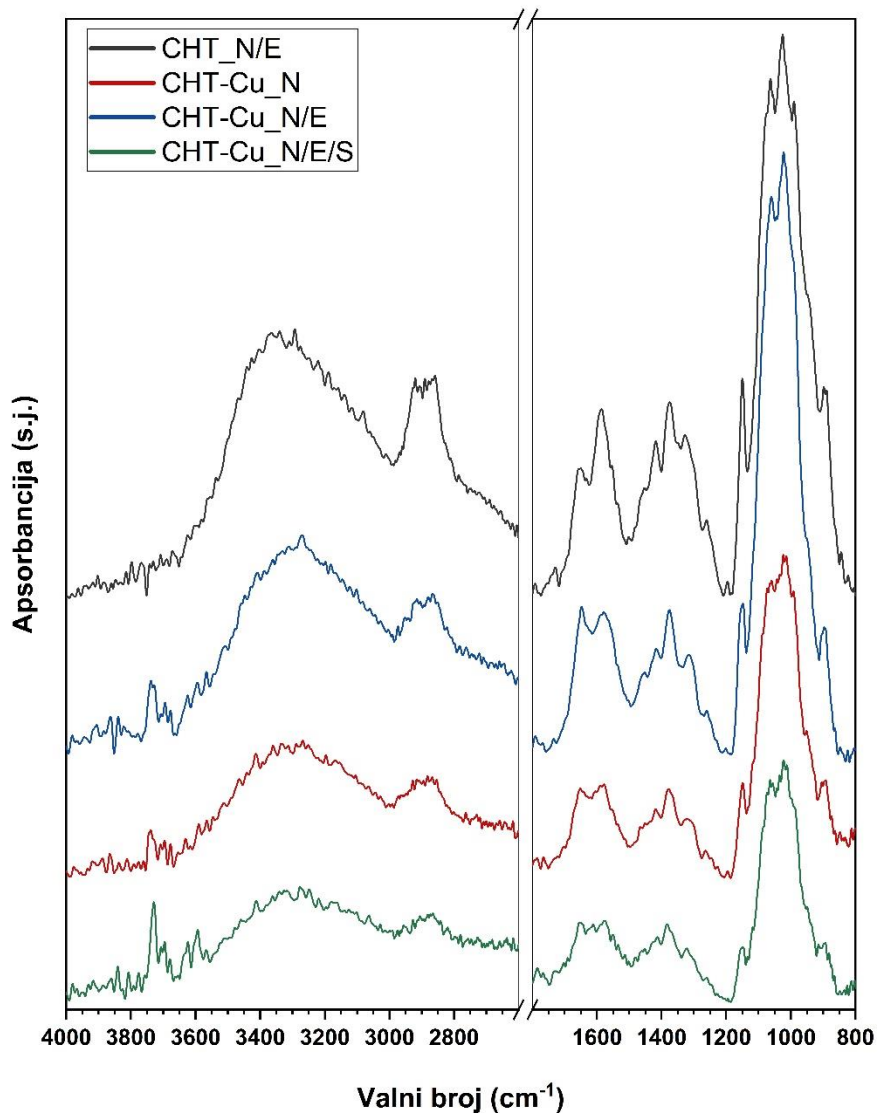
Osim oblika i veličine mikročestica, važno je ispitati i kemijski sastav materijala, kako bi se utvrdilo je li primijenjeni postupak ispiranja i sušenja CHT-Cu mikročestica bio uspješan. Stoga, u nastavku rada dan je pregled rezultata provedene ATR-FTIR analize.

4.4.2. Kemijski sastav

Kako bi se utvrdilo da su pripravljene suhe mikročestice u potpunosti isprane, snimljeni su FTIR spektri prikazani na slici 25. Kao referentni uzorak korišten je kontrolni uzorak mikročestica na temelju kitozana (CHT) dobivenih primjenom mikroreaktora.

Apsorpcijske vrpce specifične za kitozan (slika 25) detektirane su na $\sim 3340\text{ cm}^{-1}$ i $\sim 3295\text{ cm}^{-1}$, što ukazuje na vibracije istezanja hidroksilne skupine ($-\text{OH}$) i amino skupine ($-\text{NH}_2$), kao i njihovu međusobnu interakciju putem vodikovih veza. Dvije uočene vrpce u rasponu od $2970\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ povezane su sa simetričnim i asimetričnim rastezanjem C-H u $-\text{CH}$ i $-\text{CH}_2$ grupama. Apsorpcijske vrpce na $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1587\text{ cm}^{-1}$ i u rasponu od $1418\text{--}1327\text{ cm}^{-1}$ pripadaju amidu I (vibracije rastezanja C=O uz istezanje C-N i savijanje N-H u $-\text{CONH}_2$), amidu II (istezanje C-N uz kombinaciju N-H savijanja) i amidu III (N-H savijanje s rastezanjem C-N te deformacije C-H i N-H). Asimetrično rastezanje C-O-C pojavljuje se na $\sim 1150\text{ cm}^{-1}$, dok su u rasponu od $1064\text{--}990\text{ cm}^{-1}$ prisutne vibracije istezanja $-\text{CO}$ u $-\text{COH}$ (na C3 atomu, sekundarni $-\text{OH}$) [2, 33].

Osim smanjenja intenziteta, na FTIR spektrima pripremljenih mikročestica u odnosu na FTIR spektar CHT85 nakon dodatka bakrovih(II) iona i uporabe čistog $1,25\text{ mol dm}^{-3}$ NaOH i u kombinaciji s 96 vol. % etanola kao medija za geliranje te uporabom emulgatora SPAN 85 došlo je do blagog pomaka valnih brojeva vibracija istezanja hidroksilne skupine ($-\text{OH}$) i amino skupine ($-\text{NH}_2$) k nižim vrijednostima. S druge strane, apsorpcijske vrpce amida I (vibracije rastezanja C=O uz istezanje C-N i savijanje N-H u $-\text{CONH}_2$), amida II (istezanje C-N uz kombinaciju N-H savijanja) i amida III (N-H savijanje s rastezanjem C-N te deformacije C-H i N-H) kao i prisutnih vibracija istezanja $-\text{CO}$ u $-\text{COH}$ imaju blagi pomak ka višim vrijednostima valnih brojeva. Osim toga, vidljivo je da su elektrostatske sile između kitozana i metalnih iona prisutne u mikrosferama kompleksa [2, 33].



Slika 25. FTIR spektri uzoraka (A) čistog kitozana (CHT) te pripremljenih mikročestica CHT-Cu korištenjem različitih kolektora: (B) $1,25 \text{ mol dm}^{-3}$ NaOH (N); (C) $1,25 \text{ mol dm}^{-3}$ i 96 vol. % EtOH (N/E); (D) $1,25 \text{ mol dm}^{-3}$ NaOH i 96 vol. % EtOH uz prisustvo emulgatora SPAN 85 u kontinuiranoj fazi (N/E/S) .

Također, u ovom istraživanju nije zabilježena pojava dodatnih apsorpcijskih vrpca te je moguće zaključiti da su uzorci CHT-Cu mikročestica u potpunosti isprani i osušeni, odnosno da su uljna faza, emulgator te neutralizacijski agensi uspješno uklonjeni. Stoga, ovakav postupak ispiranja i sušenja mikrogela na temelju kompleksa kitozana i Cu^{2+} iona je pogodan način za dobivanje suhih mikročestica.

4.5. Prijedlozi za daljnja istraživanja

U ovom radu je opisana izrada PMMA mikroreaktora uporabom glodalice i primjena istog za dobivanje mikročestica na temelju CHT-Cu kompleksa. Kroz rad je ispitan utjecaj brzina protoka kontinuirane i dispergirane faze, kao i omjer brzina protoka, ali i utjecaj dodatka emulgatora na veličinu, oblik i prinos mikročestica. Prema rezultatima, vidljivo je da je ovakva izvedba mikroreaktora pogodna za izradu CHT-Cu mikročestica, no ipak potrebno je provesti izmjene kako bi se postigao optimalan izgled mikročestica i dobila što uža raspodjela veličina. U nastavku teksta, dani su prijedlozi za daljnja istraživanja.

Dizajn i geometrija mikroreaktora

Veličina i oblik mikrokanala u ovom radu su zadovoljavajući za pripravu mikročestica, no ipak bilo bi korisno osigurati jednaku širinu i dubinu mikrokanala kako bi se postigao jednoliki protok kapljevina.

Odabir druge tehnike izrade jednakog geometrijskog spoja na mikroreaktoru mogla bi poboljšati preciznost veličine mikrokanala (na primjer uporaba CNC glodalice). Najvažnija preinaka mikroreaktorskog dizajna bi bila izlaz iz mikroreaktora. Naime, uslijed površinske napetosti ne dolazi do direktnog kapanja produkta, već do akumuliranja uljne faze s nastalim kapljicama na izlazu mikroreaktora, uslijed čega je otežana neutralizacija polimerne otopine (dispergirane faze).

Pri izboru materijala, PMMA pločice su vrlo jednostavne za uporabu, no ipak treba paziti na upotrijebljenu silu stezanja vijaka kako ne bi došlo do oštećenja.

Eksperimentalni parametri

Kada se promatra stvaranje kapljica dispergirane faze u mikrokanalima, važno je uzeti u obzir karakteristike pojedinih faza kao što su brzina protoka faza, omjer i fizikalno-kemijska svojstva faza.

Viskoznost ulaznih tekućina može utjecati na nastanak kapljice dispergirane faze u kontinuiranoj, a promjenom viskoznosti kontinuirane faze moglo bi se utjecati na veličinu i oblik nastalih mikrogelova. Prijedlog za daljnje istraživanje je primjena izo-okšana uz dodatak emulgatora [3].

Također, preporuča se korištenje drugog neutralizacijskog medija, a kao što je Na-TPP.

Post-obrađena mikrogelova

U trenutku doticaja produkta (kontinuirana faza s kapljicama dispergirane faze) s površinom neutralizacijskog medija, ulje zaostaje na površini otopine, a čime se ograničava difuzija OH⁻ iona do dispergirane faze. Kako bi se ta uljna „barijera“ što prije uklonila, bilo bi poželjno ispitati različite brzine miješanja otopine za neutralizaciju. Osim toga, poželjno bi bilo ispitati i duljinu trajanja procesa umreživanja pri konstantnom miješanju kroz određena vremenska razdoblja (npr. 1, 3, 6, 24, 48 h miješanja u otopini za umreživanje).

5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je pripremiti mikročestice primjenom mikroreaktora napravljenoga *de novo*. Iako se danas koriste razne konvencionalne metode pripreme mikročestica na temelju kitozana, u ovom radu mikročestice su pripravljene primjenom mikroreaktora zbog lakše manipulacije raspodjele veličine čestica, ali i efikasnosti cijelog procesa.

U eksperimentalnom dijelu rada, napravljen je PMMA mikroreaktor poprečne geometrije spoja (tzv. T-spoj) korištenjem glodalice. Promjer kanala iznosio je oko $940 \pm 50 \mu\text{m}$. Kao vodena (dispergirana) faza korištena je otopina CHT-Cu kompleksa, dok je kontinuirana faza bila suncokretovo ulje s i bez dodatka emulgatora (SPAN 85). Ispitan je utjecaj promjene procesnih parametara (brzina protoka kontinuirane i dispergirane faze, sastav neutralizacijskog medija) i izvedbe mikroreaktora na dobivanje CHT-Cu mikročestica.

Nastale mikročestice u kolektoru su prosječne širine $567 \pm 190 \mu\text{m}$ i dužine $1091 \pm 250 \mu\text{m}$, te omjera dužine i širine $\sim 2,1$, bez obzira na primijenjene brzine protoka faza, no različitog su oblika uslijed uporabe različitih sastava neutralizacijskog medija. Dobivene mikročestice su izrazito nepravilnih, izduženih oblika te vrlo često agregirane i hrapave površine. Mikrogelovi nastali u sustavu za neutraliziranje $1,25 \text{ mol dm}^{-3}$ NaOH uz upotrebu 96 vol. % EtOH pri brzinama protoka kontinuirane i dispergirane faze $50:0,5 \text{ mL h}^{-1}$ imale su najniži omjer L/d ($\sim 1,46$) što ukazuje na najviši stupanj sferičnosti. Prosječne dimenzije suhih mikročestica su manje u odnosu na mikročestice u otopini za geliranje uslijed smanjenja do kojeg dolazi tijekom procesa ispiranja i sušenja. Suhe mikročestice u sustavu $1,25 \text{ mol dm}^{-3}$ NaOH imale su najniži L/d omjer od $\sim 1,24$.

Rezultati FTIR analize ukazuju na prisutnost elektrostatskih sila između metalnih iona i polimernog lanca kitozana, bez nastanka novih apsorpcijskih vrpca. Ovakvo fizikalno umreživanje između funkcionalnih skupina kitozana ($-\text{NH}_2$ i $-\text{OH}$) te Cu^{2+} iona omogućuje nastanak stabilnih mikročestica. Izostanak dodatnih apsorpcijskih vrpca potvrđuje uspješnost postupka ispiranja i sušenja.

Dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost korištenja mikroreaktora za dobivanje mikročestica na temelju kompleksa kitozana i metalnih iona te mogu biti podloga za daljnja istraživanja u kojima bi se uporabom ovakve geometrije spoja uz adekvatnu modifikaciju mikroreaktora mogle dobiti mikročestice pravilnijih oblika s uskom raspodjelom veličina koje bi se koristile kao potencijalni sustavi za ciljanu dostavu lijeka.

6. POPIS SIMBOLA

ATR- FTIR infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom s prigušenom totalnom refleksijom (engl. *attenuated total reflectance – Fourier-transform infrared spectroscopy*)

DD stupanj deacetilacije (engl. *degree of deacetylation*)

dH₂O demineralizirana voda

DMLS izravno lasersko sinteriranje metala (engl. *direct metal laser sintering*)

FFF izrada taljenim filamentom (engl. *fused filament fabrication*)

EtOH etanol

HAc octena kiselina

M_w molekulska masa

NaOH natrijev hidroksid

PC polikarbonat

PDMS polidimetilsiloksan

PMMA poli(metil-metakrilat)

PS polistiren

PVC poli(vinil-klorid)

RSO relativno standardno odstupanje

SLA stereolitografija (engl. *stereolithography*)

SLS selektivno lasersko sinteriranje (engl. *selective laser sintering*)

Na-TPP natrijev tripolifosfat

7. LITERATURA

- [1] Ahmed, T. A., Aljaeid, B. M., Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery, *Drug Des. Devel. Ther.* **10** (2016) 483-507.
- [2] Lončarević, A., Ivanković, M., Rogina, A., Electrospayed chitosan–copper complex microspheres with uniform size, *Materials*, **14** (2021).
- [3] Lončarević, A., Clara-Trujillo, S., Martínez-Férriz, A., Blanco-Gómez, M., Gallego-Ferrer, G., Rogina, A., Chitosan-copper microparticles as doxorubicin microcarriers for bone tumor therapy, *Int. J. Pharm.* **659** (2024).
- [4] Zhu, P., Wang, L., Passive and active droplet generation with microfluidics: a review, *Lab Chip*, **17** (2017) 34-75.
- [5] Yang, C. H., Huang, K. S., Lin, P. W., Lin, Y. C., Using a cross-flow microfluidic chip and external crosslinking reaction for monodisperse TPP-chitosan microparticles, *Sens. Actuators B. Chem.* **124** (2007) 510-516.
- [6] Kikutani, Y., Hibara, A., Uchiyama, K., Hisamoto, H., Tokeshi, M., Kitamori, T., Pile-up glass microreactor, *Lab. Chip* **2** (2002) 193-196.
- [7] Fujii, T., PDMS-based microfluidic devices for biomedical applications, *Microelect. Engin.* **61–62** (2002) 907-914.
- [8] Chen, X., Shen, J., Li, T., PMMA microreactor for chemiluminescence detection of Cu (II) based on 1,10-Phenanthroline-hydrogen peroxide reaction, *J. Food Sci. Technol.*, **53** (2016) 915-919.
- [9] Vrsaljko, D., Čevič, I., Car, F., Rahelić, T., Production of microreactor systems by additive manufacturing technology, *Engineering Power* **14** (2019).
- [10] Seemann, R., Brinkmann, M., Pfohl, T., Herminghaus, S., Droplet based microfluidics, *Reports on Progress in Physics.* **75** (2012).
- [11] Jo, Y. K., Lee, D., Biopolymer Microparticles Prepared by Microfluidics for Biomedical Applications, *Small*, **16** (2020).

- [12] Pattanayak, P., Singh, S. K., Gulati, M., Vishwas, S., Kapoor, B., Chellappan, D. K., *in* *sur.*, Microfluidic chips: recent advances, critical strategies in design, applications and future perspectives, *Microfluid Nanofluidics* **25** (2021).
- [13] Teh, S. Y., Lin, R., Hung, L. H., Lee, A. P., Droplet microfluidics, *Lab. Chip* **8** (2008) 198-220.
- [14] Sohrabi, S., Kassir, N., Keshavarz Moraveji, M., Droplet microfluidics: Fundamentals and its advanced applications, *RSC Adv.* **10** (2020) 27560-27574.
- [15] Bauer, W. A. C., Fischlechner, M., Abell, C., Huck, W. T. S., Hydrophilic PDMS microchannels for high-throughput formation of oil-in-water microdroplets and water-in-oil-in-water double emulsions, *Lab Chip* **10** (2010) 1814-1819.
- [16] Cordero, M. L., Gallaire, F., Baroud, C. N., Quantitative analysis of the dripping and jetting regimes in co-flowing capillary jets, *Physics of Fluids* **23** (2011).
- [17] Xie, K., De Loubens, C., Dubreuil, F., Gunes, D. Z., Jaeger, M., Léonetti, M., Interfacial rheological properties of self-assembling biopolymer microcapsules, *Soft. Matter.* **13** (2017) 6208-6217.
- [18] Ushikubo, F. Y., Birribilli, F. S., Oliveira, D. R. B., Cunha, R. L., Y- and T-junction microfluidic devices: effect of fluids and interface properties and operating conditions, *Microfluid Nanofluidics* **17** (2014) 711-720.
- [19] Yeh, C. H., Lin, P. W., Lin, Y. C., Chitosan microfiber fabrication using microfluidic chips of different sheath channel angles and its application on cell culture, *Procedia Chem.* (2009) 357-360.
- [20] Suryawanshi, P. L., Gumfekar, S. P., Bhanvase, B. A., Sonawane, S. H., Pimplapure, M. S., A review on microreactors: Reactor fabrication, design, and cutting-edge applications, *Chem. Eng. Sci.* **189** (2018) 431-448.
- [21] Chen, L., Deng, D., Pi, G., Huang, X., Zhou, W., Burr formation and surface roughness characteristics in micro-milling of microchannels, *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* **111** (2020) 1277-1290.
- [22] Guckenberger, D. J., De Groot, T. E., Wan, A. M. D., Beebe, D. J., Young, E. W. K., Micromilling: A method for ultra-rapid prototyping of plastic microfluidic devices, *Lab. Chip*, **15** (2015) 2364-2378.

- [23] Cao, E., Zuburtikudis, I., Al-Rifai, N., Roydhouse, M., Gavriilidis, A., Enhanced performance of oxidation of rosalva (9-decen-1-ol) to costenal (9-decenal) on porous silicon-supported silver catalyst in a microstructured reactor, *Processes* **2** (2014) 141-157.
- [24] Ren, K., Zhou, J., Wu, H., Materials for microfluidic chip fabrication, *Acc. Chem. Res.* **46** (2013) 2396-2406.
- [25] Scott, S. M., Ali, Z., Fabrication methods for microfluidic devices: An overview, *Micromachines* **12** (2021).
- [26] Ma, X., Li, R., Jin, Z., Fan, Y., Zhou, X., Zhang, Y., Injection molding and characterization of PMMA-based microfluidic devices, *Microsystem Technologies* **26** (2020) 1317-1324.
- [27] Gal-Or, E., Gershoni, Y., Scotti, G., Nilsson, S. M. E., Saarinen, J., Jokinen, V., i sur., Chemical analysis using 3D printed glass microfluidics, *Analytical Methods*, **11** (2019) 1802-1810.
- [28] Ko, D. H., Gyak, K. W., Kim, D. P., Emerging Microreaction Systems Based on 3D Printing Techniques and Separation Technologies, *J. Flow. Chem.* **7** (2017) 72-81.
- [29] https://formnext.mesago.com/frankfurt/en/industry-insights/am-field-guide/am_other_materials.html (pristup 4. srpanj 2024.)
- [30] Li, S., Xiao, L., Deng, H., Shi, X., Cao, Q., Remote controlled drug release from multi-functional Fe₃O₄/GO/Chitosan microspheres fabricated by an electrospray method, *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **151** (2017) 354-362.
- [31] Zhao, Z., Wang, Z., Li, G., Cai, Z., Wu, J., Wang, L., i sur., Injectable Microfluidic Hydrogel Microspheres for Cell and Drug Delivery, *Adv. Funct. Mater.* **31** (2021).
- [32] Chen, S. K., Ju, X. J., Wei, J., Wang, W., Chu, L. Y., Controllable Preparation of Monodisperse Chitosan Microspheres Based on Microfluidic Technology, *J. Chem. Educ.* **100** (2023) 3526-3532.
- [33] Gritsch, L., Lovell, C., Goldmann, W. H., Boccaccini, A. R., Fabrication and characterization of copper(II)-chitosan complexes as antibiotic-free antibacterial biomaterial, *Carbohydr. Polym.* **179** (2018) 370-378.

- [34] Yang, C. H., Wang, L. S., Chen, S. Y., Huang, M. C., Li, Y. H., Lin, Y. C., i sur., Microfluidic assisted synthesis of silver nanoparticle–chitosan composite microparticles for antibacterial applications, *Int. J. Pharm.*, 510 (2016) 493-500.
- [35] Thenge, R. R., Chandak, M. P., Adhao, V. S., Microsphere: a Novel Drug Delivery System, *Int. J. Pharm. Techno.* **12** (2020) 31955-31973.
- [36] Gritsch, L., Maqbool, M., Mouriño, V., Ciraldo, F. E., Cresswell, M., Jackson, P. R., i sur., Chitosan/hydroxyapatite composite bone tissue engineering scaffolds with dual and decoupled therapeutic ion delivery: Copper and strontium, *J. Mater. Chem. B.* **7** (2019) 6109-6124.
- [37] Shu, X. Z., Zhu, K. J., Chitosan/gelatin microspheres prepared by modified emulsification and ionotropic gelation, *J. Microencapsul.* **18** (2001) 237-245.
- [38] Gao, Y., Ma, Q., Cao, J., Wang, Y., Yang, X., Xu, Q., i sur., Recent advances in microfluidic-aided chitosan-based multifunctional materials for biomedical applications, *Int. J. Pharm.* **600** (2021).
- [39] Cerón, A. A., Nascife, L., Norte, S., Costa, S. A., Oliveira do Nascimento, J. H., Morisso, F. D. P., i sur., Synthesis of chitosan-lysozyme microspheres, physicochemical characterization, enzymatic and antimicrobial activity, *Int. J. Biol. Macromol.* **185** (2021) 572-581.
- [40] Yuan, Y., Chesnutt, B. M., Haggard, W. O., and Bumgardner, J. D., Deacetylation of chitosan: Material characterization and in vitro evaluation via albumin adsorption and pre-osteoblastic cell cultures, *Materials* **4** (2011) 1399-1416.
- [41] Villegas-Peralta, Y., López-Cervantes, J., Madera Santana, T. J., Sánchez-Duarte, R. G., Sánchez-Machado, D. I., Martínez-Macías, M. del R., i sur. Impact of the molecular weight on the size of chitosan nanoparticles: characterization and its solid-state application, *Polymer Bulletin*, **78** (2021) 813-832.
- [42] Chen, Y. M., Chung, Y. C., Wang, L. W., Chen, K. T., Li, S. Y., Antibacterial properties of chitosan in waterborne pathogen, *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* **37** (2002) 1379-1390.

- [43] Lončarević, A., Ivanković, M., Rogina, A., Lysozyme-Induced Degradation of Chitosan: The Characterisation of Degraded Chitosan Scaffolds, *J. Tissue Rep. Regen.* **1** (2017).
- [44] Yan, D., Li, Y., Liu, Y., Li, N., Zhang, X., Yan, C., Antimicrobial properties of chitosan and chitosan derivatives in the treatment of enteric infections, *Molecules* **26** (2021).
- [45] Wahid, F., Wang, H. S., Zhong, C., Chu, L. Q., Facile fabrication of moldable antibacterial carboxymethyl chitosan supramolecular hydrogels cross-linked by metal ions complexation, *Carbohydr. Polym.* **165** (2017) 455-461.
- [46] Yu, K., Ho, J., McCandlish, E., Buckley, B., Patel, R., Li, Z., i sur., Copper ion adsorption by chitosan nanoparticles and alginate microparticles for water purification applications, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **425** (2013) 31-41.
- [47] Meghdadi, S., Amirnasr, M., Majedi, M., Bagheri, M., Amiri, A., Abbasi, S., i sur., Template synthesis, and X-ray crystal structures of copper(II) and nickel(II) complexes of new unsymmetrical tetradentate Schiff base ligands. Electrochemistry, antibacterial properties, and metal ion effect on hydrolysis-recondensation of the ligand, *Inorganica. Chim. Acta.* **437** (2015) 64-69.
- [48] Azeman, N. H., Arsad, N., Bakar, A. A. A., Polysaccharides as the sensing material for metal ion detection-based optical sensor applications, *Sensors* **20** (2020) 1-22.
- [49] Lim, L. Y., Wan, L. S. C., Thai, P. Y., Chitosan Microspheres Prepared by Emulsification and Ionotropic Gelation, *Drug Devel. Ind. Pharm.* **23** (1997) 981-985.
- [50] Yang, C. H., Lin, Y. S., Huang, K. S., Huang, Y. C., Wang, E. C., Jhong, J. Y., i sur., Microfluidic emulsification and sorting assisted preparation of monodisperse chitosan microparticles, *Lab. Chip* **9** (2009) 145-150.
- [51] Zhang, Y., Wang, D., Bai, X., Xu, J., Zhang, J., Zhang, G., i sur., Microfluidic preparation of magnetic chitosan microsphere and its adsorption towards Congo red, *J. Polym. Research* **30** (2023).
- [52] Xu, J. H., Zhao, H., Lan, W. J., Luo, G. S., A novel microfluidic approach for monodispersed chitosan microspheres with controllable structures, *Adv. Healthc. Mater.* **1** (2012) 106-111.

- [53] Ferreira, A. C., Sullo, A., Winston, S., Norton, I. T., Norton-Welch, A. B., Influence of Ethanol on Emulsions Stabilized by Low Molecular Weight Surfactants, *J. Food Sci.* **85** (2020) 28-35.
- [54] Yang, C. H., Wang, C. Y., Huang, K. S., Kung, C. P., Chang, Y. C., Shaw, J. F., Microfluidic one-step synthesis of Fe₃O₄-chitosan composite particles and their applications, *Int. J. Pharm.* **463** (2014) 155-160.
- [55] Motoyama, T., Katsuumi, Y., Sasakura, H., Nakamura, T., Suzuki, H., Tsuchiya, K., *in* sur., Preparation of Highly Stable Oil-in-Water Emulsions with High Ethanol Content Using Polyglycerol Monofatty Acid Esters as Emulsifiers, *J. Oleo. Sci.* **71** (2022) 829-837.

8. PRILOZI

8.1. Izrada mikroreaktora

Cjelokupna izrada mikroreaktora te primjena napravljenog PMMA mikroreaktora za dobivanje mikročestica dana je u videu dostupnom na URL: <https://youtu.be/gEmXwgF0jCM> ili skeniranjem QR koda:

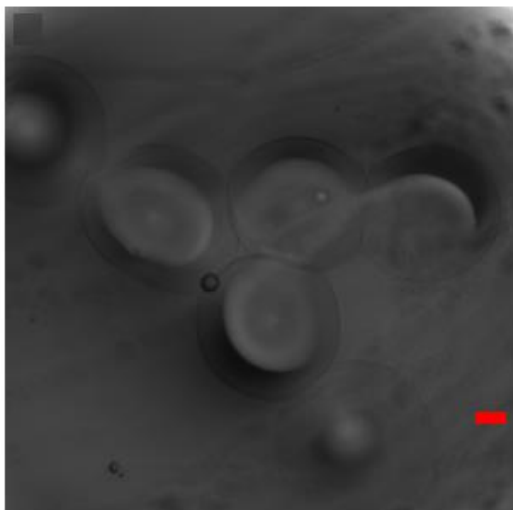


Slika 26. QR kod za video „Priprava mikročestica primjenom mikroreaktora“.

8.2. Izrada mikročestica na temelju kitozana

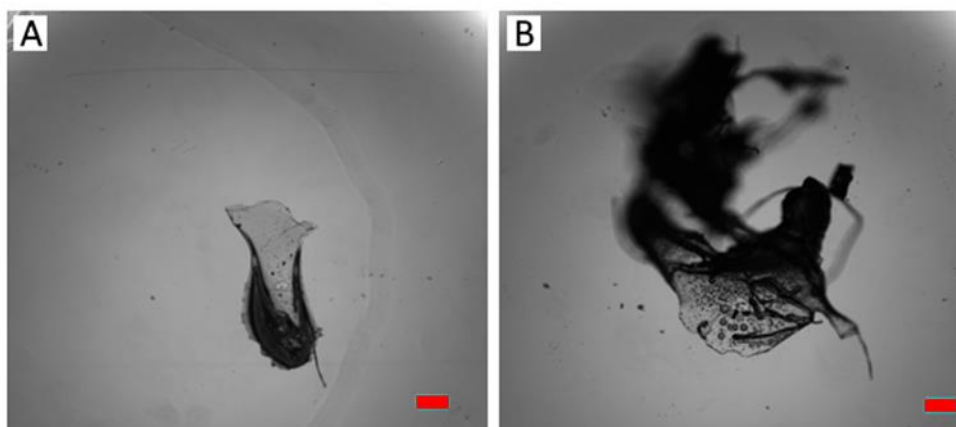
Za pripravu kontrolnih uzoraka (mikročestice na temelju kitozana, CHT) odlučeno je koristiti brzine protoka kontinuirane i dispergirane faze od 50 i 0,5 mL h⁻¹ jer je time zadržan literaturni omjer (100:1). Primijenjeni omjer je bio dovoljan za efikasno otjecanje produkta iz mikroreaktora do kolektora, pri čemu je osigurano dovoljno vremena za difuziju otopine NaOH kroz nastalu kapljicu polimerne (vodene) faze, a time i stvaranje CHT mikrogela. Kao medij

za neutralizaciju je korišten sustav N/E (1,25 mol dm⁻³ NaOH / 96 vol. % EtOH). Dobivene mikročestice su vidljive na slici 27, pri čemu je moguće zaključiti da nastale mikročestice nemaju pravilan oblik.



Slika 27. Mikročestice na temelju kitozana dobivene primjenom mikroreaktora. Uvećanje je 4×, a skala predstavlja 200 μm.

Nakon procesa sušenja dobivene su suhe mikročestice kontrolnog uzorka (CHT). Na slikama 28A i B vidljivi su nastali nepravilni oblici CHT mikročestica.



Slika 28. (A) i (B) Suhi uzorci kitozanskih mikročestica nakon procesa ispiranja i sušenja. Uvećanje je 4×, a skala predstavlja 200 μm.

Dobivene mikročestice na temelju kitozana (CHT) primjenom mikroreaktora korištene su kao kontrolni uzorci u ATR-FTIR analizi.

ŽIVOTOPIS

Zoran Malbaša [REDACTED] Završio je Osnovnu školu Kistanje 2014. godine, te iste godine upisuje srednju školu u Zagrebu – Srpska pravoslavna opća gimnazija Katarina Kantakuzina Branković. Također, od 2014. godine aktivno se bavi tradicionalnim karateom pod organizacijom JKA (*Japan Karate Association*). Nakon srednje škole, 2018. godine upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Kemija i inženjerstvo materijala na kojem, završetkom preddiplomskog studija, stječe zvanje Sveučilišni prvostupnik (*baccalaureus*) inženjer kemijskog inženjerstva. Od 2022. godine sudjeluje kao demonstrator na laboratorijskim vježbama na Zavodu za fizikalnu kemiju sve do 2024. godine. Potom, 2022. godine upisuje diplomski studij istoga smjera, tijekom kojeg kao koautor objavljuje rad *Copper–zinc/chitosan complex hydrogels: Rheological, degradation and biological properties* u prestižnom časopisu *Journal of Biological Macromolecules* (čimbenik odjeka = 7,7) te sudjeluje u brojnim izvannastavnim aktivnostima, poput revizije preddiplomskog studija Kemija i inženjerstvo materijala, sudjelovanje na natjecanju *BEST engineering competition* na kojem s timom osvaja drugo mjesto, prezentira rezultate istraživanja završnog rada na konferenciji *SmartCar*. U četvrtome semestru diplomskog studija dobiva *Erasmus* stipendiju za pohađanje stručne prakse na *Universitat Politècnica de València* u Centru za biomaterijale i tkivno inženjerstvo pod mentorstvom prof. Glorie Gallego Ferrer.