

UNIVERZITET U BEOGRADU  
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Željka S. Đurđević

**NANOKOMPOZITI  
SREBRO/POLI(N-VINIL-2-PIROLIDON) I  
SREBRO/ALGINAT  
DOBIJENI ELEKTROHEMIJSKIM POSTUPCIMA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Željka S. Đurđević

**SILVER/POLY(N-VINYL-2-PYRROLIDONE)  
AND SILVER/ALGINATE NANOCOMPOSITES  
OBTAINED BY ELECTROCHEMICAL  
PROCEDURES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

**Mentor:**

Dr Vesna Mišković-Stanković, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

**Članovi komisije:**

Dr Katarina Jeremić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Jelena Bajat, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Zorica Kačarević-Popović, naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke Vinča

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_ 2015. godine

## **Nanokompoziti srebro/poli(*N*-vinil-2-pirolidon) i srebro/alginat dobijeni elektrohemijским postupcima**

### **Rezime**

Cilj ove doktorske disertacije je elektrohemijско dobijanje i karakterizacija nanokompozitnih sistema srebro/poli(*N*-vinil-2-pirolidon) (Ag/PVP), i srebro/alginat (Ag/alginat), u obliku koloidnih disperzija i hidrogelova, za biomedicinsku primenu. Elektrohemijска sinteza, u odnosu na hemijску, pokazuje prednost u dobijanju malih čestica metala visoke čistoće, i to sa manjim brojem hemikalija, što je od izuzetnog značaja za primenu u biomedicini. Takođe, elektrohemijска sinteza daje mogućnost precizne kontrole veličine nanočestica, podešavanjem vrednosti gustine struje ili potencijala.

Izvršena je optimizacija elektrohemijсke sinteze nanočestica srebra u rastvorima PVP i alginata. Dobijene Ag/PVP i Ag/alginatne koloidne disperzije su karakterisane različitim fizičko-hemijским metodama radi izbora najefikasnijeg režima i uslova sinteze. U cilju dobijanja što veće koncentracije nanočestica, sfernog oblika, ispitan je uticaj potencijala, gustine struje, vremena implementacije, sastava rastvora za sintezu. Sastav, morfologija i struktura nanokompozitnih sistema su ispitani UV-vidljivom spektroskopijom, optičkom, transmisionom i skenirajućom elektronskom mikroskopijom, cikličnom voltametrijom, spektroskopijom infracrvene svetlosti sa Furijeovom (Fourier) transformacijom (FT-IR). Elektrohemijска sinteza nanočestica srebra u rastvoru PVP je vršena u galvanostatskim i potenciostatskim uslovima, kao i primenom reversne struje. Utvrđeno je da galvanostatska sinteza obezbeđuje veću koncentraciju dobijenih nanočestica, koja raste sa povećanjem primenjene gustine struje. Najveća koncentracija nanočestica srebra dobijena je galvanostatskom sintezom, gustinom struje od 62 mA cm<sup>-2</sup>, tokom 10 min. Veličina dobijenih nanočestica je oko 75 nm. FT-IR spektroskopijom je utvrđeno da se interakcija između molekula PVP i nanočestica srebra dešava ili na atomu azota ili na atomu kiseonika u pirolidonskom prstenu (u zavisnosti od veličine nanočestica) koordinacionim vezama sa nanočesticama srebra. Dobijeni rezultati ukazuju na vezivanje molekula PVP sa Ag nanočesticama, što potvrđuje

izbor PVP za stabilizaciju nanočestica srebra pri elektrohemijskoj sintezi. Koloidna disperzija Ag/PVP dobijena elektrohemijском sintezom je poređena sa istom dobijenom radijaciono-hemijском sintezom, metodom koja je ranije usvojena za dobijanje nanočestica metala. Pokazano je da se dobijaju disperzije istih ili sličnih svojstava, što potvrđuje izbor elektrohemijske sinteze kao jednostavne, isplative i čiste metode za dobijanje nanočestica metala.

Elektrohemijска sinteza nanočestica srebra u rastvoru Na-alginata je vršena u galvanostatskim uslovima. Utvrđeno je da koncentracija dobijenih nanočestica raste sa povećanjem koncentracije  $\text{Ag}^+$  jona u polaznom rastvoru, povećanjem primenjene gustine struje, kao i vremena implementacije. Najveća koncentracija nanočestica srebra dobijena je galvanostatskom sintezom, gustinom struje od  $50 \text{ mA cm}^{-2}$ , tokom 10 min. Veličina dobijenih nanočestica je bila u opsegu od 10 – 30 nm. Cikličnom voltametrijom i FT-IR spektroskopijom je utvrđeno da postoje tri mogućnosti za interakciju između molekula alginata i nanočestica srebra, i to vezivanjem hidroksilnih i etarskih grupa, kao i atoma kiseonika iz ostataka uronskih kiselina molekula alginata, koordinacionim vezama sa nanočesticama srebra. Ovi rezultati ukazuju na adekvatno vezivanje molekula alginata sa Ag nanočesticama, čime se opravdava izbor alginata za elektrohemijску sintezu nanočestica srebra. Ag/alginatne koloidne disperzije su korišćene za dobijanje Ag/alginatnih nanokompozitnih hidrogelova u obliku sfernih mikročestica, elektrostatičkom ekstruzijom. Pokazano je da Ag/alginatni nanokompozitni hidrogelovi u obliku mikročestica imaju zadovoljavajuća mehanička svojstva, i da nanočestice srebra ne narušavaju mehaničku stabilnost alginatnog gela. Takođe, utvrđena je koncentracija srebra u polaznom rastvoru kojom se dobijaju Ag/alginatni nanokompozitni hidrogelovi u obliku mikročestica koji pokazuju samo blago citotoksično dejstvo prema zdravim imunokompetentnim mononuklearnim ćelijama periferne krvi (PBMC), od 1 mM.

Poseban segment ove disertacije bilo je dobijanje nanočestica srebra elektrohemijским postupkom unutar polimerne matrice PVP hidrogela. Pokazano je da se veća koncentracija nanočestica srebra dobija sa povećanjem

provodljivosti rastvora u kom se bubri PVP hidrogel, kao i sa povećanjem primenjenog napona i vremena implementacije. Uslovi koji su odabrani kao optimalni za ovu vrstu sinteze su konstantna vrednost napona od 200 V i vreme od 4 min. Dobijeni Ag/PVP nanokompozitni hidrogelovi su pokazali dobra mehanička svojstva, koja ih opredeljuju za moguću biomedicinsku primenu u obliku obloga za rane. Takođe, produženo otpuštanje srebra, kao i postojanje antibakterijskog dejstva prema *S. aureus* potvrđuju adekvatnost ovog biomaterijala za navedenu primenu.

Ispitivanje citotoksičnosti u funkciji koncentracije srebra, i otpuštanja srebra u različitim hidrodinamičkim uslovima i primena drugog Fikovog zakona difuzije je iskorišćena za predviđanje performansi i moguće dužine primene Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova u različitim sredinama. Naime, pokazano je da Ag/PVP nanokompozitni hidrogel dobijen iz PVP hidrogela bubrenog u rastvoru  $\text{AgNO}_3$  koncentracije 1 mM ispoljava blago citotoksično dejstvo na PBMC, nakon 72 h otpuštanja srebra, što bi bilo vreme nakon kog bi trebalo ukloniti, odnosno promeniti oblogu za tretman rane (primena u statičkim uslovima). Sa druge strane, sistem koji simulira fiziološke uslove u artikularnoj hrskavici (bioreaktor sa dinamičkom kompresijom spregnutom sa perfuzijom simulirane telesne tečnosti) bi odgovarao implantatu mekog tkiva u sinovijalnom zglobu, npr. kolena. Korišćenjem drugog Fikovog zakona difuzije pokazano je da tokom vremena potrebnog za potpunu zamenu sinovijalne tečnosti u zglobu kolena (2 h) koncentracija otpuštenog srebra neće dostići vrednost za koju je pokazano da ima samo blago citotoksično dejstvo na PBMC.

Dobijeni rezultati ukazuju da bi Ag/PVP nanokompozitni hidrogelovi mogli biti primenljivi i kao obloge za tretman rana, i kao implantati za hrskavicu, bez nepovoljnih efekata u odnosu na okolno tkivo. Uz Ag/alginatne hidrogelove u obliku sfernih mikročestica, koji se mogu koristiti u inženjerstvu tkiva, rezultat ove doktorske disertacije predstavljaju obećavajući biokompatibilni materijali na bazi nanočestica srebra i polimera čiji potencijal primene treba istražiti i u *in vivo* uslovima.

**Ključne reči:** nanokompoziti; nanočestice srebra; poli(*N*-vinil-2-pirolidon); alginat; elektrohemijaska sinteza; bioreaktor; citotoksičnost; antibakterijska aktivnost

**Naučna oblast**

Hemija i hemijska tehnologija

**UDK broj**

661.857:620.3:542:87

## **Silver/poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone) and Silver/alginate Nanocomposites Obtained by Electrochemical Procedures**

### **Summary**

The objective of this doctoral dissertation is the electrochemical synthesis and characterization of silver/poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone) (Ag/PVP), and silver/alginate (Ag/alginate), nanocomposite systems, in forms of colloid dispersions and hydrogels, for biomedical purposes. The electrochemical synthesis, in comparison with the chemical, exhibits the advantages in obtaining of small metal nanoparticles of high purity, using smaller number of chemicals. This becomes of a great importance in biomedical applications. Electrochemical synthesis also gives a possibility of a precise particle size control, by the adjustment of the applied current density or potential.

The optimization of the electrochemical synthesis of silver nanoparticles in PVP and alginate solutions was performed. As obtained Ag/PVP and Ag/alginate colloid dispersions were characterized by various physico-chemical methods in order to find the most efficacious regime and conditions of the synthesis. Aiming the highest possible nanoparticle concentration, the influence of the applied potential, current density, implementation time and the synthesis solution composition were examined. The composition, morphology and the structure of nanocomposite systems were investigated by UV-visible spectroscopy, optic, transmission and scanning electron microscopy, cyclic voltammetry and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). The electrochemical synthesis of silver nanoparticles inside PVP solution was performed in galvanostatic and potentiostatic conditions, as well as by using a reverse current. It is determined that the galvanostatic synthesis provides higher concentration of the obtained silver nanoparticles, increasing with the increase of the applied current density. So, the highest concentration of silver nanoparticles is obtained galvanostatically, at the applied current density of  $62 \text{ mA cm}^{-2}$ , during 10 min. The size of the obtained silver nanoparticles was  $\sim 75 \text{ nm}$ . FT-IR spectroscopy results showed the interaction between PVP



molecules and silver nanoparticles by coordination bonding either at nitrogen or oxygen atom of the pyrrolidone ring of PVP molecule (depending on the nanoparticle size). These results suggest the bonding between PVP molecules and Ag nanoparticles, confirming that PVP is a good option for the stabilization of the silver nanoparticles during the electrochemical synthesis. Ag/PVP colloid dispersion obtained by the electrochemical synthesis was compared with one synthesized by gamma-irradiation method, which is previously adopted for metal nanoparticle synthesis. It is shown that the dispersions obtained were of the same or similar characteristics, making the electrochemical synthesis a method of choice for silver nanoparticle synthesis, being simple, cost-effective and clean method.

The electrochemical synthesis of silver nanoparticles inside sodium alginate solution is performed galvanostatically. It is shown that the concentration of the silver nanoparticles obtained increased with the increase of the Ag<sup>+</sup> ions concentration in the initial solution, as well as with the increase in the applied current density and the implementation time. The highest concentration of silver nanoparticles is obtained by galvanostatic synthesis, at the current density of 50 mA cm<sup>-2</sup>, during 10 min. The size of the silver nanoparticles obtained was in the range of 10 – 30 nm. Cyclic voltammetry and FT-IR spectroscopy results shown that there are three possibilities for the interaction between alginate molecules and silver nanoparticles: by coordination bonding of hydroxyl and ether groups, as well as the oxygen atoms from the uronic acid residues of the alginate molecule, and silver nanoparticles. These findings suggest the bonding between the alginate molecules and silver nanoparticles, justifying the alginate as a proper stabilization agent for the electrochemical synthesis of silver nanoparticles inside solution. Ag/alginate colloid dispersions were then used for production of the Ag/alginate nanocomposite hydrogels in the form of spherically shaped microbeads, by electrostatic extrusion. It is shown that Ag/alginate nanocomposite hydrogels in the form of microbeads exhibited appropriate mechanical properties, without hindering of the mechanical stability of the alginate hydrogel. Also, the concentration of the Ag<sup>+</sup> ions in the initial solution that leads to the production

of the Ag/alginate microbeads exhibiting only slight cytotoxic effects toward healthy immunocompetent peripheral blood mononuclear cells (PBMC) is determined to be 1 mM.

The particular segment of this thesis was the electrochemical synthesis of silver nanoparticles inside polymer network of PVP hydrogel. It is shown that higher concentration of silver nanoparticles is obtained with the increase in the conductivity of the solution used for swelling of PVP hydrogels, previously to the electrochemical synthesis of silver nanoparticles, as well as with the increase in both applied voltage and implementation time. The optimal conditions for the electrochemical synthesis of silver nanoparticles inside polymer network of PVP hydrogel are the constant voltage value of 200 V and implementation time of 4 min. Thus obtained Ag/PVP nanocomposite hydrogels exhibited good mechanical properties, making them applicable for biomedical use, as wound dressings. Also, the prolonged release of silver, resulting in antibacterial activity against *S. aureus* confirmed the biomedical potential of the obtained biomaterial.

The investigations of dose-dependent cytotoxicity and silver release in various hydrodynamic conditions, as well as the use of the second Fick's law of diffusion were applied for the predictions of performance and duration of the possible use of Ag/PVP nanocomposite hydrogels in different environments. Namely, it is shown that Ag/PVP hydrogel, obtained by swelling the PVP hydrogel in 1 mM AgNO<sub>3</sub> solution, exhibits mild cytotoxic effect against PBMC, after 72 h of silver release, suggesting that this would be the time after which the wound dressing should be removed, or changed (static conditions use). On the other hand, system simulating physiological conditions in articular cartilage (bioreactor with dynamic compression coupled with perfusion of the simulated body fluid) would represent the soft tissue implant in synovial joint, e.g. knee. By using the second Fick's law of diffusion it was shown that during the 2 h, which is the time necessary for the complete substitution of the synovial fluid in the knee joint, released silver concentration will not reach the value exhibiting even mild cytotoxic effect against PBMC.

The results of this thesis suggest the possible use of Ag/PVP nanocomposite hydrogels both as wound dressings as well as cartilage tissue implants, without undesired effects against the surrounding tissue. Combined with the Ag/alginate hydrogels in the form of spherical microbeads, applicable in tissue engineering, the outcome of this doctoral dissertation are promising biocompatible materials based on silver nanoparticles and polymers, whose application potential should be investigated in *in vivo* conditions.

**Key words:** nanocomposites; silver nanoparticles; poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone); alginate; electrochemical synthesys; bioreactor; cytotoxicity; antibacterial activity

**Scientific field**

Chemistry and chemical technology

**UDC number**

661.857:620.3:542:87

*Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za fizičku hemiju i elektrohemiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Deo eksperimentalnih tehnika urađen je na Katedri za hemijsko inženjerstvo, Katedri za analitičku hemiju i kontrolu kvaliteta i Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, u Laboratoriji za radijacionu hemiju i fiziku „Gamma” Instituta za nuklearne nauke Vinča Univerziteta u Beogradu i na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije.*

*Želim da se zahvalim mentoru prof. dr Vesni Mišković-Stanković na ukazanom poverenju, vođenju i podršci kroz rad na doktorskoj disertaciji. Prof. dr Katarini Jeremić se zahvaljujem na usrdnoj pomoći i savetima. Prof. dr Jeleni Bajat želim da se zahvalim na iskrenoj podršci, prenesenom znanju i saradnji, tokom rada na disertaciji, kao i u ostalim oblastima rada. Dr Zorici Kačarević-Popović dugujem iskrenu zahvalnost za podršku i pomoć u mom naučnom usavršavanju. Prof. dr Branislavu Nikoliću i prof. dr Bojani Obradović dugujem zahvalnost na iscrpnim diskusijama i korisnim savetima tokom rada na disertaciji.*

*Posebno se zahvaljujem dr Alekšandri Radosavljević na korisnim savetima, nesebičnoj pomoći i poklanjanju znanja, naročito na početku rada na doktorskoj disertaciji. Takođe, želim da se zahvalim Mr Jasmini Stojković za svesrdnu pomoć prilikom izrade eksperimentalnog dela disertacije, duge razgovore i zajednički rad tokom ovih godina. Zahvaljujem se kolegama dr Sanji Eraković, dr Ani Jančević, dr Ivani Jevremović, dr Mariji Došić i Radetu Surudžiću na smehu, pomoći i podršci tokom godina zajedničkog rada. Zahvalnost dugujem i Goranu Babiću na izradi aparatura i inventivnih alatki koje su eksperimentalni rad na doktorskoj disertaciji učinile znatno lakšim.*

*Želela bih da se zahvalim svojoj majci Saši na dragocenoj podršci, snazi i nesebičnoj pomoći koju mi pruža celog života, pa tako i tokom rada na doktorskoj disertaciji. Na kraju, ali ne i na posletku, zahvalna sam svom suprugu Špiru i kćerkji Leni na beskrajnom razumevanju i strpljenju, i pre svega ljubavi.*

*Mojoj majci, i mom ocu, koji bi se radovao...*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DEO</b> .....	<b>7</b>
2.1. METAL/POLIMER NANOKOMPOZITI .....	7
2.1.1. NANOČESTICE METALA.....	9
2.2. SREBRO/POLIMER NANOKOMPOZITI .....	10
2.2.1. NANOČESTICE SREBRA .....	10
2.2.1.1. Svojstva nanočestica srebra .....	10
2.2.1.2. Sinteza nanočestica srebra .....	12
2.2.1.3. Antimikrobno dejstvo nanočestica .....	17
2.2.1.4. Citotoksičnost .....	19
2.2.1.5. Polimeri za sintezu nanočestica srebra .....	21
2.3. HIDROGELOVI KAO NOSAČI AKTIVNIH SUPSTANCI .....	23
2.3.1. HIDROGELOVI SA SREBROM KAO AKTIVNOM SUPSTANCOM.....	26
2.3.2. PVP HIDROGELOVI .....	27
2.3.2.1. PVP hidrogelovi inkorporisani nanočesticama srebra.....	30
2.3.3. ALGINATNI HIDROGELOVI.....	30
2.3.3.1. Alginatni hidrogelovi sa nanočesticama srebra .....	33
<b>3. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>34</b>
<b>4. EKSPERIMENTALNI DEO</b> .....	<b>36</b>
4.1. MATERIJALI .....	36
4.2. PRIPREMA UZORAKA .....	37
4.2.1. ELEKTROHEMIJSKA SINTEZA Ag/PVP KOLOIDNIH DISPERZIJA .....	37
4.2.2. ELEKTROHEMIJSKA SINTEZA Ag/ALGINATNIH KOLOIDNIH DISPERZIJA.....	39
4.2.3. ELEKTROHEMIJSKA SINTEZA Ag/PVP NANOKOMPOZITNIH HIDROGELOVA	40
4.2.4. DOBIJANJE Ag/ALGINATNIH NANOKOMPOZITA U OBLIKU MIKROČESTICA.	41
4.3. TEHNIKE KARAKTERIZACIJE .....	42
4.3.1. TEHNIKE ISPITIVANJA SASTAVA, MORFOLOGIJE I STRUKTURE	
NANOKOMPOZITNIH SISTEMA .....	42
4.3.1.1. UV-vidljiva spektroskopija .....	42
4.3.1.2. Elektronska mikroskopija .....	43
4.3.1.3. Ispitivanje raspodele veličina nanočestica srebra u koloidnim disperzijama.....	43
4.3.1.4. Ciklična voltometrija.....	43
4.3.1.5. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom.....	44
4.3.1.6. Optička mikroskopija.....	44
4.3.2. TEHNIKE ISPITIVANJA POTENCIJALA ZA BIOMEDICINSKU PRIMENU	
NANOKOMPOZITNIH SISTEMA .....	44
4.3.2.1. Ispitivanje mehaničkih svojstava PVP i alginatnih hidrogelova, Ag/PVP i Ag/alginatnih	
nanokompozitnih hidrogelova u bioreaktorskim uslovima.....	44
4.3.2.2. Ispitivanje otpuštanja srebra iz Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova.....	47
4.3.2.3. Ispitivanje citotoksičnosti Ag/PVP i Ag/alginatnih nanokompozitnih hidrogelova .....	49
4.3.2.4. Ispitivanje antibakterijskih svojstava Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova agar	
difuzionom metodom .....	53
<b>5. REZULTATI I DISKUSIJA</b> .....	<b>54</b>
5.1. KOLOIDNE DISPERZIJE NANOČESTICA SREBRA I POLIMERA DOBIJENE	
ELEKTROHEMIJSKOM SINTEZOM.....	54
5.1.1. UV-VIDLJIVA SPEKTROSKOPIJA .....	57
5.1.2. TRANSMISIONA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA.....	66

5.1.3. RASPODELA VELIČINA NANOČESTICA .....	68
5.1.4. CIKLIČNA VOLTAMETRIJA .....	71
5.1.5. INFRACRVENA SPEKTROKOPIJA SA FURIJEVOM TRANSFORMACIJOM .....	75
5.2. Ag/ALGINATNI NANOKOMPOZITNI HIDROGEL U OBLIKU MIKROČESTICA DOBIJEN ELEKTROSTATIČKOM EKSTRUZIJOM .....	82
5.2.1. ISPITIVANJE MEHANIČKIH SVOJSTAVA ALGINATNIH I Ag/ALGINATNIH MIKROČESTICA U BIOREKTORSKIM USLOVIMA .....	84
5.2.2. ISPITIVANJE ZAVISNOSTI CITOTOKSIČNOSTI Ag/ALGINATNIH NANOKOMPOZITNIH HIDROGELOVA U OBLIKU MIKROČESTICA OD KONCENTRACIJE INKORPORISANOG SREBRA .....	87
5.3. Ag/PVP NANOKOMPOZITNI HIDROGEL DOBIJEN ELEKTROHEMIJSKOM SINTEZOM .....	90
5.3.1. UV-VIDLJIVA SPEKTROKOPIJA .....	90
5.3.2. VISOKO-REZOLUCIONA SKENIRAJUĆA ELEKTRONSKA MIKROKOPIJA .....	101
5.3.3. CIKLIČNA VOLTAMETRIJA .....	103
5.3.4. INFRACRVENA SPEKTROKOPIJA SA FURIJEVOM TRANSFORMACIJOM ...	107
5.3.5. BIOREKTORSKA EVALUACIJA MEHANIČKIH SVOJSTAVA .....	109
5.3.6. SORPCIONE KARAKTERISTIKE .....	114
5.3.7. ISPITIVANJE ANTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI Ag/PVP NANOKOMPOZITNIH HIDROGELOVA .....	116
5.4. CITOTOKSIČNOST I OTPUŠTANJE SREBRA IZ Ag/PVP NANOKOMPOZITNIH HIDROGELOVA KAO PARAMETRI PREDVIĐANJA PRIMENE U IN VIVO USLOVIMA ...	117
5.4.1. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI .....	118
5.4.1.1. Preliminarni eksperimenti .....	118
5.4.1.2. Ispitivanje zavisnosti citotoksičnosti Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova od koncentracije inkorporisanog srebra .....	118
5.4.2. ISPITIVANJE OTPUŠTANJA SREBRA IZ Ag/PVP NANOKOMPOZITNOG HIDROGELA .....	122
5.4.2.1. Difuzija .....	125
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>130</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>133</b>
<b>8. BIOGRAFIJA AUTORA .....</b>	<b>148</b>

## 1. UVOD

Srebro je metal koji je skoro oduvek prisutan u ljudskoj upotrebi. Vekovima se zna za njegova antimikrobna svojstva, pa su još i stari Egipćani, Grci i Rimljani koristili srebrno posuđe i escajg [1]. Optička svojstva srebra su korišćena i u umetnosti; poznat je Likurgov pehar (eng. *Lycurgus cup*) iz rimskog doba [2]. Za bojenje pehara je korišćena legura srebra i zlata u kojoj je dokazano prisustvo nanočestica, tako da je istorija korišćenja nanočestica metala veoma duga. Šta više, Glover (Glover) i saradnici su nedavno pokazali kako je nanočestice srebra i bakra moguće dobiti čak i u ambijentalnim uslovima [3]. Prema njihovim rezultatima, srebro, bilo u nano bilo u makro obliku generiše nanočestice ukoliko je izloženo vlažnom vazduhu ili vodi. Trofazni proces podrazumeva jonizaciju  $Ag^0$  i rastvaranje  $Ag^+$ , potom difuziju srebrnih jona od metala od kog potiču u adsorbovani sloj vode, i na kraju redukciju  $Ag^+$  pri ambijentalnim uslovima. Eksperimenti u kojima je korišćena bakarna žica su takođe rezultovali dobijanjem nanočestica bakra, ukazujući na mogućnost da se ovaj proces odvija na svim metalima koji su podložni oksidaciji, a mogu se redukovati pri ambijentalnim uslovima. Takođe, ovi navodi ukazuju da su nanočestice metala, nastale spontano u prirodnom okruženju, prisutne oduvek, i da su ljudi sa njima u neposrednom kontaktu.

Sa napretkom u nauci, javlja se ideja da se antimikrobno dejstvo srebra upotrebi na različite načine. Kako je pokazano da srebro u vidu nanokristala brže i efikasnije deluje na mikroorganizme nego u obliku katjona [4-6], intenzivirala su se istraživanja u okviru nanotehnologije srebra. Nauku je u stopu pratila industrija, tako da broj industrijskih proizvoda sa nanočestičnim srebrom čini preko 20 % od ukupnog broja proizvoda baziranih na nanotehnologijama, i raste [7]. Među njima su veoma različiti proizvodi, od odeće i obuće za fitnes, do filtera za vodu. Brojni su i proizvodi sa medicinskom namenom kao što su obloge za rane, medicinska sredstva, hirurške maske, impregnirani tekstilni materijali, nanogelovi, nanolosioni [8-11].



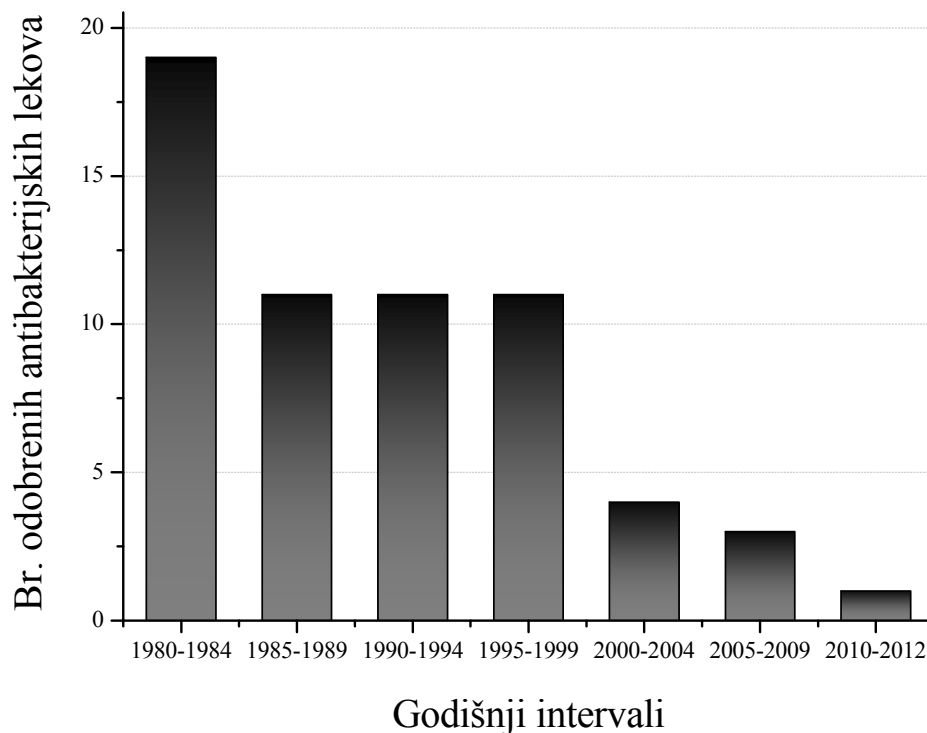
Neverovatna ekspanzija medicinskih materijala sa nanočesticama srebra nije slučajna. Naime, od pronalaska prvog antibiotika, pa do danas, istovremeno se izoluju novi mikroorganizmi, rezistentni na određene, ili čak sve, do tada poznate antimikrobne lekove (Tabela 1.1, [12]). Takođe, sam proces uvođenja novih antibiotika je skup i dugotrajan, pa je i broj odobrenih antibakterijskih lekova s godinama sve manji i manji, kao što se vidi sa dijagrama na slici 1.1 [12]. Nije novina ni činjenica da se još od 1980-ih nije pojavila nova klasa antibiotika [13]. Nedavno, objavljen je prodor u ovoj oblasti sa novim antibiotikom tzv. teiksobaktinom (eng. *teixobactin*), koji je pokazao veoma jako antibakterijsko dejstvo prema Gram-pozitivnim vrstama, čak i onim rezistentnim na postojeće lekove [14]. Ipak, i ovom leku tek predstoje ispitivanja na životinjskim modelima, pa tek onda kliničke studije, tako da u opštu upotrebu neće ući bar za 4-5 godina.

Na osnovu situacije sa antibioticima, koja se pogrešnom i nepotrebnom upotrebom pogoršava, bilo je neophodno uvesti nove antimikrobne agense, koji imaju jako dejstvo, a manju podložnost rezistentnosti. Nanočestično srebro, naravno, nije jedini takav materijal. Antimikrobna svojstva su pokazale i nanočestice koje sadrže azot monoksid, hitozan, nanočestice metala (Cu, Mg, Au, Bi) i oksida metala (ZnO, TiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), ugljenične nanotube... [15, 16]. Ipak, zbog svojih karakteristika, širokog antimikrobnog dejstva, različitih mogućnosti sinteze, dostupnosti, cene, nanočestično srebro je jedan od najprimenljivijih antimikrobnih agenasa. Zanimanje za nanočestice srebra je rezultat njihove značajne antimikrobne aktivnosti, mogućnosti smanjenja ukupne toksičnosti, i jednostavnosti inkorporisanja u brojne polimerne, odnosno biomaterijale uopšte [17].

Tabela 1.1. Hronologija primene antibiotika i pojave rezistentnih mikroorganizama [12]

Početak primene antibiotika	Otkriće rezistentnog mikroorganizma
	1940 Penicilin-R <sup>1</sup> <i>Staphylococcus</i>
1943 Penicilin	
1950 Tetraciklin	
1953 Eritromicin	
	1959 Tetraciklin-R <i>Shigella</i>
1960 Meticilin	
	1962 Meticilin-R <i>Staphylococcus</i>
	1965 Penicilin-R <i>pneumococcus</i>
1967 Gentamicin	
	1968 Eritromicin-R <i>Streptococcus</i>
1972 Vankomicin	
	1979 Gentamicin-R <i>Enterococcus</i>
1985 Imipenem, ceftazidim	
	1987 Ceftazidim-R <i>Enterobacteriaceae</i>
	1988 Vankomicin-R <i>Enterococcus</i>
1996 Levofloksacin	1996 Levofloksacin-R <i>pneumococcus</i>
	1998 Imipenem-R <i>Enterobacteriaceae</i>
2000 Linezolid	2000 XDR <sup>2</sup> <i>tuberculosis</i>
	2001 Linezolid-R <i>Staphylococcus</i>
	2002 Vankomicin-R <i>Staphylococcus</i>
2003 Daptomicin	
	2004/05 PDR <sup>3</sup> - <i>Acinetobacter</i> i <i>Pseudomonas</i>
	Ceftriakson-R <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
	2009 PDR- <i>Enterobacteriaceae</i>
2010 Ceftarolin	
	2011 Ceftarolin-R <i>Staphylococcus</i>

<sup>1</sup>R = rezistentan, <sup>2</sup> XDR = rezistentnost na skoro sve lekove koji bi bili razmatrani za tretman (eng. *extensively drug-resistant*), <sup>3</sup> PDR = rezistentnost na sve lekove koji bi bili razmatrani za tretman (eng. *pan drug-resistant*)



*Slika 1.1. Broj odobrenih antibakterijskih lekova u godišnjim intervalima [12].*

Karakteristična svojstva nanočestica metala, pa i srebra, su rezultat njihove velike specifične površinske energije, nastale usled visoke vrednosti odnosa površina/zapremina. Koliko posebnosti i pogodnosti donosi taj odnos, toliko i komplikuje sintezu samih nanočestica. Naime, velika vrednost specifične površinske energije teži da se smanji, i to rastom čestica, usled aglomeracije i/ili agregacije većeg broja manjih čestica, čime dolazi do gubitka specifičnih svojstava. Zbog toga se rast čestica sprečava i/ili kontroliše na različite načine. Uopšteno govoreći, sinteza nanočestica metala se vrši ili u organskim rastvaračima ili u prisustvu agenasa stabilizacije. Na taj način se obezbeđuju elektrostatička i elektrosterina odbijanja između pojedinačnih nanočestica, čime se sprečava njihova agregacija i kontroliše rast [18-20]. U nekim slučajevima, agens stabilizacije može istovremeno delovati i kao redukciono sredstvo.

Polimeri se koriste kao stabilizatori rasta nanočestica bilo u rastvoru, bilo u formi hidrogelova. Molekuli polimera inhibiraju proces agregacije čestica metala. Na taj način veličina čestica može biti kontrolisana unutar željenog opsega. Konvencionalne metode podrazumevaju prethodnu sintezu nanočestica srebra, a potom se polimer i nanočestice mešaju u cilju dobijanja nanokompozita tzv. *ex situ* metodama. Homogena disperzija nanočestica u polimernoj matrici *ex situ* metodama je problematična, jer nanočestice lako aglomerišu, a prisustvo nanočestica delom ometa umrežavanje polimera. Ipak, ove metode su pogodne za dobijanje hidrogelova različitih oblika. *In situ* metode podrazumevaju dobijanje nanočestica unutar prethodno dobijene polimerne matrice. Ove metode omogućavaju kontrolu sinteze i karakteristika kako hidrogela, tako i nanočestica. Trodimenzionalni hidrogelovi su se pokazali kao dobre matrice za sintezu nanočestica, posebno za biomedicinske primene. U ovu svrhu se biraju polimeri biokompatibilni sa biološkim molekulima, ćelijama i tkivima. Nanokristalno srebro se pokazalo kao najefikasniji antimikrobni agens, jer srebro ima snažnu antimikrobnu sposobnost i širok inhibitorni biocidni spektar za mikrobe uključujući bakterije, gljivice, viruse i eukariotičke mikroorganizme [21-23], kako u *in vitro*, tako i u *in vivo* uslovima. Visoka vrednost odnosa površina/zapremina nanočestica poboljšava njihova površinska svojstva, čineći nanočestice potencijalno značajno reaktivnijim od većih, čime se istovremeno uvećava mogućnost interakcije sa telesnim fluidima [24]. Za primenu u medicini je važno transportovati nanočestice srebra, kao aktivnu supstancu, s obzirom da je antimikrobno dejstvo često poželjno na tačno određenom mestu (topikalna primena), i tokom dužeg vremena (npr. kod primene obloga za rane, opekotine i sl.). U tom slučaju su hidrogelovi jako korisni nosači aktivne supstance [25], jer postaju rezervoari tj. donori nanočestica srebra. Na ovaj način se omogućava produženo antimikrobno dejstvo [26]. Morfologija, raspodela veličina čestica, stabilnost i svojstva nanočestica srebra kao i odgovarajućih nanokompozita veoma zavise od načina sinteze i specifičnih uslova eksperimenta. Šta više, primećen je uticaj veličine nanočestica srebra i na njihovu antibakterijsku aktivnost [27]. Ipak, sinteza nanočestica srebra željenog oblika i uniformnih dimenzija unutar polimerne matrice još uvek ostaje izazov.

Rad na ovoj doktorskoj disertaciji je osmišljen pod pretpostavkom da se elektrohemijom sintezom mogu dobiti nanokompoziti srebra i poli(*N*-vinil-2-pirolidona), odnosno natrijum-alginata, željenih svojstava za biomedicinsku primenu. Mogućnost dobijanja nanočestica srebra u rastvoru poli(*N*-vinil-2-pirolidona) elektrohemijom putem se može videti u ranije navedenim literaturnim podacima [28, 29], pri čemu je bilo potrebno izvršiti optimizaciju eksperimentalnih uslova sinteze. Elektrohemijom sinteza nanočestica srebra u rastvoru natrijum-alginata nije rađena pre ove doktorske disertacije. Takođe, sinteza nanočestica srebra unutar polimerne mreže hidrogela elektrohemijom putem nije pronađena u literaturi, već se zasniva na činjenici da do 90 % hidrogela čini voda u kojoj provodljivost električne struje zavisi od prisutnih jona. Potencijalna primena nanokompozita srebra i poli(*N*-vinil-2-pirolidona), odnosno alginata, zavisi od njihove biokompatibilnosti, odnosno pogodnosti primene u živim organizmima (odsustvo citotoksičnosti, odgovarajuća biomehanička svojstva), i antibakterijske aktivnosti koja zavisi od kinetike otpuštanja srebra, pa su ova svojstva i ispitivana. Uspeh u transferu nanotehnologije srebra ka kliničkoj primeni podrazumeva razvoj jednostavnih, isplativih preparata sa nanočesticama srebra, bezbednih po okolinu [30].

## **2. TEORIJSKI DEO**

### ***2.1. METAL/POLIMER NANOKOMPOZITI***

Nanokompozitni materijali su specifični u odnosu na klasične kompozite po tome što je u njima bar jedna dispergovana faza, tzv. punilac, reda veličine od 0,1 do 100 nm. Posebnu klasu nanokompozita čine polimerni nanokompoziti, koji za kontinualnu fazu, odnosno matricu imaju polimernu mrežu. U zavisnosti od primene, koriste se matrice i punioci traženih svojstava. Na primer, kao biomaterijali se koriste biokompatibilni (polimerni) nanokompoziti. Biomaterijali se primenjuju u biomedicini, tkivnom inženjerstvu, regenerativnoj medicini. U inženjerstvu tkiva, na primer, vrlo često se koriste hidrogelovi.

Hibridni materijali koji se sastoje i od organskih i od neorganskih komponenti su veoma značajni u polju nauke o materijalima, jer poseduju specifična svojstva iz kojih proizilaze brojne prednosti. Posebno su značajni u oblasti inženjerstva funkcionalnih materijala na nanometarskom nivou [31]. U najširem smislu, hibridni organsko-neorganski nanomaterijali su svi oni koji sadrže obe vrste komponenti, pri čemu je bar jedna od komponenti nanometarskih dimenzija [32-34].

Hibridni polimerni nanokompoziti su klasa materijala koja se sastoji od polimerne matrice ispunjene neorganskim ili hibridnim puniocima nanodimenzija [35, 36]. Razvoj novih materijala na bazi polimernih nanokompozita je veoma brz; poseban kvalitet ovih materijala se ogleda u činjenici da se značajno poboljšanje svojstava polimerne matrice postiže uz veoma nizak sadržaj punilaca ( $\leq 10$  mas. %), istovremeno uz lakšu obradu materijala, i smanjenje mase komponenti [37]. Svojstva nanokompozita su uslovljena karakteristikama nanopunilaca, njihovom raspodelom u materijalu i interakcijama sa polimernom matricom [38]. Stoga se u inženjerstvu polimernih nanokompozita pre svega ima u vidu njihova krajnja primena, za koju se razvija materijal koji poseduje najbolje karakteristike. Kombinuju se prednosti obe komponente nanokompozita, sa ciljem da im se umanje ili ako je moguće

eliminiraju nedostaci. U idealnom slučaju, teži se dobijanju nanokompozita u kojima komponente deluju sinergistički, čime dolazi do razvoja materijala novih ili poboljšanih svojstava. S obzirom na izuzetnu raznovrsnost u mogućnostima kombinovanja komponenti, polimerni nanokompoziti su našli upotrebu u brojnim oblastima, kao što su vojna industrija, bezbednost, zaštitna odeća, auto- i avio-industrija, elektronika, optički i medicinski uređaji [37]. Nanočestice metala su postale značajna komponenta elektrohemijskih senzora [39]. Izuzetna provodljivost i katalitička aktivnost čini nanočestice metala pogodnim za korišćenje u obliku takozvanih „elektronskih žica“ (eng. *electronic wires*) kojim se poboljšava transfer elektrona između redoks centara u ciljanim molekulima i površine elektrode. Takođe, usled specifične strukture i nanometarskih dimenzija, nanočestice metala su se pokazale kao kvalitetni elektrohemijski katalizatori [40].

Kao metalni punioci koriste se nanočestice različitih metala. Najbrojniji su primeri upotrebe plemenitih metala, ali nisu samo oni korišćeni kao komponente polimernih nanokompozita. Na primer, polimerni nanokompoziti mogu imati svojstva poluprovodnika. U tu svrhu, elektrohemijskom oksidativnom polimerizacijom tiofena u prisustvu nanočestica nikla dobijeni su politiofen-nikl nanokompoziti. Nanočestice nikla su dobijene hemijskom redukcijom Ni-hlorida hidrazinom, na povišenoj temperaturi, u prisustvu polivinilpirolidona kao agensa stabilizacije rasta nanočestica [41]. U drugom slučaju, polimerni nanokompoziti su upotrebljeni za poboljšanje optičkih svojstava materijala tokom skladištenja, za primenu u solarnim ćelijama, na primer. Nanočestice srebra su dobijene u polimernoj matrici smeše polietilena, polimetilmetakrilata i polilaktida, u obliku tankog filma, i to termičkom redukcijom [42]. Takođe, polimerni nanokompoziti se dobijaju i od ko-polimernih formulacija. Tako, na primer, nanočestice teških metala su dobijene u hitozan-*g*-polistiren ko-polimeru. Na ovaj način, izvedeno je uklanjanje teških metala iz rastvora formiranjem kompleksa [43]. Nanočestice srebra i zlata, u različitim polimernim matricama, su ispitivane u cilju smanjenja fluorescencije, za primenu u hemijskim i biološkim sensorima visoke osetljivosti [44]. Novi katalizatori na bazi nanočestica paladijuma dobijeni su ko-polimerizacijom 2-

(acetoacetoksi)etil metakrilata sa etilmetakrilatom i etilenglikol dimetakrilatom [45].

### **2.1.1. NANOČESTICE METALA**

Primena nanočestica metala u brojnim oblastima, kao što su optika, elektronika, kataliza, skladištenje podataka, konverzija energije, medicina, i mnoge druge, posledica je njihovih specifičnih fizičko-hemijskih svojstava, značajno različitih od makroskopske faze metala. Za primenu nanočestica metala, a pre toga njihovu karakterizaciju, najznačajnija su optička svojstva. Tako je prisustvo nanočestica metala moguće vizuelno uočiti usled pojave intenzivnog obojenja koloidnih disperzija [46-49], a detektovati snimanjem apsorpcionog spektra u ultraljubičastoj i vidljivoj oblasti. Nanočestice metala uzrokuju pojavu karakteristične površinske plazmonske apsorpcije, odnosno apsorpcionog maksimuma. Pojava apsorpcione trake u vidljivoj oblasti spektra, sa tačno definisanim položajem apsorpcionog maksimuma, je posledica specifičnog ponašanja provodnih elektrona [50]. Kolektivne oscilacije provodnih elektrona unutar nanočestica metala, koje rasejavaju i apsorbuju svetlost tačno određene frekvencije, predstavljaju površinske plazmone čestica. Intenzivna apsorpcija, od koje i potiče intenzivno obojenje koloidnih disperzija [51], se javlja u trenutku kada je frekvencija elektromagnetnog polja u rezonanciji sa koherentnim oscilovanjem elektrona. Frekvencija oscilovanja, odnosno talasna dužina maksimuma apsorpcije,  $\lambda_{\text{maks}}$ , i širina apsorpcione trake zavise od veličine i oblika metalnih nanočestica, ali i koncentracije slobodnih elektrona i električne permitivnosti metala i sredine u kojoj su čestice dispergovane [50, 52].

Uopšteno uzevši, nanočestice metala mogu da se dobiju različitim metodama: hemijskom redukcijom u vodenim [53, 54] i ne-vodenim rastvorima [55], elektro-hemijskom sintezom [41, 56, 57], redukcijom pomoću ultrazvuka [58-61], redukcijom indukovanom ili katalizovanom fotohemijskim putem [62-64], sintezom indukovanom mikrotalasima [58, 67], radijaciono-hemijskom redukcijom [66-68], kao i biohemijskom redukcijom [69, 70]. Uočeno je da se, usled snažne tendencije nanočestica metala ka aglomeraciji, odnos površine i



zapremine nanočestica umanjuje, pa time i menjaju njihova svojstva. Stoga se razvijaju različiti pristupi za dobijanje nanočestica metala. Često se koriste agensi za stabilizaciju nanočestica, kao što su polimeri. U tom slučaju, nanočestice metala se dobijaju ili u rastvoru polimera, ili direktno u polimernim mrežama. Prirodni polimeri koji se najčešće koriste su bazirani na polietilenglikolu (PEG), a česti su primeri upotrebe ugljenih hidrata, kao što su skrob [71], dekstran [72] ili hitozan [73]. Od sintetičkih polimera, za stabilizaciju nanočestica najčešće se koriste polivinilpirolidon (PVP), polivinilalkohol (PVA), poli(2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA), poli(metil metakrilat) (PMMA) [74, 75].

## **2.2. SREBRO/POLIMER NANOKOMPOZITI**

Polimerni nanokompoziti sa inkorporisanim nanočesticama srebra su našli primenu u različitim oblastima. Komercijalno najeksploatisanije je antimikrobno dejstvo srebra, pa su stoga i najbrojniji primeri biomedicinske primene. U tom smislu, veoma je značajno da se za primenu u medicini izaberu komponente nanokompozita koje imaju željena svojstva, ali poseduju i biokompatibilnost [76], odnosno odsustvo imunološkog odgovora organizma na materijal, i biološku inertnost [77].

### **2.2.1. NANOČESTICE SREBRA**

#### **2.2.1.1. Svojstva nanočestica srebra**

Neka od osnovnih fizičko-hemijskih svojstava nanočestica srebra su veličina (koja uslovljava veličinu specifične površine, odnosno odnos površina/zapremina), oblik, površinsko naelektrisanje i eventualni zaštitni sloj (npr. polimera), aglomeracija, brzina rastvaranja [30]. Navedena svojstva su značajna za određivanje bioloških interakcija i efekata nanočestica na okolinu. Manje nanočestice, na primer, imaju veću specifičnu površinu, pa samim tim i veći antimikrobni potencijal, ali istovremeno i potencijalnu citotoksičnost [78]. Poznato je, takođe, da i oblik nanočestica srebra utiče na njihova fizičko-

hemijska svojstva [30]. U biomedicinske svrhe, najčešće se koriste nanočestice sfernog oblika, potom nanožice, nanoštapići, i nanokocke [79]. Kada se govori o površinskom naelektrisanju, veliki uticaj imaju zaštitni agensi, od čije prirode zavisi i naelektrisanje nanočestice. U zavisnosti od vrste naelektrisanja, različite su interakcije nanočestica srebra i živih sistema [80]. Aglomeracija, kao što je već rečeno, se javlja kod većine sintetisanih nanočestica. Pokazano je da se aglomeracija nanočestica srebra javlja u medijumu za kultivaciju, kao i u citoplazmi i jedru ćelija humanog hepatoma, HepG2 [81]. Aglomeracija može biti korisna kada se dešava unutar mikroorganizama, uzrokujući smanjenje njihovog dejstva, ili mikrobiocidno dejstvo. Ali ukoliko se desi u medijumu za kultivaciju, nanočestice srebra gube svoju antimikrobnu aktivnost, čime se umanjuje ili gubi njihova uloga. Zato je ispitivana stabilnost nanočestica sa različitim agensima stabilizacije u različitim medijumima za kultivaciju. Pokazano je da u biološkim medijumima, kakvi su npr. *Dubelco's Minimum Essential media* (DMEM), veštačke telesne tečnosti (Gamplov (Gample) rastvor, ALF rastvor), stimulišući fluidi (želudačna kiselina, pH 1.12), ili serum albumina govečeta (eng. *bovine serum albumin*, BSA), stabilnost nanočestica srebra stabilisanih PVP, PEG, odnosno citratom, opada tim redom, kao i da PVP-Ag i PEG-Ag nanočestice ne menjaju veličinu i oblik u ovim medijumima [82]. U jonskim fluidima, nije uočen uticaj jonske jačine, pH vrednosti ili vrste elektrolita na agregaciju PVP-Ag nanočestica, dok je u slučaju Ag nanočestica stabilisanih razgranatim polietileniminom (BPEI-Ag) uočena agregacija pod uticajem promene navedenih parametara [82]. U rastvorima hlorida natrijuma i kalcijuma, stabilnost nanočestica stabilisanih polimerima je opadala redom od Ag-PVP > Ag-kazein > Ag-dekstrin [83]. Smatra se da je jaka koordinativna interakcija između atoma azota u pirolidonskom prstenu PVP sa nanočesticama srebra značajan faktor stabilnosti ovih nanočestica u hloridnim rastvorima [83]. Izlaganje svetlosti je imalo značajno manji uticaj na stabilnost Ag-PVP nanočestica, u odnosu na nanočestice Ag-citrata, što potvrđuje značaj PVP kao agensa stabilizacije nanočestica srebra, usled snažnog vezivanja sa površinom nanočestica Ag [84]. Rastvaranje nanočestica srebra pod uticajem oksidacije površine dovodi do stvaranja jona srebra. Brzina rastvaranja zavisi od hemijskih i površinskih karakteristika nanočestica, i njihove veličine, a takođe i okolnog

medijuma [85]. Tako je npr. prilikom izlaganja nanočestica srebra stabilisanih citratom, PVP, i taninskom kiselinom jezerskoj i rečnoj vodi uočena značajna razlika u ponašanju nanočestica različite veličine. Naime, nanočestice veličine 5 nm stabilisane PVP i taninskom kiselinom su se izuzetno brzo rastvorile, za razliku od čestica veličine 50 nm [86]. Ipak, rastvaranje nanočestica je uopšte uzevši sporo, tokom čega nanočestice srebra mogu učestvovati u različitim procesima taloženja, agregacije, i različitih vidova interakcije sa okolinom [82].

#### **2.2.1.2. Sinteza nanočestica srebra**

Sinteza nanočestica se u najvećem broju slučajeva vrši fizičkim i hemijskim procesima. Nanokompozitni materijali koji sadrže nanočestice srebra se mogu dobiti korišćenjem dva pristupa, tzv. „odozgo-na-dole“ (eng. *top-down*) i „odozdo-na-gore“ (eng. *bottom-up*). *Top-down* pristup podrazumeva dobijanje nanočestica metala od makroskopskog metala, metodama dispergovanja. Primer ovog pristupa je elektrohemijsko dobijanje nanočestica srebra ili drugog metala korišćenjem anode, od metala čije se nanočestice žele dobiti, kao rastvorne elektrode [87-90]. Na ovaj način se, rastvaranjem metala putem elektrolize, dobijaju nanočestice. Sa druge strane, *bottom-up* pristup podrazumeva dobijanje nanočestica od atoma željenih metala, redukcijom njihovih jona, odnosno metodama agregacije. Najčešće je korišćena hemijska redukcija, a od redukcionih agenasa natrijum-borhidrid,  $\text{NaBH}_4$  [91] ili trinatrijum-citrat [92]. Takođe, elektrohemijskom redukcijom prekursora metala, u rastvorima, se mogu dobiti nanočestice [93].

Kao i druge nanočestice metala, nanočestice srebra je moguće dobiti različitim metodama, od sinteze mikrotalasima, pa do biosinteze, redukcijom biljnim ekstraktima, ili mikroorganizmima [94-96]. Pristupi su veoma različiti, s obzirom na veoma veliki broj istraživanja koja se bave ovom oblašću.

Dobijanje polimernih nanokompozita sa nanočesticama metala se može takođe izvesti primenom jednog od dva pristupa. *Ex situ* pristup dobijanja polimernih nanokompozita sa nanočesticama metala podrazumeva sintezu nanočestica, koje se naknadno disperguju u polimerne matrice. Obrnuto, *in situ* pristup predviđa dobijanje polimerne matrice željenih karakteristika, u kojoj se

formiraju nanočestice metala, bilo tehnikom raspada (termolitičkim, radiolitičkim ili fotolitičkim putem), bilo (elektro)hemijom redukcijom prekursora metala koji je prethodno rastvoren u polimernoj mreži [97]. Oba pristupa imaju svoje prednosti i mane. Ipak, kada su u pitanju istovetni sistemi, pokazano je da se primenom *in situ* pristupa dobijaju kompozitni materijali znatno poboljšanih svojstava [98].

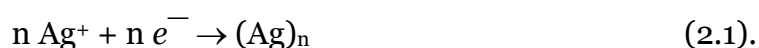
### ***Sinteza nanočestica srebra u polimernim rastvorima***

Kao što je već rečeno, osnovni problem sinteze nanočestica srebra jeste njihova tendencija da formiraju agregate, čime se umanjuju ili gube antimikrobna svojstva. Stabilizacija nanočestica, i kontrola njihovog rasta, se vrši uvođenjem agenasa stabilizacije, što su najčešće polimeri. Stabilizacija nanočestica srebra se objašnjava elektronskim (elektrostatičkim ili elektrosternim) interakcijama između funkcionalnih grupa polimera i nanočestica metala. Nukleofilni karakter funkcionalnih grupa polimera koji se koriste za sintezu nanočestica treba da bude dovoljno izražen da bi se nanočestice metala vezale donorskim elektronima [99], tako da se agensi stabilizacije biraju na osnovu mogućnosti vezivanja ili postojanja interakcija sa željenim nanočesticama. Zaštitni polimeri stvaraju koordinativne veze sa jonima metala, formirajući kompleks polimer/metalni jon, koji se lako može redukovati. Takav redukovani kompleks sadrži čestice metala manjih dimenzija i uže raspodele veličina čestica [100]. Efekat stabilizacije dobijenih nanočestica se ostvaruje na jedan od dva moguća načina: vezivanjem nanočestica za polimer ili inkapsulacijom nanočestica metala unutar strukture polimera [101]. U cilju primene u biomedicini, redukcionim i agensima stabilizacije moraju biti biokompatibilni [102].

Elektrohemijska sinteza nanočestica metala je vršena isključivo u rastvorima, i to dezoksiribonukleinske kiseline [93], PVP [103], polianilina (PANI) [104], polipirola [105] i tetraalkilamonijum soli [106, 107], ali ne i alginata. Ova metoda predstavlja tzv. *ex situ* princip sinteze. Kao što je rečeno, primena ovog pristupa podrazumeva sintezu nanočestica i njeno naknadno dispergovanje u polimernoj matrici. U ovom slučaju, nanokompoziti

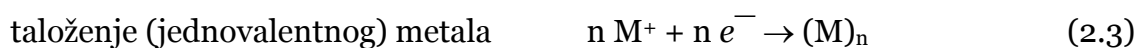
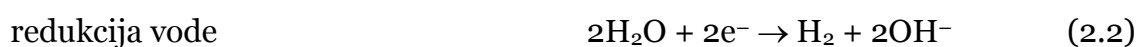
srebro/polimer se dobijaju geliranjem polimera prisutnog u koloidnoj disperziji nanočestica. Metoda kojom se vrši geliranje zavisi od samog polimera: metodom radijaciono-hemijske sinteze se geliraju PVP, poli(vinil alkohol), 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) [108-110], metodom naizmeničnih ciklusa smrzavanja i odmrzavanja se dobijaju hidrogelovi poli(vinil alkohola) [111], metodom jonske izmene se dobijaju alginatni hidrogelovi [112]. Ovaj način sinteze nanočestica srebra je pogodan za dobijanje nanokompozita u različitim oblicima. Tako se različitim metodama formiranja kapljica mogu dobiti nanokompoziti u obliku sfernih čestica različitih dimenzija, kao npr. hidrogelovi u obliku mikročestica sa inkorporisanim nanočesticama silicijum-dioksida [113], metodom elektrospininga se dobijaju nanokompozitna mikrovlakna [114, 115], dok se jednostavnim izlivanjem dobijaju ravne ploče, čija debljina zavisi od upotrebene zapremine koloidne disperzije. Mana naknadnog geliranja koloidne disperzije se ogleda u izostanku kontrole ravnomerne raspodele nanočestica srebra u nanokompozitu. Takođe, moguće je i blago pogoršanje mehaničkih svojstava usled nemogućnosti umrežavanja polimera na svim potencijalnim tačkama vezivanja, zbog prisustva nanočestica, što će biti pokazano na primeru srebro/alginatnog nanokompozita.

Elektrohemijski postupak dobijanja nanočestica srebra u rastvoru polimera podrazumeva elektrohemijsku redukciju jednovalentnih jona srebra pomoću električne struje. Prednosti elektrohemijske sinteze nanočestica srebra u rastvorima polimera u odnosu na ostale metode sinteze su dobijanje metalnih nanočestica visoke čistoće, što je posebno značajno kod biomedicinske primene, i mogućnost precizne kontrole veličine čestica, koja se postiže podešavanjem vrednosti potencijala ili gustine struje koja se koristi za sintezu nanočestica [29]. Elektrohemijska sinteza nanočestica metala je prvi put navedena u rezultatima istraživanja Reza (Reetz) i saradnika, koji su ukazali da se nanočestice prelaznih metala određene veličine mogu dobiti elektrohemijskim putem [87, 106, 116]. Elektrohemijska redukcija jednovalentnih jona srebra električnom strujom se odigrava na katodi, i može se predstaviti jednačinom (2.1):

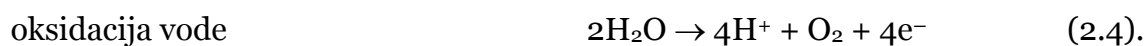


Kada se elektrohemijaska sinteza nanočestica metala vrši u vodenim rastvorima i pri relativno neutralnim pH vrednostima, što je neophodno za primenu u medicini, problem predstavlja taloženje jona plemenitih metala na katodi. Naime, taloženje metalnog filma na površini katode je termodinamički stabilan proces [29], koji se neometano dešava u odsustvu agenasa stabilizacije. Ovaj proces predstavlja tzv. kataforetsko taloženje [117], tokom kog se odigravaju reakcije na elektrodama prikazane jednačinama (2.2) – (2.4).

*Reakcije na katodi:*



*Reakcija na anodi:*



Dobijanje nanočestica metala elektrohemijaskim putem započinje redukcijom njihovih jona na katodi. Kako se dobijeni atomi ne bi nataložili na katodi u obliku filma, uvode se agensi stabilizacije čija je uloga da ubrzaju formiranje nanočestica srebra, i smanje taloženje metala na katodi [28]. U zavisnosti od izabranog agensa stabilizacije, reakcija na anodi može biti različita, dok reakcije na katodi ostaju iste. Atomi metala dobijeni elektrohemijaskom redukcijom jona metala se naknadno odvođe sa katode pomoću agenasa stabilizacije, u cilju sprečavanja taloženja metalnog filma, i ograničavanja aglomeracije u rastvoru. U procesu elektrohemijaska sinteze nanočestica metala sa dodatim agensom stabilizacije formiranje metalnog filma se znatno smanjuje ili potpuno izostaje. Istovremeno, stvaraju se koloidne disperzije nanočestica metala stabilisanih agensima stabilizacije.

Modifikovanjem uslova sinteze, može se dobiti velika količina dobro dispergovanih nanočestica srebra stabilizovanih polimerom u vodenom rastvoru elektrohemijaskim putem. Još jedna prednost elektrohemijaska sinteze nanočestica metala je i u tome što spoljašnje pobuđivanje sistema, npr. ultrazvučno, više nije neophodno, što značajno pojednostavljuje sintezu.

Dobijanje nanokompozitnih materijala za potencijalnu primenu u biomedicini zahteva precizno utvrđene uslove rada i izuzetnu čistoću materijala, tj. što manje primesa. Elektrohemijaska sinteza nanočestica obezbeđuje ovakve eksperimentalne uslove i svojstva materijala.

### ***Sinteza nanočestica srebra u hidrogelovima***

Sinteza u hidrogelovima, za razliku od sinteze u rastvorima, predstavlja *in situ* pristup u dobijanju polimernih nanokompozita. Prednost ovog pristupa se ogleda u mogućnosti sinteze ravnomerno raspoređenih nanočestica srebra u hidrogelnoj matrici tačno definisanih karakteristika. *In situ* redukcijom jona metala unutar hidrogelne matrice dobijaju se polimerni nanokompoziti sa gotovo homogenom disperzijom nanočestica metala, definisane veličine i morfologije [118]. Takođe, manji broj stupnjeva u procesu sinteze, kao i skraćanje vremena, bez dodatka dispergujućih agenasa u rastvor, čine *in situ* metod optimalnim pristupom za dobijanje polimernih nanokompozita, posebno za biomedicinsku primenu [119].

Nanometalno srebro se u hidrogelovima sintetise bubrenjem hidrogelova u rastvorima  $Ag^+$  jona i naknadnom redukcijom jona srebra. Redukcija  $Ag^+$  jona se može vršiti na različite načine: hemijskim putem [91, 92, 120], UV zracima, fotohemijskim ili radijaciono-hemijskim metodama [109, 121]. U slučaju hemijske redukcije, kao redukcionni agens se najčešće koriste natrijum-borhidrid [91] ili trinatrijum-citrat [92]. Elektrohemijaska sinteza do sada nije korišćena za dobijanje nanočestica metala u polimernim hidrogelovima. Inkorporisanje nanočestica metala unutar hidrogelova elektrohemijaskim postupkom omogućava kontrolu koncentracije, veličine i oblika nanočestica. Isto tako, elektrohemijaska sinteza nanočestica metala unutar polimernih hidrogelova u odnosu na druge metode *in situ* sinteze ima prednost značajno jednostavnijeg hemijskog sastava elektrolita i jednostavnije tehnike dobijanja uz korišćenje manjeg broja hemikalija i bolju kontrolu procesa. Time se postiže i bolja kontrola koncentracije, čistoće, oblika i veličine nanočestica metala u krajnjem proizvodu. Elektrohemijaska redukcija srebra u hidrogelovima podrazumeva

redukciju Ag<sup>+</sup> jona u metalno srebro pomoću električne struje, i prvi put će biti prikazana u rezultatima ove doktorske disertacije.

Sintetisane nanočestice srebra se razlikuju prema dimenzijama i obliku. Pokazano je da manje nanočestice poseduju bolja antimikrobna svojstva [122], pa je stoga poželjno dobiti što sitnije čestice. Za dobijanje nanočestica manjih dimenzija i finije raspodele veličina, važna je interakcija između hidrogela i prekursora metala. Jedan od uslova, osim načina sinteze, koji može da utiče na veličinu i morfologiju čestica jeste stepen bubrenja hidrogela u momentu redukcije čestica. Pokazano je da se manje čestice, sa ravnomernom raspodelom, dobijaju redukcijom jona u ravnotežno nabubrelim hidrogelovima [91]. Sa smanjenjem ravnotežnog stepena bubrenja, dobijaju se sve veće čestice različitih oblika. Veličina i morfologija nanočestica se mogu kontrolisati variranjem gustine umrežavanja, uvođenjem funkcionalnih grupa, i modifikacijom hidrogelnih mreža [120].

### **2.2.1.3. Antimikrobno dejstvo nanočestica**

Snažna antimikrobna aktivnost nanočestica srebra i prema Gram-pozitivnim i prema Gram-negativnim bakterijama [122, 123], niska toksičnost prema ćelijama sisara u niskim koncentracijama [124], i mogućnost razvoja nove generacije antibiotika su učinili nanočestice srebra izuzetno zanimljivim za pronalaženje alternativnih rešenja u borbi protiv mikroorganizama otpornih na postojeće lekove. Verovatnoća da će se pomoću nanočestica srebra prevazići opasnost od bakterija otpornih na brojne lekove je velika, s obzirom da je slaba mogućnost da mikroorganizmi razviju otpornost prema dejstvu nanočestičnog srebra [23]. Naime, dejstvo nanočestica srebra na mikroorganizme je višestruko, jer se ispoljava na više ciljanih mesta. Takođe, pokazano je da nanočestično srebro sprečava stvaranje biofilma [125], koji povećava otpornost mikroorganizama na spoljne uticaje, i dejstva lekova i medicinskih sredstava, usled čega se često javlja hronična infekcija organizma [23].

Osim prema bakterijama, nanočestice srebra pokazuju jako antimikrobno dejstvo prema širokom spektru mikroorganizama, što je verovatno posledica



postojanja višestrukih puteva njihovog dejstva. Pokazano je dejstvo i na bakterije otporne na lekove, gljivice, i viruse [23]. Nanočestice srebra imaju baktericidno dejstvo prema *P. aeruginosa* rezistentnoj prema više lekova, ampicilin-rezistentnoj *E. coli* O157:H7, i eritromicin-rezistentnoj *S. pyogenes*. Takođe, ukazano je na činjenicu da nanočestice srebra pokazuju isto dejstvo i prema navedenim vrstama, u obliku koji nije rezistentan na lekove, što navodi na zaključak da razvoj proteina u bakterijama koji ih štite od dejstva antibiotika nije efikasan protiv dejstva nanočestica srebra [126]. Dejstvo nanočestica srebra je dokazano u odnosu na *Phoma glomerata*, *P. herbarum*, *Fusarium semitectum*, *Trichoderma sp.* [127], *Aspergillus niger*, *A. foetidus*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *F. oxysporum* [128]. Takođe, nanočestice srebra su uspešne u borbi protiv visoko patogenih vrsta *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. Krusei*), koje učestvuju u brojnim infekcijama, posebno urinarnog trakta [129]. Antiviralno dejstvo nanočestica srebra je pokazano prema virusu humane imunodisuficijencije tip 1 (HIV 1) i virusu hepatitisa B (HBV) [130, 131].

Stepen antimikrobnog dejstva nanočestica srebra zavisi od većeg broja faktora, pre svega veličine i oblika nanočestica; manje čestice imaju veći potencijal antimikrobnog dejstva, kao i nanočestice trougaonog oblika, usled veće specifične površine [132, 133]. Takođe, postoje i komponente koje se vezuju za nanočestice srebra (to mogu biti i agensi stabilizacije pri sintezi) koje intenziviraju antimikrobno dejstvo nanočestica srebra [134, 135].

### ***Antibakterijsko dejstvo***

Brojni su primeri antibakterijskog dejstva nanočestica srebra. Nanočestice srebra su pokazale dejstvo prema *Escherichia coli* [122, 136], *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi* [137], *Staphylococcus aureus* [138, 139], *Salmonella typhimurium* [139].

Nanočestice srebra deluju antimikrobno preko više različitih mehanizama, što smanjuje mogućnost razvijanja otpornosti mikroorganizama na njih [23, 133, 140].

Među autorima postoji podela oko oblika srebra koje ima antibakterijsko dejstvo. Naime, jedni sugerišu da su to isključivo joni srebra, koji nastaju rastvaranjem nanočestica u vodenim rastvorima. Tako nastali  $Ag^+$  joni deluju antibakterijski vezivanjem za sumporne i fosforne grupe proteina ćelijskog zida i membrane bakterija [126, 132, 133, 140], stvarajući šupljine kroz koje citoplazma može da iscure van ćelije, što vremenom može izazvati njenu smrt [126, 133]. Navodi se mogućnost veće osetljivosti Gram-pozitivnih bakterija na jone srebra, usled tanjeg ćelijskog zida [141], kao i usled čvršćeg vezivanja sa lipopolisaharidima na spoljašnjoj membrani Gram-negativnih ćelija, što sprečava jone srebra da uđu unutar bakterije [126]. Kada jednom uđu u ćeliju, joni srebra imaju višestruko dejstvo [133]: inhibiraju transport elektrona citohromima, oštećuju DNK i RNK, inhibiraju deobu ćelije inhibiranjem DNK, onemogućavaju translaciju proteina, izazivaju stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika (eng. *reactive oxygen species*, ROS) koje su toksične kako za bakterijske ćelije, tako i za eukariotske ćelije.

Drugi pak sugerišu kako nanočestice srebra imaju sposobnost sidrenja/čvrstog vezivanja sa ćelijskim zidom bakterije, i postupnog prodiranja u ćeliju, čime dovode do strukturnih promena u ćelijskom zidu, i posledično do smrti ćelije [142]. Istovremeno, dolazi i do formiranja tačaka akumulacije nanočestica na površini bakterijske ćelije [122]. Takođe, ukazano je i na mogućnost stvaranja slobodnih radikala u prisustvu nanočestica srebra, kada dođu u kontakt sa bakterijama. Slobodni radikali, potom, oštećuju ćelijsku membranu, čine je poroznom, i dovode do smrti ćelije [138].

#### **2.2.1.4. Citotoksičnost**

Još uvek se diskutuje o tome da li je antimikrobno dejstvo nanočestica srebra, pa samim tim i toksičnost prema eukariotskim ćelijama, izraženije nego dejstvo jona srebra. Ispitivanja su brojna, a rezultati različiti. Tako na primer, PVP-stabilisane nanočestice srebra su se pokazale manje toksičnim u odnosu na jone srebra, prema ćelijama humanih monocita (THP-1) [143]. Nasuprot ovim istraživanjima, Piao (Piao) i saradnici su ispitivali citotoksičnost različitih formi srebra prema humanim ćelijama jetre, i pokazali da su u ovom slučaju

nanočestice srebra toksičnije od jona [144]. U obe studije, pokazan je uticaj koncentracije srebra na citotoksičnost. Ber (Beer) i saradnici su ispitivali međuzavisnost jona i nanočestica srebra, i citotoksičnost u funkciji njihovog odnosa u uzorku [24]. Pokazano je da nanočestice srebra slabo doprinose toksičnosti uzorka, u prisustvu većeg sadržaja jona srebra. Obrnuto, kada je udeo jona nizak ( $\leq 2,6\%$ ), nanočestice srebra deluju toksičnije od izvornog rastvora jona.

Kao što je rečeno, nanočestice srebra su veoma zanimljive za primenu u svim oblastima gde je neophodna antimikrobna aktivnost. Ipak, svojstva koja ih čine tako potentnim u uništavanju mikroorganizama, čine ih potencijalnom pretnjom po ljude i životnu sredinu [24]. Stoga je neophodno proceniti rizike izlaganja nanočesticama srebra, kako bi se ispitala njihova bezbednost, odnosno citotoksičnost [145]. Kao i antimikrobno dejstvo, i toksičnost je uslovljena veličinom, oblikom, hemijskim sastavom, površinskim naelektrisanjem nanočestica, ali i rastvorljivošću, sposobnošću njihovog vezivanja i uticaja na aktivna mesta u biološkim sistemima, kao i na metabolizam tih sistema [146, 147]. Ipak, biodistribucija, akumulacija u organima, degradacija, mogućnost neželjenih efekata i toksičnost nanočestičnog srebra nije dovoljno ispitana [148]. Detaljan molekularni mehanizam toksičnosti nanočestica srebra još nije razjašnjen. Moguće je da nedostatak fizičke barijere difuziji nanočestica srebra u ćelije određuje njihovu toksičnost. Za eukariotske ćelije postoji rizik od brze difuzije velike količine nano srebra, što bi dovelo do smrti ćelije. Do sada, materijali zasnovani na vodenim rastvorima koji uspešno kombinuju antimikrobna svojstva nanočestica srebra uz potvrđeno potpuno odsustvo citotoksičnosti još uvek nisu predloženi u literaturi.

Kako su rezultati ispitivanja citotoksičnosti nanočestica srebra vrlo kontradiktorni [149], zvanično naučno mišljenje Naučnog Komiteta Evropske agencije za bezbednost hrane (eng. *European Food Safety Authority* (EFSA)) jeste da se procena rizika upotrebe nanočestica vrši ponaosob, od slučaja do slučaja [150].

Potencijal bezbedne primene leži u mogućnosti modifikacije površine nanočestica. Naime, pokazano je i da se toksično dejstvo nanočestica srebra može umanjiti primenom određenih liganada, ili agenasa stabilizacije. Tako je na primer, pokazano da je citotoksičnost jona srebra značajno veća od citotoksičnosti nanočestica srebra, a kada se porede nanočestice srebra sa različitim agensima stabilizacije, citotoksičnost opada u nizu BPEI-AgNP > citrat-AgNP > PVP-AgNP [6].

### ***Antikancerogeno dejstvo***

Primena materijala u biomedicinske svrhe podrazumeva ispitivanje njegove citotoksičnosti. Veliki je broj istraživanja citotoksičnosti nanočestica srebra, i rezultati su protivurečni [149]. Međutim, citotoksičnost nije uvek negativna osobina. Naime, primenom nanočestica srebra na ćelije kancera različitog porekla, uočeno je njihovo antikancerogeno dejstvo. Nanočestice srebra ne samo da interaguju sa ćelijama kancera, već je pokazano da aktivno posreduju u molekularnim procesima, u cilju regulacije ćelijske funkcije [30].

Dejstvo nanočestica srebra je i u ovom slučaju širokog spektra, i pokazano je na ćelijama različitih kancera. Generalno antikancerogeno dejstvo nanočestice srebra ispoljavaju kroz inhibiciju formiranja novih krvnih sudova, što je značajno za razvoj različitih bolesti, pa i kancera [151]. Pokazano je, takođe, da nanočestice srebra deluju protiv ćelija različitih leukemija [152, 153], ćelija kancera dojke [154-156], različitih kancera jetre [81, 157], pluća [158-160], i kože [159].

#### **2.2.1.5. Polimeri za sintezu nanočestica srebra**

Za dobijanje polimernih nanokompozita sa srebrom koriste se različiti polimeri, u zavisnosti od primene nanokompozita. Posebnu grupu polimera čine takozvani biopolimeri, koji se koriste za primenu u medicini. To su prirodni polimeri, koji su široko dostupni, jeftini i po definiciji biokompatibilni [161]. Pre svega, koriste se karboksimetil celuloze i ugljeni hidrati, kao što je skrob, i to najčešće u obliku hidrogelova [162]. Ovi prirodni polimeri stabilišu nanočestice srebra kroz interakcije sa amidnim i hidroksilnim grupama, ali se dobijaju

nanočestice široke raspodele veličina. Značajno je pomenuti biodegradabilne celulozne matrice [163-165]. Nanokompoziti, efikasni u svom antimikrobnom dejstvu, sa homogenom distribucijom nanočestica srebra, dobijeni su redukcijom jona srebra UV zračenjem u celuloznoj matrici [163]. Karboksimetil celuloza, sa različitim supstituentima, kao veoma stabilan polimer dobre rastvorljivosti, i toksikološki bezbedan [165], je korišćena za dobijanje nanokompozita sa nanočesticama Cu, Ag, Fe i In za primenu u antimikrobnim prevlakama, za pakovanje hrane i medicinske svrhe [164].

U skorije vreme, značajna je ekspanzija u korišćenju hitozana, prirodnog polisaharida, koji je netoksičan, biodegradabilan i biokompatibilan [166]. Ipak, ovaj polimer ima ograničenu upotrebu, s obzirom na njegovu rastvorljivost, koja se menja u funkciji pH. Tako je nastao tzv. "Chitlac", 1-deoksilaktit-1-il hitozan, hitozan supstituisan laktozom, visoko razgranat polimer, biokompatibilan i bioaktivan, rastvorljiv na svim pH [167, 168]. Travan (Travan) i saradnici su pokazali dobijanje alginat-Chitlac hidrogelova, na čiju su površinu, potom, naneli nanočestice srebra [168]. Sam alginat, kao biokompatibilan i bioerodabilan prirodni polisaharid, koristi se dugo u prehrambenoj industriji, inženjerstvu tkiva. Alginat je korišćen kao agens stabilizacije za dobijanje nanočestica srebra, redukcijom indukovanom mikrotalasima, i dobijeni kompozit je pokazao efikasno antimikrobno dejstvo [65].

Biokompatibilnost neophodnu za primenu u medicini pokazuju i neki sintetski polimeri. Takav je npr. poli(akril amid) [169]. Takođe, poli(etilen glikol dimetakrilat) je korišćen za dobijanje mikrosfera inkorporisanih nanočesticama srebra [170], koje su se pokazale kao snažni antimikrobni agensi. Poli(vinil alkohol)-Ag (PVA-Ag) nanokompoziti su dobijeni UV zračenjem jona srebra *in situ* u PVA matrici. Pokazano je da se optička svojstva ovih materijala mogu definisati za upotrebu u vidu antirefleksivnih prevlaka, i optičkih filtera [171]. PVA se, kao biokompatibilan polimer, koristi i u biomedicinske svrhe, ali se zbog svojih mehaničkih svojstava često meša sa drugim polimerima. Tako su dobijeni ko-polimerni nanokompoziti hitozana i PVA, inkorporisani nanočesticama srebra, gama zračenjem, za upotrebu u vidu obloga za rane [172].

Takođe, pokazano je i da Ag-PVA nanokompoziti ispoljavaju antikancerogeno dejstvo, prema ćelijama kancera jetre [173]. Poli(vinil pirolidon), PVP, je korišćen za dobijanje nanokompozita PVP-Ag, elektrohemijskim putem, koji su pokazali antikancerogeno dejstvo prema ćelijama leukemije [152]. Za korišćenje u obliku obloga za rane, neophodno je PVP ko-polimerizovati sa drugim polimerom, zbog mehaničkih svojstava koja ne zadovoljavaju kriterijum za primenu u tom obliku. Tako je dobijen ko-polimerni nanokompozit hitozan-PVP sa inkorporisanim nanočesticama srebra, redukcijom jona srebra trinitrijum-citratom, koji je pokazao poboljšanje u zarastanju rana kod pacova, u poređenju sa oblogom od čistog hitozana [174].

Na kraju, potrebno je naglasiti da je za primenu u biomedicini, prehrambenoj industriji, i sl., osim izbora biokompatibilnih komponenti nanokompozita, neophodno izbegavati upotrebu organskih rastvarača, bilo kakvih toksičnih reagenasa, i agresivnih uslova sinteze koji bi ograničili potencijal primene srebro/polimer nanokompozita.

### ***2.3. HIDROGELOVI KAO NOSAČI AKTIVNIH SUPSTANCI***

Hidrogelovi predstavljaju trodimenzionalne, hidrofilne mreže polimernih vlakana, umrežene fizičkim ili hemijskim vezama, koje obezbeđuju strukturu mreže. Mreže se mogu sastojati od jednog (homo-) ili više polimera (ko-polimerni hidrogelovi). Specifičnost ovih materijala proističe iz njihove sposobnosti da vežu veliku količinu vode, ili bioloških tečnosti [25]. S obzirom na male količine gelirajuće supstance i veliki udeo tečnosti (i do 99 %), hidrogelovi imaju gustinu blisku vrednosti gustine vode, ali poseduju strukturnu povezanost čvrste supstance. Termodinamička kompatibilnost sa vodom im omogućava bubrenje u vodenim medijumima [25].

Brojne su primene hidrogelova, posebno u oblastima medicine i farmacije. Primenuju se kao ekspanteri u implantatima tkiva, kao materijal ili prevlaka za urološke katetere, i kao obloge za rane [175]. Hidrogelovi podsećaju

na prirodno živo tkivo više nego bilo koji drugi sintetski biomaterijali, i to usled visokog sadržaja vode, i meke konzistencije slične prirodnom tkivu [25]. Polimerni gelovi imaju veoma mali modul elastičnosti, pa uzrokuju minimalnu mehaničku iritaciju tkiva [176]. Takođe, hemijski su stabilni u živim sistemima, i propustljivi za niskomolekularne metabolite [177]. Hidrogelovi se mogu koristiti u različitim formama, kao biomaterijali, prevlake ili koloidne čestice dispergovane u vodenom medijumu.

Mehanička svojstva hidrogelova su veoma važna za primene u biomedicini i farmaciji. Sistemi za isporuku lekova su dizajnirani tako da zaštite osetljiva terapijska sredstva, i moraju ostati nenarušeni da bi mogli da zaštite aktivnu supstancu dok se ne oslobodi iz sistema; obloge za rane treba da ostanu nepromenjene strukture, kako bi se mogle zameniti. Stepem umreženja utiče na mehanička svojstva, i njegovom modifikacijom se mogu podešavati. Veći stepen umrežavanja podrazumeva veću jačinu gela, ali i krutiju strukturu. Potrebno je naći optimalni stepen umreženosti da se postigne relativno jak, a opet elastičan hidrogel. Željena mehanička svojstva se mogu postići i ko-polimerizacijom [25]. Na primer, ispitivanjima je utvrđeno da opseg u kom bi trebalo da se nađe vrednost Jangovog (Young) modula elastičnosti za hidrogelove sa potencijalnom primenom u vidu obloga za rane iznosi 1,5 – 150 kPa [178, 179], dok je vrednost Jangovog modula elastičnosti humane artikularne hrskavice između 1,9 i 14,4 MPa, pa nanokompozitni hidrogelovi za primenu u obliku implantata za meka tkiva, odnosno hrskavicu, treba da postignu značajno veću vrednost modula [180].

Dalje, neophodno je da materijali koji se koriste u biomedicini i farmaciji budu biokompatibilni. Usled visokog sadržaja vode, hidrogelovi se generalno smatraju biokompatibilnim materijalima, koji poseduju više obećavajućih svojstava [25]: minimalnu mehaničku iritaciju po *in vivo* implantaciji, zbog svoje mekoće, i elastičnosti; onemogućuju adsorpciju proteina i adheziju ćelija, usled niskog napona na granici faza voda/hidrogel; brojne mogućnosti inkorporisanja različitih individualnih lekova/aktivnih supstanci, različite hidrofilnosti i dimenzija molekula; izuzetne mogućnosti podešavanja i kontrole

otpuštanja inkorporiranih lekova, variranjem gustine umrežavanja i stepena bubrenja [181, 182].

Za biomedicinsku i slične primene neophodno je utvrditi i toksičnost hidrogelova. Toksičnost hidrogelova je uglavnom uzrokovana prisustvom neizreagovanih monomera, oligomera ili neiskorišćenih inicijatora umrežavanja, koji su neizbežni prilikom hemijskog umrežavanja [91, 92, 120, 183]. Kako biomedicinska primena hidrogelova zahteva čistiju sintezu, sa manje hemikalija, pribegava se drugim načinima sinteze. Jedna od takvih metoda jeste radijaciono-hemijska metoda umrežavanja hidrogelova [175, 184, 185], koja podrazumeva umrežavanje polimera iz rastvora pod nepromenljivim uslovima reakcije, bez upotrebe katalizatora, uz istovremenu sterilizaciju materijala i izostanak nusprodukata reakcije. Umrežavanje se vrši produktima radiolize vode, pre svega slobodnim elektronima. Istovremeno dolazi do stvaranja polimernih radikala koji dovode do konačnog umrežavanja polimera. Metoda umrežavanja zavisi od upotrebljenog polimera: radijaciono-hemijskom metodom se vrši umrežavanje PVP, poli(vinil alkohola), 2-hidroksietil metakrilata (HEMA) [109, 110, 175], hidrogelovi poli(vinil alkohola) se dobijaju i metodom naizmeničnih ciklusa smrzavanja i odmrzavanja [111], dok se metodom jonske izmene dobijaju alginatni hidrogelovi [112]. Osim hemijskog umrežavanja, sve navedene metode se smatraju adekvatnim za primenu hidrogelova u medicini.

Hidrogelovi su se pokazali kao veoma pogodni za primenu u sistemima za kontrolisano otpuštanje aktivnih supstanci, bioadhezivnim uređajima ili uređajima za ciljanu dostavu terapijskih agenasa tkivu [25]. Sistemi za isporuku aktivnih supstanci zasnovani na hidrogelovima se mogu koristiti za primenu u različitim tkivima, npr. u gastrointestinalnom traktu, tkivima oka i nosa, usnoj šupljini, u obliku transdermalnih nosača, ili kao potkožni implantati [25].

Isporuka leka u/na kožu se uobičajeno koristi za topikalnu primenu dermatoloških lekova za tretiranje kožnih bolesti, ili za dezinfekciju same kože.



Poslednjih godina, transdermalni put je uočen kao mogućnost za sistemsku primenu lekova. Poboljšanja koja se očekuju od transdermalne isporuke leka proizilaze iz mogućnosti duže isporuke leka konstantnom brzinom. Takođe, isporuka leka bi se mogla lako prekinuti jednostavnim uklanjanjem uređaja [25]. Ovaj vid primene značajno podseća na primenu hidrogelova sa nanočesticama srebra u vidu obloga za infektivne rane, gde je poželjno produženo dejstvo nanočestica srebra, koje se postiže njihovim inkorporisanjem u hidrogelne matrice.

Hidrogelovi se mogu dobiti i u različitim oblicima. Hidrogelovi u obliku mikročestica se mogu dobiti različitim metodama formiranja kapljica [113, 186, 187], hidrogelovi u obliku mikrovlakna se dobijaju metodom elektrospininga [114, 115]. Najjednostavniji metod oblikovanja hidrogelova jeste izlivanje, kojim se dobijaju ravne ploče, čija debljina zavisi od upotrebene zapremine koloidne disperzije.

### **2.3.1. HIDROGELOVI SA SREBROM KAO AKTIVNOM SUPSTANCOM**

Obloge u obliku hidrogelova su pogodne za tretman rana, jer su osmišljene tako da održavaju vlagu na površini rane. Na taj način se stvaraju pogodni uslovi za zarastanje rane, održavanjem hidratacije kože uz istovremeno stvaranje mogućnosti organizmu da se oslobodi nekrotičnog tkiva [188]. Stoga su brojna istraživanja usmerena ka pronalaženju obloga novog sastava i poboljšanih osobina. Tako je osmišljena nova formulacija hidrogela na bazi natrijumove soli 2-akrilamido-2-metilpropan sulfonske kiseline sa nanočesticama srebra za tretman rana. Antimikrobna svojstva nove obloge su poređena sa aktivnošću dve komercijalne obloge Acticoat™ i PolyMem Silver®, prema mikroorganizmima koji uobičajeno napadaju rane od opekotina: *P. aeruginosa*, *MSSA*, *A. baumannii*, *C. albicans*, kao i u odnosu na vrste otporne na antibiotike (meticilin-rezistentni *S. aureus*, vankomicin-rezistentni *Enterococcus*) [189]. Kao najdelotvornija u borbi protiv mikroorganizama pokazala se Acticoat™ obloga (kalcijum alginatni hidrogel sa inkorporisanim

nanokristalima srebra), dok druga komercijalno dostupna obloga PolyMem Silver® (poliuretanska pena sa inkorporisanim nanokristalima srebra) nije imala antimikrobno dejstvo prema većini testiranih mikroorganizama. Kako je nova formulacija izazvala opadanje bakterijskog preživljavanja za 94–99 % nakon 24 h izlaganja, zaključeno je da ima potencijal u primeni za tretman rana. Das (Das) i saradnici su pokazali mogućnost primene hidrogelne obloge na bazi karboksimetil celuloze sa inkorporisanim nanočesticama srebra (SNP-CMC), dobijenim *in situ*, termičkom redukcijom [190]. Nanokompozit SNP-CMC nije citotoksičan prema humanim ćelijama kože, a pokazuje adekvatno antimikrobno dejstvo.

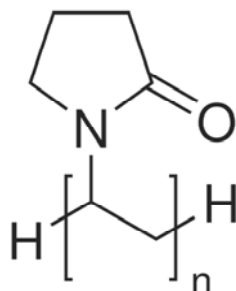
Hidrogelovi se koriste i u stvaranju aktivnih formulacija za tretman zarastanja rana, jer se lako formiraju i oblikuju u željene forme, i omogućavaju kontinualnu isporuku lekova, odnosno aktivne supstance [191]. Brzina otpuštanja zavisi od veličine pora hidrogela, pa se može kontrolisati promenom stepena umreženosti polimera, ili stepena bubrenja [189, 192]. Takođe, isporuka lekova se može pospešiti i na drugi način. Naime, pokazano je da prisustvo nanočestica srebra omogućava ili ubrzava isporuku lekova. Prisustvo nanočestica srebra u slojevitim kapsulama polielektrolita (naizmenični slojevi poli(alilamin hidrohlorida) i dekstran sulfata) je omogućilo prskanje kapsula i izlivanje leka (FITC-dekstran), što ovaj sistem čini potencijalno primenljivim za isporuku lekova, ali i u oblasti materijala, biohemiji i slično [193]. Takođe, nanočestice srebra su povećale kapacitet bubrenja hidrogela hitozana, u obliku čestica, i na taj način produžile isporuku leka, omogućujući bolju kontrolu otpuštanja. Povećanje sadržaja nanočestica srebra je dovelo do još većeg poboljšanja ovog sistema za transport i isporuku aktivne supstance [194].

### **2.3.2. PVP HIDROGELOVI**

Poli(*N*-vinil-2-pirolidon), PVP, je hidrofilni polimer. Biokompatibilan je, pa je stoga bezbedan za upotrebu u biološkim eksperimentima [195]. PVP je jedan od najviše korišćenih polimera u medicini zbog svoje rastvorljivosti u vodi i izuzetno niske citotoksičnosti [184]. U literaturi se nalaze podaci o lokalnoj

primeni PVP na kožu, za transdermalnu isporuku lekova [196]. PVP se uspešno koristi kao osnovni materijal za dobijanje obloga za rane na bazi hidrogelova, pokazuje dobru biokompatibilnost i u širokoj je primeni i kao sistem za otpuštanje lekova.

Na slici 2.1 prikazana je molekulska struktura poli(*N*-vinil-2-pirolidona).

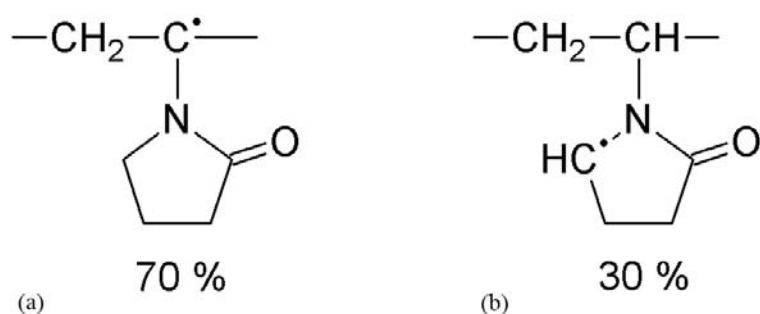


*Slika 2.1. Molekulska struktura poli(N-vinil-2-pirolidona).*

Umrežavanje PVP se vrši radijaciono-hemijskom metodom, bezbednom za dalju primenu materijala u biomedicinske svrhe. Zračenjem se, istovremeno, vrši umrežavanje i sterilizacija materijala. U vodenim rastvorima polimera zasićenim argonom, OH<sup>•</sup> radikali, nastali pod uticajem gama zračenja, reaguju sa makromolekulima PVP preuzimajući atome vodonika, čime se formiraju PVP makroradikali. Većina makroradikala (oko 70 %) je lokalizovana na glavnom lancu polimera i formirana kao rezultat preuzimanja vodoničnog atoma iz metilidinske grupe (slika 2.2 a). Štaviše, preuzimanje atoma vodonika se dešava i na metilenskoj grupi u meta položaju u odnosu na atom azota u prstenu pirolidona (slika 2.2 b) [197, 198]. Rezultat rekombinovanja dobijenih PVP makroradikala (slika 2.2) je formiranje polimerne mreže, odnosno hidrogela.

Prednost radijaciono-hemijskog formiranja polimerne mreže je u izostanku hemijskih umreživača, i pomoćnih agenasa, kakvi su inicijatori i aktivatori. Rezultat je čist i istovremeno sterilisan materijal, što je veoma važno za potencijalnu primenu u medicini. Ovaj metod sinteze se lako kontroliše. Ograničenja se ogledaju u nemogućnosti sinteze svih vrsta hidrogelova.

PVP je jedan od hidrogelova sa visokim stepenom bubrenja. Visokim stepenom bubrenja smatraju se vrednosti od 5 – 100 (nekad i do 1000) [199]. Stepem bubrenja hidrogelova dobijenih radijaciono-hemijskim umrežavanjem zavisi od ukupne doze zračenja primenjene za umrežavanje [175, 199]. Za istu vrednost početne koncentracije monomera, pokazano je da sa porastom doze zračenja primenjene za umrežavanje, opada stepen bubrenja [199]. Tako, za rastvor koji je sadržao 10 mas. % vinil pirolidona, za hidrogelove dobijene umrežavanjem dozama zračenja vrednosti od 10, 20, 30 i 40 kGy stepen bubrenja je iznosio 55, 40, 35 i 32 g H<sub>2</sub>O/g suvog gela (kserogela), redom. U drugoj studiji, PVP hidrogel dobijen iz 15 mas. % rastvora PVP umrežavanjem sa 10, 20 i 30 kGy je pokazao stepen bubrenja od 27, 16, 14 g H<sub>2</sub>O/g suvog gela, redom [175].



*Slika 2.2. Strukture i frakcije PVP makroradikala.*

PVP hidrogelovi poseduju mehanička svojstva adekvatna za primenu u biomedicini. Vrednosti Jangovog modula elastičnosti PVP hidrogelova dobijenih hemijskim umrežavanjem se kreću u opsegu od 19–504 kPa [200]. Kako su vrednosti modula elastičnosti potrebne za primenu u obliku obloga za rane u opsegu od 1,5–150 kPa [178, 179], PVP hidrogelovi su pogodni za ovu svrhu. Međutim, za primenu u obliku implantata za meka tkiva, npr. za zamenu tkiva hrskavice, potrebni su čvršći hidogelovi, vrednosti modula elastičnosti u opsegu od 1,9–14,4 MPa [180]. Slično je i u slučaju implantacije za zamenu *nucleus pulposus* gde su ciljane vrednosti modula elastičnosti u opsegu od 0,2–0,4 MPa, pa se PVP ko-polimerizuje sa drugim polimerima, npr. PVA [201].

Visoka vrednost stepena bubrenja i mehanička svojstva čine PVP hidrogel pogodnim i za ponovnu rehidraciju. Ova svojstva su od posebnog značaja za elektrohemijsku sintezu nanočestica srebra u hidrogelu, jer visok stepen bubrenja omogućuje dobru provodljivost električne struje, a elastičnost i mogućnost rehidracije obezbeđuju celost hidrogela tokom sinteze.

### **2.3.2.1. PVP hidrogelovi inkorporisani nanočesticama srebra**

PVP je jedan od polimera pogodan i za imobilizaciju metalnih nanočestica, zbog snažnog afiniteta piridil-grupe ka metalima i sposobnosti PVP da se vezuje vodoničnim vezama sa polarnim grupama [202]. Nanočestice pojedinih metala i poluprovodnika su uspešno sintetisane u prisustvu PVP u rastvoru [203].

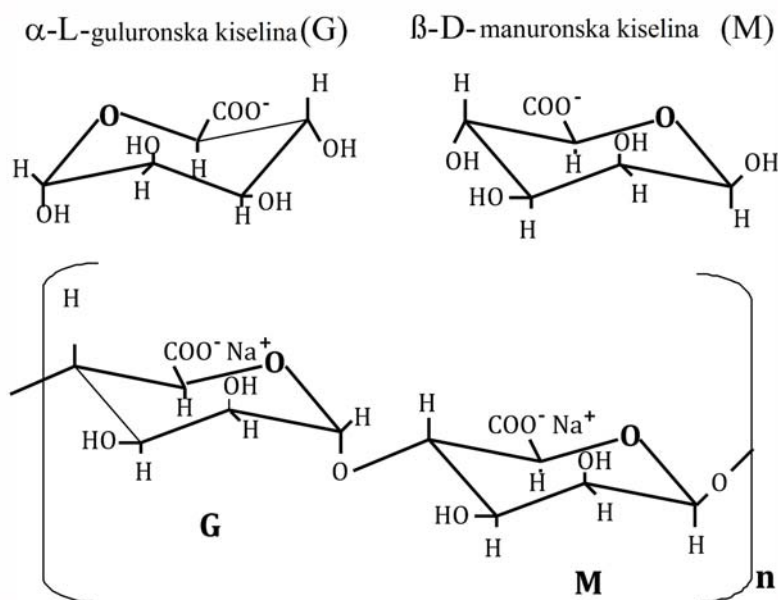
Iako je pokazano da PVP hidrogelovi imaju svojstva zadovoljavajuća za primenu u medicini, npr. u vidu obloga za rane [175] retko se koristi samostalno. Tako je veoma često korišćen kao ko-polimer sa PVA. Nanočestice srebra dobijene hemijskom redukcijom natrijum-borhidridom, su uspešno inkorporisane u PVA-PVP hidrogel dobijen radijaciono-hemijskim umrežavanjem. Dobijeni su nanokompoziti čija svojstva ukazuju na mogućnost primene ovih materijala u obliku obloga za rane [204]. Takođe, nanočestice srebra dobijene hemijskom redukcijom trinatrijum-citratom, su inkorporisane u ko-polimerni hidrogel PVA-PVP dobijen naizmeničnim ponavljanjem ciklusa smrzavanja i odmrzavanja. Pokazano je da dobijeni nanokompoziti imaju značajno antibakterijsko dejstvo prema *E. coli* i *S. aureus* [205].

Nanočestice srebra su uspešno inkorporisane unutar ko-polimernih nanogelova poli(akrilna kiselina)-PVP [206]. Ovaj sistem je kreiran sa namerom da se upotrebi za isporuku lekova, i sisteme za biomedicinska snimanja.

### **2.3.3. ALGINATNI HIDROGELOVI**

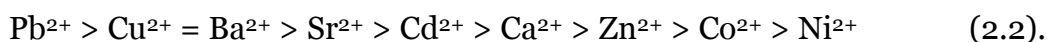
Alginat je prirodan, hidrofilan polisaharid, poreklom iz morskih algi (smeđe alge *laminarija Hiperborea*) ili zemljišnih bakterija (*Azobacter vinelandii*). Alginska kiselina je anjonski bipolimer koji se sastoji od linearnih

kopolimernih lanaca  $\alpha$ -L-guluronske i  $\beta$ -D-manuronske kiseline, povezanih 1,4-glikozidnim vezama [207]. Komercijalno je dostupna u vidu natrijumove soli (slika 2.3).



Slika 2.3. Strukturne formule monomernih jedinica Na-alginata,  $\alpha$ -L-guluronske kiseline (G jedinica),  $\beta$ -D-manuronske kiseline (M jedinica), i natrijum-alginata.

Specifična svojstva ovog polisaharida su visok stepen rastvorljivosti u vodi, tendencija za geliranjem u odgovarajućim uslovima, pri čemu se dobijaju gelovi visoke poroznosti, biokompatibilni, i ne-toksični [208]. Alginatni hidrogelovi se dobijaju jonskom izmenom natrijuma dvovalentnim jonima metala. Alginati pokazuju veliki afinitet prema katjonima, koji opada u sledećem nizu (2.2):



Za umrežavanje alginata se uobičajeno koristi  $\text{CaCl}_2$ . Proces geliranja natrijum-alginata se može predstaviti reakcijom jednostavne zamene jona natrijuma jonima kalcijuma pri čemu nastaje kalcijum-alginat:



Sastav alginata, odnosno udeo i redosled G i M jedinica, je veoma značajan podatak, jer od sastava direktno zavise fizička svojstva alginatnih hidrogelova [209, 210], kao i karakteristike koje uslovljavaju primenu alginata kao matrice za imobilizaciju, odnosno isporuku aktivnih supstanci [211]. Sadržaj i distribucija G i M jedinica zavise od vrste, i starosti alge iz koje je alginat izolovan, kao i od lokacije na kojoj je rasla [212]. Stoga sastav komercijalnih alginata veoma varira; uočene su i razlike u M/G odnosu kod alginata dobijenih iz istog izvora.

Alginat je široko ispitivan kao biomaterijal, usled brzog i lakog formiranja jonskih kompleksa sa dvovalentnim katjonima. Alginatni gel je bioerodabilan [213, 214], odnosno podložan degradaciji u živim sistemima, koja može biti kontrolisana. Po strukturi, ovi hidrogelovi su podesni nosači za isporuku lekova, i to u obliku mikro- i nanočestica [195]. Stoga su brojni primeri upotrebe alginatnih gelova za isporuku lekova, i drugih aktivnih supstanci. Kada se koristi bioerodabilan nosač u obliku hidogela, aktivna supstanca sporo difunduje iz hidrogela, kako njegova struktura postepeno bubri [215]. Alginatni hidrogelovi su nestabilni pod uslovima u kojima postoji mogućnost reverzibilne jonske izmene monovalentnih katjona za dvovalentni katjon, što se koristi u modelovanju mehaničkih svojstava i različitih profila degradacije [216]. Alginatni gelovi se koriste i za inkapsulaciju. Čestice alginatnih hidrogelova, sa željenom supstancom unutar gela, se dobijaju ukapavanjem rastvora alginata u rastvor  $\text{CaCl}_2$ . Na ovaj način se, na primer, stabilišu faktori rasta ćelija, i njihova isporuka u rastvoru se produžava na preko 14 dana [207]. Postoje primeri inkapsulacije i kultivacije živih ćelija u alginatnim hidrogelovima [217-219]. Veličina čestica za inkapsulaciju može varirati od primenjenih uslova formiranja. Na primer, mikročestice alginatnog gela se mogu dobiti elektrostatičkom ekstruzijom [220].

### 2.3.3.1. Alginatni hidrogelovi sa nanočesticama srebra

Inkorporacija nanočestica srebra u alginatne hidrogelove je veoma nova tema. Do skoro su nanočestice srebra nanošene samo na površinu alginatnih hidrogelova, i to kompozita sa hitozanom supstituisanim laktozom (1-deoksilaktit-1-il hitozan, visoko razgranat polimer, biokompatibilan i bioaktivan, rastvorljiv na svim pH), komercijalnog naziva "Chitlac" [168]. Primera nanošenja nanočestica srebra na površinu alginatnog gela ima još; Velmurugan (Velmurugan) i saradnici su proizveli Na-alginatne čestice na koje su naneli nanočestice srebra, za primenu u katalizi [221]. Katalitičku aktivnost su pokazali i hidrogelovi alginata sa nanočesticama srebra na površini [222].

Rezultati koji navode inkorporaciju srebra u alginatu su objavljeni u protekle dve godine: nanokompozitne čestice hidrogela na bazi kopolimera trimetil hitozana (TMC) i alginata sa inkorporisanim nanočesticama srebra dobijene su ukapavanjem smeše rastvora alginata i prethodno dobijenih nanočestica srebra, u rastvor TMC [223]. Ove čestice su pokazale adekvatnu antibakterijsku aktivnost prema *E. coli*. Vang (Wang) i saradnici su proizveli kompozitne čestice alginatnog hidrogela sa inkorporisanim nanočesticama srebra, ukapavanjem smeše alginatnog rastvora i nanočestica srebra u rastvor  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Pronađen je opseg koncentracija nanočestica srebra u kom dobijeni nanokompoziti nisu toksični prema mišjim osteoblastima, istovremeno zadržavajući antibakterijsko dejstvo prema *E. coli* i *S. Aureus* [224]. Takođe, pokazana je inkorporacija nanočestica srebra u hidrogelnim filmovima alginata, redukcijom ekstraktom lista biljke *Cassia auriculata* [225]. Tako dobijeni nanokompoziti su pokazali antimikrobno dejstvo prema *B. subtilis* i *E. coli*. Osim primene u vidu antimikrobnih agenasa, navedeno je da hidrogelni filmovi alginata sa inkorporisanim nanočesticama srebra imaju mogućnost primene u katalizi, optičkim biosenzorima, elektronskim i biomedicinskim uređajima, kao i u sanaciji životne sredine.



### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ove doktorske disertacije je elektrohemijsko dobijanje i karakterizacija nanokompozitnih sistema srebro/poli(*N*-vinil-2-pirolidon) (Ag/PVP), i srebro/alginat (Ag/alginat), u obliku koloidnih disperzija i hidrogelova, za biomedicinsku primenu. Prvo će biti utvrđena mogućnost elektrohemijske sinteze nanočestica srebra u rastvorima poli(*N*-vinil-2-pirolidona) i natrijum-alginata, a potom i unutar hidrogela poli(*N*-vinil-2-pirolidona). Optimizacija uslova elektrohemijske sinteze nanočestica srebra u rastvorima PVP i Na-alginata, kao i u PVP hidrogelu će se vršiti promenom režima sinteze (galvanostatski, potenciostatski), i elektrohemijskih parametara (sastav rastvora, gustina struje, napon, vreme implementacije), u cilju dobijanja što veće koncentracije sfernih nanočestica srebra, koje bi obezbedile antimikrobno dejstvo nanokompozita.

Sastav, morfologija i struktura nanokompozitnih sistema će biti ispitani UV-vidljivom spektroskopijom, transmisijom i visoko-rezolucionom skenirajućom elektronskom mikroskopijom, analizom raspodela veličina nanočestica srebra u koloidnim disperzijama metodom na principu analize difraktovane svetlosti, cikličnom voltametrijom, infracrvenom spektroskopijom sa Furijeovom transformacijom, optičkom mikroskopijom.

Koloidne disperzije Ag/PVP i Ag/alginat će dalje biti korišćene za dobijanje nanokompozita u različitim oblicima, kao što su tanki filmovi i hidrogelovi u obliku sfernih mikročestica, uparavanjem rastvarača, odnosno tehnikom elektrostatičke ekstruzije.

U cilju utvrđivanja potencijala za biomedicinsku primenu (u vidu obloga za rane ili implantata za meka tkiva), Ag/PVP i Ag/alginatni nanokompozitni hidrogelovi (u obliku diskova i mikročestica) će biti izlagani dinamičkoj kompresiji u bioreaktoru koji simulira *in vivo* uslove u artikularnoj hrskavici, čime će im biti određena biomehanička svojstva, biće praćena kinetika otpuštanja srebra i sorpcione karakteristike, ispitaće se citotoksičnost, kao i

antibakterijska aktivnost. Dobijeni rezultati će biti poređeni sa rezultatima ispitivanja Ag/PVP nanokompozita dobijenih radijaciono-hemijskom sintezom.

Rezultat istraživanja ove doktorske disertacije će biti dobijanje novih biomaterijala sa definisanim svojstvima, potencijalno primenjivih u vidu nosača ćelija u inženjerstvu tkiva, obloga za rane, ili implantata za meka tkiva.

## 4. EKSPERIMENTALNI DEO

### 4.1. MATERIJALI

Supstance upotrebljene u ovom radu su komercijalno dostupni proizvodi, korišćeni bez naknadnog prečišćavanja.

Za elektrohemijsko dobijanje Ag/PVP koloidnih disperzija i nanokompozitnih hidrogelova, korišćene su sledeće supstance: poli(*N*-vinil-2-pirolidon), PVP ( $M_w = 40\ 000$  i  $M_w = 360\ 000$ , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), AgNO<sub>3</sub> (Lachner, Brno, Češka), KNO<sub>3</sub> (Centrohem, Stara Pazova, Srbija), kao i azot visoke čistoće (99,5 %, Messer Tehnogas, Beograd, Srbija).

Za dobijanje Ag/alginatnih koloidnih disperzija elektrohemijskim putem i Ag/alginatnih hidrogel nanokompozita elektrostatičkom ekstruzijom, i njihovu karakterizaciju, osim supstanci koje se koriste i u elektrohemijskoj sintezi Ag/PVP sistema, korišćeni su i: Na-alginat niske viskoznosti (Sigma, St. Louis, MO, SAD), Na-citrat (Himedia, Mumbai, Indija), i Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Alkaloid, Skopje, Makedonija).

Za pripremu rastvora koji simulira telesnu tečnost korišćeni su: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Kemika, Zagreb, Hrvatska), NaCl (M. P. Hemija, Beograd, Srbija), KCl (Lachema, Brno, Češka), MgCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O i CaCl<sub>2</sub> (Centrohem, Stara Pazova, Srbija), (CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Nemačka), NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i HCl (Zorka Pharma, Šabac, Srbija). Za pripremu rastvora za određivanje koncentracije otpuštenog srebra, osim prethodno navedenog K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> korišćen je i KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Centrohem, Stara Pazova, Srbija).

Za *in vitro* ispitivanje citotoksičnosti Ag/PVP i Ag/alginatnih nanokompozitnih hidrogelova korišćene su sledeće supstance: hranljivi medijum RPMI 1640, L-glutamin, HEPES, MTT reagens, Na-dodecil sulfat (SDS) (svi proizvedeni u Sigma, St. Louis, MO, SAD), fetalni goveđi serum (PAA Laboratories, Pasching, Austrija), Haemacel (TheraSelect, Marburg, Nemačka), fitohemaglutinin (INEP, Beograd, Srbija), streptomycin (Galenika, Beograd,

Srbija), i penicilin (Panfarma, Beograd, Srbija). Mononuklearne ćelije periferne krvi (PBMC) su dobijene izolacijom iz heparinizovane periferne krvi zdravih dobrovoljaca (Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd, Srbija), dok su humane maligne ćelije adenokarcinoma grlića materice (HeLa) iz American Type Culture Collection (Manassas, VA, SAD).

Za ispitivanje antibakterijske aktivnosti Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova korišćeni su: *Staphylococcus aureus* (Tehnološko-metalurški fakultet u Leskovcu, Univerzitet u Nišu, Leskovac, Srbija), hranljivi bujon (Institut za imunologiju i virusologiju Torlak, Beograd, Srbija), agar (Biomedics, Parque tecnologico de Madrid, ISAAC Newton, Madrid, Španija), Luria-Bertani (LB) medijum (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemačka).

Voda iz Milli-Q sistema (Millipore, Billerica, MA, SAD) je korišćena u svim eksperimentima.

## **4.2. PRIPREMA UZORAKA**

### **4.2.1. ELEKTROHEMIJSKA SINTEZA Ag/PVP KOLOIDNIH DISPERZIJA**

Za elektrohemijску sintezu Ag/PVP koloidnih disperzija je korišćen sistem od tri elektrode (slika 4.1). Radna i pomoćna elektroda su bile Pt pločice dimenzija 9 mm x 9 mm i 10 mm x 10 mm, redom. Kao referentna elektroda korišćena je zasićena kalomelova elektroda (ZKE), koja je dovedena u kontakt sa površinom radne elektrode preko elektrolitičkog mosta napunjenog rastvorom  $\text{KNO}_3$  koncentracije 0,2 mol  $\text{dm}^{-3}$ , kako bi se izbegao kontakt između  $\text{Cl}^-$  jona ZKE, i  $\text{Ag}^+$  jona u elektrolitu, i izbeglo taloženje AgCl.

Vodeni rastvor 10 mas. % PVP pripremljen je rastvaranjem na povišenoj temperaturi (80 °C) uz mešanje na magnetnoj mešalici. U navedeni rastvor su

dodati  $\text{AgNO}_3$  i  $\text{KNO}_3$  do dostizanja željenih koncentracija od  $3,9 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ , redom.

Kiseonik je uklonjen iz sistema uvođenjem azota odgovarajućeg protoka kroz rastvor tokom 20 min. Nakon toga, uvođenje azota iznad rastvora je nastavljeno tokom sinteze. Kroz rastvor je propuštena električna struja na sobnoj temperaturi. Ag/PVP koloidne disperzije su dobijene variranjem režima rada:

1. potenciostatski, na 250 mV tokom 10 min,
2. galvanostatski, gustinom struje a)  $6,17 \text{ mA cm}^{-2}$  i b)  $61,7 \text{ mA cm}^{-2}$ , tokom 10 min,
3. primenom reversne struje:  $j_a = 3,10 \text{ mA cm}^{-2}$ ,  $t_a = 15 \text{ s}$ ,  $j_k = 61,7 \text{ mA cm}^{-2}$ ,  $t_k = 15 \text{ s}$ , odnosno srednjom gustinom struje  $j_{sr} = 54,5 \text{ mA cm}^{-2}$  tokom 25 min.

Srednja vrednost gustine reversne struje je izračunata prema jednačini (4.1):

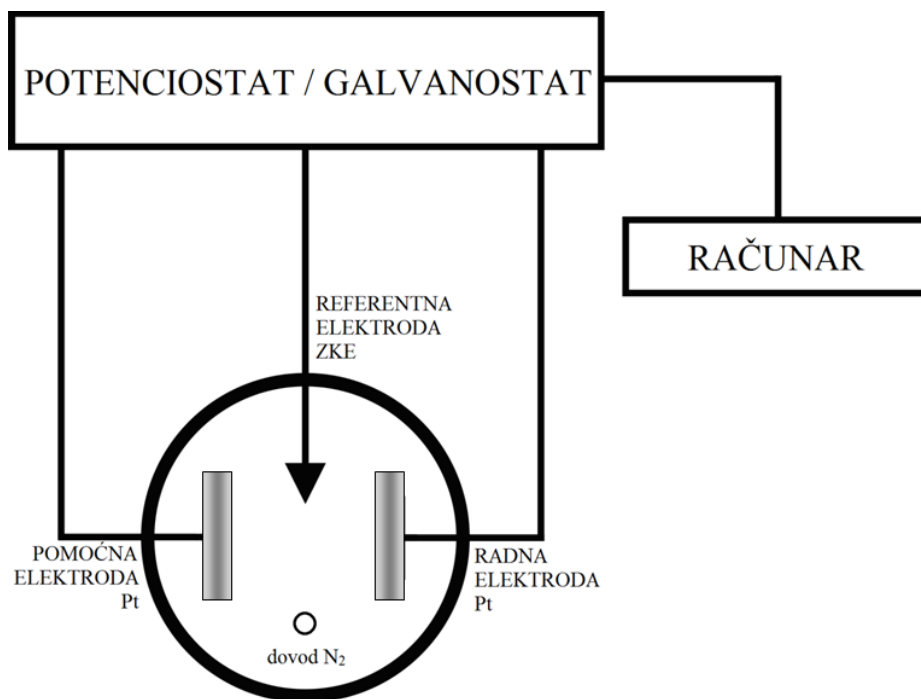
$$j_{sr} = \frac{j_k t_k - j_a t_a}{t_k + t_a} \quad (4.1)$$

gde su  $j_k$  i  $j_a$  gustine struje katodnog, odnosno anodnog pulsa, a  $t_k$  i  $t_a$ , katodno i anodno vreme, redom.

Elektrohemijska sinteza je vršena uz kontinualno mešanje.

Ag/PVP nanokompozit u obliku filma je dobijen uparavanjem rastvarača iz prethodno sintetisane koloidne disperzije, izliven u plastične Petri šolje, na sobnoj temperaturi, tokom 24 h, i korišćen je za spektroskopske analize nanokompozitnog sistema.

Ag/PVP koloidne disperzije dobijene elektrohemijskom sintezom su poređene sa istim, dobijenim radijaciono-hemijskom sintezom, u Institutu za nuklearne nauke Vinča [226].



*Slika 4.1. Shema elektrohemijske ćelije korišćene za sintezu Ag/polimer koloidnih disperzija.*

#### **4.2.2. ELEKTROHEMIJSKA SINTEZA Ag/ALGINATNIH KOLOIDNIH DISPERZIJA**

Vodeni rastvor Na-alginata, koncentracije 2 mas. %, pripremljen je rastvaranjem praha Na-alginata na sobnoj temperaturi uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici tokom 24 h. U rastvor su dodati  $\text{KNO}_3$  i  $\text{AgNO}_3$ , do postizanja konačnih koncentracija od  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$   $\text{KNO}_3$  i  $\text{AgNO}_3$  u opsegu koncentracija od  $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$  do  $3,9 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Elektrohemijska sinteza je izvedena galvanostatski, u elektrohemijskoj ćeliji koja je sadržala  $50 \text{ cm}^3$  rastvora i dve Pt pločice ( $9 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ ) kao radnu i pomoćnu elektrodu, i zasićenu kalomelovu elektrodu (ZKE) kao referentnu (slika 4.1). Korišćenjem uređaja Reference 600 Potentiostat/Galvanostat/ZRA (Gamry Instruments, Warminster, PA, SAD), gustina struje je varirana između  $j = 5 \text{ mA cm}^{-2}$  i  $50 \text{ mA cm}^{-2}$ , dok je vreme implementacije varirano između  $t = 0,5 \text{ min}$  i  $10 \text{ min}$ .

Elektrohemijska sinteza je vršena uz kontinualno mešanje; N<sub>2</sub> je uveden u rastvor 20 min pre sinteze, i kontinualno iznad rastvora tokom sinteze.

Ag/alginatni nanokompozit u obliku filma je dobijen uparavanjem rastvarača iz prethodno sintetisane koloidne disperzije, izliven u plastične Petri šolje, na sobnoj temperaturi, tokom 24 h, i korišćen je za spektroskopske analize nanokompozitnog sistema.

#### **4.2.3. ELEKTROHEMIJSKA SINTEZA Ag/PVP NANOKOMPOZITNIH HIDROGELOVA**

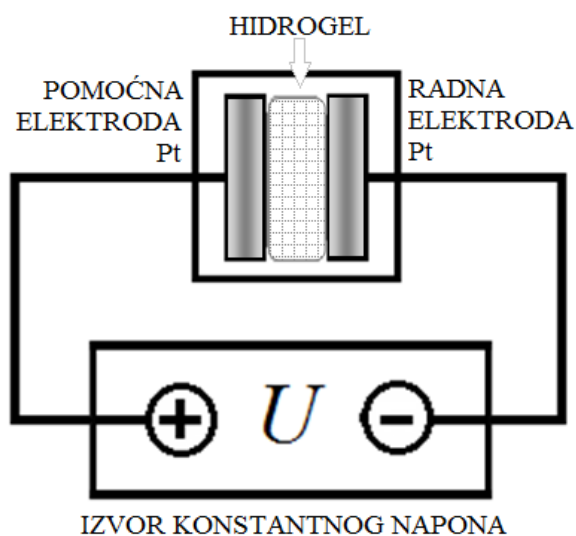
PVP hidrogel je prethodno dobijen radijaciono-hemijskim putem [227]. Vodeni rastvor PVP koncentracije 10 mas. %, je pripremljen rastvaranjem na povišenoj temperaturi (80 °C) uz mešanje na magnetnoj mešalici. U dobijeni rastvor PVP dodat je 0,2 mol dm<sup>-3</sup> 2-propanol. Nakon uklanjanja kiseonika produvavanjem argona odgovarajućeg protoka kroz rastvor tokom 20 min, rastvor je izliven između dve staklene ploče razmaknute gumenim ramom, i ozračen izvorom gama zračenja <sup>60</sup>Co, u Institutu za nuklearne nauke Vinča.

PVP hidrogel je osušen do konstantne mase. Nakon sušenja, neumreženi molekuli polimera su ekstrahovani u vodi, na povišenoj temperaturi. Diskovi PVP hidrogela ( $d = 11$  mm,  $\delta = 5$  mm) su isecani i potapani u rastvor za bubrenje.

Elektrohemijska ćelija za sintezu Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova se sastojala od dve elektrode (slika 4.2). Kao radna elektroda korišćena je Pt pločica dimenzija 9 mm x 9 mm, dok je kao pomoćna elektroda korišćena Pt pločica dimenzija 10 mm x 10 mm.

Optimizacija metode je vršena variranjem parametara elektrohemijske sinteze: sastava rastvora za bubrenje PVP hidrogela, primenjenog napona,  $U$ , i vremena implementacije,  $t$ . PVP hidrogel je potapan u dva rastvora, jedan koji je sadržao samo AgNO<sub>3</sub> u koncentraciji od 3,9 mmol dm<sup>-3</sup>, i drugi koji je osim AgNO<sub>3</sub> sadržao i 0,1 mol dm<sup>-3</sup> KNO<sub>3</sub>. Bubrenje je vršeno na sobnoj temperaturi

tokom 24 h. Ag/PVP nanokompozitni hidrogelovi su dobijeni na konstantnoj vrednosti napona, u opsegu od 15 V do 300 V. Kroz nabubreli PVP hidrogel na sobnoj temperaturi, električna struja je propuštana naizmenično, promenom polariteta elektroda, u cilju smanjenja taloženja srebra na katodi. Ukupna vremena propuštanja struje su bila u opsegu od 0,25 min do 5 min.



*Slika 4.2. Shema elektrohemijske ćelije korišćene za sintezu Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova.*

#### **4.2.4. DOBIJANJE Ag/ALGINATNIH NANOKOMPOZITA U OBLIKU MIKROČESTICA**

Alginatne mikročestice inkorporisane Ag nanočesticama (Ag/alginatni nanokompoziti) su dobijene elektrostatičkom ekstruzijom Ag/alginatne koloidne disperzije kao što je opisano u literaturi [220, 228, 229]. Ag/alginatna koloidna disperzija je potisnuta kroz pozitivno naelektrisanu iglu od nerđajućeg čelika pomoću infuzione pumpe za potiskivanje tečnosti (Racel, Scientific Instruments, Stamford, CT, SAD). Korišćena je igla sa ravnim vrhom prečnika 23 G (Small Parts, SAD), pri čemu je rastojanje između vrha igle i rastvora



Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> iznosilo oko 2,5 cm, a elektrostatički napon, između vrha igle i rastvora Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> je bio u opsegu od 6-7 kV. Ag/alginatna koloidna disperzija je potiskivana pri konstantnom protoku od 25,2 ml h<sup>-1</sup>, uz korišćenje šprica od 5 ml na pumpi (Racel, Scientific Instruments, Stamford, CT, SAD). Igla je povezana sa pozitivnim polom generatora struje visokog napona (Model 30R, Bertan Associates, New York, SAD) sa primenjenim elektrostatičkim potencijalom od 6 kV, dok je u 1,5 mas. % rastvor Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> uronjena uzemljena elektroda, čime je između vrha igle i rastvora Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> stvoreno električno polje. Na vrhu igle se formirao tok kapljica koji je sakupljan u kupatilu za geliranje, što je obezbedilo razmenu Na<sup>+</sup> i Ca<sup>2+</sup> jona i geliranje alginata u obliku sferičnih čestica. Tako dobijene mikročestice su u rastvoru za geliranje odležale dodatnih 30 min radi kompletnog geliranja.

### **4.3. TEHNIKE KARAKTERIZACIJE**

#### **4.3.1. TEHNIKE ISPITIVANJA SASTAVA, MORFOLOGIJE I STRUKTURE NANOKOMPOZITNIH SISTEMA**

##### **4.3.1.1. UV-vidljiva spektroskopija**

Prisustvo Ag nanočestica u Ag/PVP i Ag/alginatnim koloidnim disperzijama, i Ag/PVP i Ag/alginatnim nanokompozitnim hidrogelovima je potvrđeno UV-vidljivom spektroskopijom (Evolution 6000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD, i UV-3100 spektrofotometar, Shanghai Mapada Instruments, Shanghai, Kina), u opsegu talasnih dužina između 300 nm i 1000 nm. Spektri Ag/PVP i Ag/alginatnih koloidnih disperzija, kao i Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova su snimljeni direktno na uzorcima, dok su spektri Ag/alginatnih nanokompozitnih hidrogelova u obliku mikročestica dobijeni po rastvaranju u 0,07 M Na-citratu, i to 0,1 g mikročestica po 1 ml rastvora. Čisti rastvori PVP i alginata, odgovarajuće koncentracije, kao i PVP hidrogel i alginate mikročestice su korišćeni kao kontrolni uzorci.

#### **4.3.1.2. Elektronska mikroskopija**

##### ***Transmisiona elektronska mikroskopija***

Raspodela veličina i morfologija nanočestica srebra u Ag/PVP i Ag/alginatnim koloidnim disperzijama su ispitane transmisionom elektronskom mikroskopijom (TEM), korišćenjem elektronskog mikroskopa 100 CX (JEOL, Tokio, Japan) na radnom naponu od 100 kV. Za analizu slike korišćen je računarski program "CellA" (Olympus, Tokio, Japan). Uzorci za TEM analizu su pripremljeni nakapavanjem koloidnih disperzija na bakarne mrežice prevučene slojem ugljenika (SPI Supplies/Structure Probe, West Chester, PA, SAD) i naknadnim sušenjem tokom 24 h. U slučaju Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova, uzorci za nakapavanje na mrežice su dobijeni mlevenjem Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova, i njihovim dispergovanjem u destilovanoj vodi.

##### ***Visoko-rezoluciona skenirajuća elektronska mikroskopija***

Ispitivanje polimerne mreže PVP hidrogela i Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova je izvršeno visoko-rezolucionom skenirajućom elektronskom mikroskopijom (FE-SEM), korišćenjem uređaja MIRA 3 XMU (Tescan, Brno, Češka Republika), na 20 keV.

#### **4.3.1.3. Ispitivanje raspodele veličina nanočestica srebra u koloidnim disperzijama**

Raspodela veličina nanočestica srebra u Ag/PVP i Ag/alginatnim koloidnim disperzijama je ispitana metodom raspodele veličina čestica na principu analize difraktovane svetlosti korišćenjem instrumenta Zeta-sizer Nano ZS sa 633 nm He-Ne laserom (Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija), u opsegu merenja čestica od 0,6 nm do 6  $\mu$ m.

#### **4.3.1.4. Ciklična voltametrija**

Ciklična voltametrija Pt elektrode u rastvorima alginata i u koloidnim disperzijama Ag/alginata, kao i Pt elektrode u Ag/PVP nanokompozitnim hidrogelovima je izvedena korišćenjem dve Pt elektrode (9 mm  $\times$  10 mm) kao

radne i pomoćne elektrode, i zasićene kalomelove elektrode (ZKE) kao referentne. Ciklična voltametrija je izvedena na instrumentu Reference 600 potentiostat/galvanostat/ZRA (Gamry Instruments, Warminster, PA, SAD). Merenja su snimljena u opsegu potencijala između -1 i 1 V *vs.* ZKE, brzinom skeniranja od 50 mV s<sup>-1</sup>, počevši od potencijala otvorenog kola,  $E_{pok}$ . Svi potencijali su prikazani u odnosu na ZKE.

#### **4.3.1.5. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom**

Infracrveni spektri PVP, alginata, Ag/PVP i Ag/alginatnih nanokompozita, u obliku filmova dobijenih uparavanjem rastvarača iz rastvora, kao i Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova, su snimljeni spektrofotometrom Nicolet 380 FT-IR (Thermolectron Corporation, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), sa ATR dodatkom (eng. *Attenuated Total Reflection Mode*), u opsegu vrednosti talasnog broja od 4000 cm<sup>-1</sup> do 1000 cm<sup>-1</sup>.

#### **4.3.1.6. Optička mikroskopija**

Prečnici Ag/alginatnih nanokompozitnih hidrogelova u obliku mikročestica su određeni merenjem najmanje 20 mikročestica, korišćenjem optičkog mikroskopa CKS41RF (Olympus, Tokio, Japan) u sprezi sa programom za analizu slike "CellA" (Olympus, Tokio, Japan).

### **4.3.2. TEHNIKE ISPITIVANJA POTENCIJALA ZA BIOMEDICINSKU PRIMENU NANOKOMPOZITNIH SISTEMA**

#### **4.3.2.1. Ispitivanje mehaničkih svojstava PVP i alginatnih hidrogelova, Ag/PVP i Ag/alginatnih nanokompozitnih hidrogelova u bioreaktorskim uslovima**

Ispitivanje mehaničkih svojstava PVP i alginatnih hidrogelova, kao i Ag/PVP i Ag/alginatnih nanokompozitnih hidrogelova je vršeno u novom bioreaktoru koji se sastoji iz nosača sa šest mesta za komore za kultivaciju, i smešta se u metalnu bazu. Baza se vertikalno pomera pomoću motora koji se nalazi ispod nje. Na bazi ispod nosača ugrađen je i senzor opterećenja, koji

omogućava merenja srednjih vrednosti odziva senzora na opterećenje za svih šest uzoraka. Bioreaktor omogućava dinamičku kompresiju uzoraka biomaterijala ili kultivisanih tkiva pri uslovima koji odgovaraju fiziološkim: frekvencije u opsegu 0,1 – 1 Hz, i 5 – 10 % deformacije. Pri tome je moguće pratiti promene mehaničkih karakteristika u toku vremena.

Komore za kultivaciju su cilindričnog oblika, napravljene od polipropilena, sa dva bočna otvora za transport medijuma. Maksimalne dimenzije uzoraka koji se mogu ispitivati u ovom bioreaktoru su: prečnik 16 mm i debljina 3 mm. Komore se sa gornje strane zatvaraju dijafragmom napravljenom od bergafleksa (Bergaflex, Termoplast DOO, Beograd, Srbija), na koju naleže mikrometarski zavrtanj. Njime se preko dijafragme uzorak može pritisnuti, što omogućava preciznu kompresiju svakog uzorka, nezavisno od debljine pojedinačnog uzorka. Svaka kultivaciona komora je ponaosob povezana sa sistemom za recirkulaciju medijuma, koji sadrži rezervoar za medijum i namotaj silikonskog creva za razmenu gasova. Recirkulacija medijuma je obezbeđena višekanalnom peristaltičkom pumpom, koja omogućava proticanje medijuma direktno kroz uzorak, površinskim brzinama koje odgovaraju fiziološkim brzinama krvi u kapilarima ( $10\text{--}100 \mu\text{m s}^{-1}$ ).

Rad bioreaktora je automatski kontrolisan. Personalni računar kontroliše dva odvojena protoka informacija: jedan koji usmerava kretanje baze bioreaktora, i drugi koji registruje izlazne signale sa senzora. Pomeranje motora se reguliše pomoću programa razvijenog u Labview softverskom paketu (National Instruments, TX, SAD), i kojim se šalju odgovarajući kontrolni signali pogonu motora. Na ovaj način programom se kontrolišu brzina i smer pomeraja baze bioreaktora [230].

U zavisnosti od zahteva eksperimenta, više parametara može biti definisano, kao što su amplituda i frekvencija vertikalnog pomeraja baze, trajanje radnih perioda i pauza, i ukupan broj ciklusa rad/pauza. Merenja signala sa senzora opterećenja se vrše u pauzama, nakon komande koja određuje broj merenja koja slede, u cilju određivanja mehaničkih karakteristika uzoraka u kultivacionim komorama. Na osnovu deformacije i izračunatih

vrednosti napona, rezultati se predstavljaju u dijagramima napon – deformacija. Nagib ovih dijagrama predstavlja vrednost modula elastičnosti,  $E$ , ispitivanih uzoraka.

Ispitivanje mehaničkih svojstava čistog PVP hidrogela i Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova je izvedeno u novom bioreaktoru sa mehaničkom stimulacijom i intersticijalnim protokom medijuma u fiziološkim režimima koji simuliraju *in vivo* uslove u artikularnoj hrskavici. Dinamička kompresija je vršena pri deformaciji od 10 % i frekvenciji od 0,42 Hz, u režimu „1 h rad / 1 h pauza“, sa brzinom protoka medijuma od  $5 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ , koja odgovara površinskoj brzini medijuma od  $25 \text{ } \mu\text{m s}^{-1}$ . Uslovi su podešeni tako da imitiraju hodanje, i brzine protoka krvi u kapilarima (opseg površinske brzine medijuma je od  $10 - 100 \text{ } \mu\text{m s}^{-1}$ ) [230]. U ovom bioreaktoru, šest komora za kultivaciju je smešteno u nosaču na metalnoj bazi, koja se pomera vertikalno pomoću step motora smeštenog ispod nosača (Surestep STP-MTR-23055, Automation Direct, GA, SAD). Senzor opterećenja (Scaime AL3C3SH5e, Scaime, Francuska) meri srednje opterećenje kojem su uzorci izloženi u komorama za kultivaciju, dok su pomeranja baze bioreaktora i sakupljanje podataka kontrolisani kompjuterskim programom. Dijafragma od bergafleksa (Termoplast, Beograd, Srbija) pokriva vrh komore; može biti pritisnuta mikrometarskim zavrtnjem (prečnika 11 mm) što obezbeđuje precizno početno pozicioniranje u svakoj komori, nezavisno od razlika u debljini uzoraka.

Diskovi čistog PVP hidrogela i Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova ( $d = 13,2 \text{ mm}$ ,  $\delta = 5 \text{ mm}$ ) su prvo nabubreni u simuliranoj telesnoj tečnosti (pH 7,2 [231]) do dostizanja ravnoteže. U tri komore su postavljeni diskovi PVP hidrogela ili Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova i napunjeni simuliranom telesnom tečnošću; testovi kompresije su izvedeni simultano na sva tri uzorka. Pre početka svakog merenja, mikrometarski zavrtnji se pozicioniraju tako da dijafragma dodiruje gornju površinu uzorka, što se određuje vizuelno, kao i povećanjem odziva senzora. Uzorci su ispitivani u dva režima: i) pri dinamičkoj kompresiji, i brzini pomeranja motora od  $337,5 \text{ } \mu\text{m s}^{-1}$  i ii) pri režimu stepenastog povećanja deformacije sa koracima od  $100 \text{ } \mu\text{m}$  brzinom od

337,5  $\mu\text{m s}^{-1}$  sa pauzama od 30 min, čime se dobijaju vrednosti dinamičkog (i) i ravnotežnog (ii) modula kompresije. Svi testovi kompresije su izvedeni pri deformaciji od 10 %, što na uzorcima debljine 5 mm, odgovara apsolutnom pomeraju od 500  $\mu\text{m}$ .

Pri testiranju uzoraka, senzor opterećenja pokazuje ukupan odziv koji predstavlja sumu odziva usled deformacije dijafragme i uzoraka. Od izmerenih vrednosti odziva senzora na dato opterećenje oduzete su vrednosti odziva pri deformaciji dijafragme, čime se dobija odziv senzora usled deformacije uzorka u komori. Vrednosti napona su zatim izračunate normalizovanjem vrednosti sile po površini poprečnog preseka klipa mikrometarskog zavrtnja. Kako je deformacija u svim eksperimentalnim serijama bila 10 %, kao što je i bilo očekivano, zavisnost napon – deformacija je pratila linearan trend. Vrednosti modula kompresije su izračunati kao nagibi krivih napon – deformacija. Svi eksperimenti su izvedeni u triplikatu.

#### **4.3.2.2. Ispitivanje otpuštanja srebra iz Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova**

Otpuštanje srebra iz Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova dobijenih iz PVP hidrogela bubrenog u rastvoru  $\text{AgNO}_3$  koncentracije 3,9  $\text{mmol dm}^{-3}$  je ispitivano u simuliranoj telesnoj tečnosti pri različitim hidrodinamičkim uslovima. Simulirana telesna tečnost (pH vrednosti 7,42) se sastojala od 0,39  $\text{mmol dm}^{-3}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i 0,61  $\text{mmol dm}^{-3}$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , i nije sadržala  $\text{Cl}^-$  jone (kako bi se izbeglo eventualno taloženje  $\text{AgCl}$ ). Ispitivanja su vršena u sledećim eksperimentalnim sistemima: i) pri statičkim uslovima, ii) u perfuzionim bioreaktorima, i iii) u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom spregnutom sa perfuzijom simulirane telesne tečnosti. Svi eksperimenti su izvedeni najmanje u triplikatu. Simulirana telesna tečnost je menjana periodično, a količina otpuštenog srebra u rastvorima je merena atomskim apsorpcionim spektrometrom Pye UNICAM SP9 (Philips, Amsterdam, Holandija). Ukupni sadržaj srebra unutar nanokompozitnih hidrogelova je određen nakon potapanja hidrogelova u  $\text{HNO}_3$  (1:1 v/v), u cilju oksidacije zaostalih nanočestica srebra u  $\text{Ag}^+$  jone. Sadržaj srebra je određivan u tri faze, inicijalno (pre testova

otpuštanja), u različitim vremenima tokom eksperimenta, i po završetku ispitivanja otpuštanja srebra.

### ***Statički uslovi***

Suvi diskovi Ag/PVP nanokompozita (ksrogelovi dimenzija  $d = 3,20 \pm 0,15$  mm,  $\delta = 1,84 \pm 0,03$  mm) su potopljeni u 10 cm<sup>3</sup> simulirane telesne tečnosti i držani na  $37 \pm 1$  °C. Ravnoteža je dostignuta nakon oko 24 h, pa su dimenzije nanokompozita u ravnotežnom stanju bile  $d = 8,35 \pm 0,26$  mm i  $\delta = 4,51 \pm 0,17$  mm. Od prvog do 14. dana, simulirana telesna tečnost je menjana svaka dva dana, a potom jednom nedeljno, do 28. dana.

### ***Perfuzioni bioreaktor***

Diskovi Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova su nabubreni u simuliranoj telesnoj tečnosti na sobnoj temperaturi tokom 24 h, do dostizanja ravnoteže ( $d = 8,35 \pm 0,26$  mm,  $\delta = 4,51 \pm 0,17$  mm). Uzorci su potom smešteni u perfuzione bioreaktore, pri kontinualnom protoku simulirane telesne tečnosti konstantnom brzinom od  $5 \cdot 10^{-3}$  cm<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>, pomoću višekanalne peristaltičke pumpe. Brzina protoka od  $5 \cdot 10^{-3}$  cm<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> odgovara površinskoj brzini fluida od 90 μm s<sup>-1</sup>, koja je u opsegu brzina protoka krvi u kapilarima. Korišćen je bioreaktor u vidu filter kućišta ( $d = 10$  mm,  $h = 15$  mm, ukupne zapremine od 1,18 cm<sup>3</sup>, PALL Corporation, Port Washington, NY, SAD), i povezan je za rezervoar medijuma pomoću silikonskih creva. Postavljena su tri nezavisna bioreaktora sa posebnom petljom za recirkulaciju medijuma; svaki je sadržao jedan uzorak Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova i ukupno 10 cm<sup>3</sup> medijuma. Eksperimenti su vršeni na  $37 \pm 1$  °C. Od prvog do 14. dana, simulirana telesna tečnost je menjana svaka tri dana, a potom jednom nedeljno, do 42. dana.

### ***Bioreaktor sa dinamičkom kompresijom spregnutom sa perfuzijom simulirane telesne tečnosti***

Diskovi Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova su nabubreni u simuliranoj telesnoj tečnosti na sobnoj temperaturi tokom 24 h, do dostizanja ravnoteže ( $d = 13,2$  mm,  $\delta = 4,51 \pm 0,17$  mm). Testirana su tri uzorka, tokom 14

dana u novom bioreaktoru, kao što je ranije opisano [232]. Kontinualna perfuzija simulirane telesne tečnosti i dinamička kompresija su spregnute kako bi se simulirali *in vivo* uslovi u artikularnoj hrskavici. Kontinualna recirkulacija simulirane telesne tečnosti, pri brzini protoka od  $5 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ , je omogućena primenom višekanalne peristaltičke pumpe. Dinamička kompresija je vršena istovremeno u tri komorice, pri čemu je u svakoj bio smešten po jedan disk Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela; svaka komorica je povezana posebnom petljom za recirkulaciju napunjenu sa po  $10 \text{ cm}^3$  simulirane telesne tečnosti. Uzorci su testirani pri deformaciji od 10 %, i brzini pomeranja motora od  $337,5 \mu\text{m s}^{-1}$  (frekvencijom od 0,37 Hz), u režimu „1 h rad / 1 h pauza“, na sobnoj temperaturi. Simulirana telesna tečnost je menjana svaka tri dana, do 14. dana.

#### **4.3.2.3. Ispitivanje citotoksičnosti Ag/PVP i Ag/alginatnih nanokompozitnih hidrogelova**

Ispitivanje citotoksičnosti je vršeno na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u Beogradu.

##### ***Priprema mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC)***

Mononuklearne ćelije periferne krvi (PBMC) su izolovane iz pune heparinizovane krvi centrifugiranjem u gradijentu koncentracije pomoću separatora (Lymphoprep™, Nycomed, Oslo, Norveška). PBMC su isprane tri puta u Hemacelu (vodeni rastvor pH vrednosti 7,4, koji sadrži  $145 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ Na}^+$ ,  $5,1 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ K}^+$ ,  $6,2 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ Ca}^{2+}$ ,  $145 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ Cl}^-$ ,  $35 \text{ g dm}^{-3}$  želatinoznih polimera). Hemacel je potom odliven, a ćelijski talog je resuspendovan u hranljivom medijumu (RPMI 1640, pH vrednosti 7,2, u koji se dodaje 10 % fetalni goveđi serum, termički inaktivisan na  $56 \text{ }^\circ\text{C}$  tokom 30 min, L-glutamin ( $3 \text{ mmol dm}^{-3}$ ), streptomycin ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), penicilin ( $100 \text{ IU ml}^{-1}$ ) i Hapes ( $25 \text{ mmol dm}^{-3}$ )).



### ***Ispitivanje zavisnosti citotoksičnosti Ag/alginatnih nanokompozitnih hidrogelova u obliku mikročestica od koncentracije inkorporisanog srebra***

Mikrogelovi (mikročestice dimenzija 700 – 800  $\mu\text{m}$ ) sa različitim koncentracijama srebra (0,5; 1 i 1,5  $\text{mmol dm}^{-3}$ ) su postavljeni u određene sudiće u ploči sa 96 sudića, pre dodavanja ćelijske suspenzije. Zapremina od 50  $\mu\text{l}$  hranljivog medijuma, koja sadrži oko 10 mg mikročestica određene koncentracije srebra, sipana je u odgovarajući sudić. U deo sudića leve polovine ploče, dodato je po 50  $\mu\text{l}$  hranljivog medijuma, dok je u deo sudića desne polovine ploče dodato po 50  $\mu\text{l}$  hranljivog medijuma sa mitogenom za stimulaciju proliferacije ćelija, PHA ( $c(\text{PHA})_{\text{finalno}} = 5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Zatim je u deo tih sudića zasejano po 150 000 PBMC/50  $\mu\text{l}$  hranljivog medijuma, a u preostali deo sudića sa odgovarajućim mikročesticama je sipano samo 50  $\mu\text{l}$  hranljivog medijuma. U kontrolnim uzorcima ćelije su rasle samo u prisustvu hranljivog medijuma. Ćelijski uzorci su inkubirani tokom 72 h.

Podaci su dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta izvedena u triplikatu. Kao slepe probe se koriste uzorci podloge sa odgovarajućim mikročesticama u kojima nisu zasađene PBMC.

### ***Preliminarni eksperiment ispitivanja citotoksičnosti Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova***

U preliminarnom eksperimentu,  $1,0 \cdot 10^6$  PBMC je zasejano u 2  $\text{cm}^3$  hranljivog medijuma, u Petri šaljama u kojima su bili smešteni diskovi PVP hidrogela ili Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela ( $d = 8,35 \pm 0,26 \text{ mm}$ ,  $\delta = 4,51 \pm 0,17 \text{ mm}$ ). Za ovaj eksperiment korišćen je Ag/PVP nanokompozitni hidrogel dobijen gama zračenjem PVP hidrogela bubrenog u rastvoru  $\text{AgNO}_3$  koncentracije 3,9  $\text{mmol dm}^{-3}$ . Kao kontrola korišćene su PBMC zasejane u hranljivom medijumu. Inkubacija je trajala 72 h.

Paralelno,  $1,0 \cdot 10^5$  HeLa ćelija je zasejano u 2  $\text{cm}^3$  hranljivog medijuma u Petri šaljama u kojima su bili smešteni diskovi PVP hidrogela ili Ag/PVP

nanokompozitnog hidrogela, istih dimenzija kao u eksperimentu sa PBMC. I u ovom slučaju korišćen je Ag/PVP nanokompozitni hidrogel dobijen gama zračenjem PVP hidrogela bubrenog u rastvoru  $\text{AgNO}_3$  koncentracije  $3,9 \text{ mmol dm}^{-3}$ , dok su kao kontrola korišćene HeLa ćelije zasejane u hranljivom medijumu. Inkubacija je trajala 96 h.

### ***Ispitivanje zavisnosti citotoksičnosti Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova od koncentracije inkorporisanog srebra***

U prvoj eksperimentalnoj seriji ispitana je zavisnost citotoksičnosti Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova od koncentracije inkorporisanog srebra. Hidrogelovi čistog PVP i Ag/PVP nanokompozita u obliku cilindara ( $d = 2 \text{ mm}$ ,  $\delta = 5 \text{ mm}$ ) su smešteni u sudiće ploče sa 24 sudića. U cilju ispitivanja uticaja sadržaja nanočestica srebra inkorporisanih u PVP hidrogel na citotoksičnost, korišćeni su Ag/PVP nanokompoziti dobijeni iz PVP hidrogela bubrenog u rastvorima različite koncentracije  $\text{AgNO}_3$  (1,0; 2,0; 3,9; 8,0 ili  $16 \text{ mmol dm}^{-3}$ ). U svaki sudić koji je sadržao po jedan uzorak hidrogela, dodato je u jednom slučaju samo  $0,6 \text{ cm}^3$  hranljivog medijuma (slepa proba), dok je u drugom slučaju osim hranljivog medijuma dodata i ćelijska suspenzija (500 000 PBMC u  $0,6 \text{ cm}^3$  hranljivog medijuma). Sudići koji su sadržali samo ćelijsku suspenziju su služile kao kontrola.

U drugoj eksperimentalnoj seriji ispitan je uticaj prisustva Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova na PBMC stimulisane na proliferaciju, odnosno razmnožavanje. Eksperimentalna postavka je bila istovetna prvoj, osim što je hranljivi medijum obogaćen sa  $5 \text{ mg dm}^{-3}$  mitogena fitohemaglutinina (PHA).

U trećoj eksperimentalnoj seriji ispitani su citotoksični efekti  $\text{Ag}^+$  jona (iz rastvora  $\text{AgNO}_3$ ), i to na PBMC zasejane u hranljivom medijumu i bez i sa dodatkom PHA. Ukratko, 2 h nakon zasejavanja PBMC u ploču sa 24 sudića, kao što je već opisano, rastvori različitih koncentracija  $\text{AgNO}_3$  su dodati kako bi se dostigle finalne koncentracije  $\text{Ag}^+$  jona u hranljivom medijumu od 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 i  $25,0 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ . U odgovarajućim kontrolnim uzorcima, PBMC su inkubirane bez dodatka  $\text{Ag}^+$  jona. Inkubacija ćelija je trajala 72 h.

Podaci u svim eksperimentalnim serijama su dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta izvedena u duplikatu.

### ***Određivanje preživljavanja ciljnih ćelija MTT testom***

Preživljavanje ciljnih ćelija u svim gore navedenim eksperimentalnim serijama ispitivano je MTT testom, koji određuje ćelijsko preživljavanje na osnovu količine redukovanog kolorimetrijskog reagensa u metabolički aktivnim ćelijama. MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difenil tetrazolijum bromid) je žuta tetrazolijumska so koja u živim, biohemijski aktivnim ćelijama, redukcijom pomoću mitohondrijske dehidrogenaze daje formazan [233], kristal ljubičaste boje, koji ima maksimum apsorpcije na 570 nm. Količina rastvorenog formazana proporcionalna je broju živih ćelija.

Po završetku kontinualne inkubacije ciljanih ćelija (72 h za PBMC, i 96 h za HeLa ćelije), uzorcima je dodato 10 µl (Ag/alginatni nanokompozitni hidrogelovi), odnosno 40 µl (Ag/PVP nanokompozitni hidrogelovi) MTT reagensa, u zavisnosti od ukupne zapremine uzorka. Uzorci su potom ponovo inkubirani tokom 4 h na 37 °C. Po završetku druge inkubacije, svakom uzorku je dodato i 100 µl 10 % Na-dodecil sulfata. Ploče su ponovo inkubirane, tokom noći, nakon čega su uzorci preneti u ploču za mikrotitraciju sa 96 sudića. Intenzitet apsorpcije je meren na 570 nm pomoću Multiskan EX (Thermo Labsystems, Beverly, MA, SAD).

Preživljavanje ćelija,  $S$ , se definiše kao odnos broja ćelija preostalih nakon gajenja u prisustvu agensa koji se ispituje,  $A_u$ , i broja ćelija u kontrolnom uzorku,  $A_k$ , pomnožen sa 100. Kako je broj živih ćelija direktno proporcionalan intenzitetu apsorpcije živih, metabolički aktivnih ćelija tretiranih MTT agansom, za izračunavanje preživljavanja ćelija se koristi apsorpcija novonastalog formazana, prema jednačini (4.2):

$$S(\%) = \frac{A_u}{A_k} \cdot 100 \quad (4.2)$$

Podaci su dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta izvedena u duplikatu, tako da je preživljavanje ćelija predstavljeno kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija.

Citotoksičnost je određena na osnovu preživljavanja ćelija u odnosu na kontrolni uzorak prema skali: netoksičan uzorak odgovara preživljavanju ćelija većem od 90 %, blago toksičan uzorak odgovara preživljavanju ćelija od 60 % do 90 %, umereno toksičan uzorak odgovara preživljavanju ćelija od 30 % do 59 %, dok znatno toksičan uzorak odgovara preživljavanju ćelija manjem od 30 % [234].

#### **4.3.2.4. Ispitivanje antibakterijskih svojstava Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova agar difuzionom metodom**

Za detekciju antibakterijske aktivnosti Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova na *S. aureus* korišćena je agar difuziona metoda. Za eksperiment su korišćene dve Petri šolje sa hranljivim agarom (2 % agara) ohlađenim do čvrstog stanja kao osnovnom podlogom. Na hranljivi agar nanet je sloj hranljivog top agara (0,7 % agara) koji je sadržao indikator soj test mikroorganizma na koji je ispitivana antibakterijska aktivnost. U dva mala erlenmajera sa po 15 ml hranljivog top agara dodato je po 200 ml suspenzije određenih bakterija starih 18 sati. Nakon očvršćavanja top agara postavljeni su diskovi Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova.

Petri šolje su inkubirane na 37° C na atmosferskom pritisku tokom 24 h.

## 5. REZULTATI I DISKUSIJA

### 5.1. KOLOIDNE DISPERZIJE NANOČESTICA SREBRA I POLIMERA DOBIJENE ELEKTROHEMIJSKOM SINTEZOM

Koloidne disperzije nanočestica srebra i polimera su dobijene elektrohemijom. Optimizacija režima sinteze je rađena na sistemu Ag/PVP, nakon čega je vršena optimizacija elektrohemijske sinteze Ag/alginate koloidne disperzije u odabranom, galvanostatskom režimu. Treba naglasiti da je sistem Ag/PVP jednostavniji od sistema Ag/alginate, i da je poznat u literaturi, ali optimizacija elektrohemijske sinteze Ag/PVP koloidne disperzije u vodenom rastvoru nije prikazana u ranije objavljenim rezultatima. Elektrohemijska sinteza Ag/alginate koloidne disperzije je u ovom radu prvi put ispitivana.

PVP je polimer koji ne disosuje u vodenom rastvoru, i stoga se ne taloži na kontra elektrodi. U slučaju sinteze nanočestica srebra u prisustvu PVP, reakcije na elektrodama su prikazane jednačinama (2.2) – (2.4), u poglavlju 2.1.2.1. Kao anodna reakcija specifična za korišćeni sistem, može se javiti oksidacija platine, prikazana jednačinom (5.1):



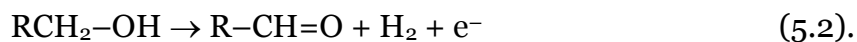
Naime, platinska elektroda je korišćena kao anoda, a mogućnost njene oksidacije je pokazana primenom ciklične voltometrije (poglavlje 5.3.3, slika 5.28, insert), što će biti kasnije diskutovano.

Zaštitni mehanizam PVP prilikom elektrohemijske sinteze nanočestica srebra je predložen na osnovu njegove strukture, koju predstavlja polimerni lanac vinil-grupe sa polarnim grupama piroldonskog prstena (slika 2.1). Jin (Yin) i saradnici navode četiri stupnja u procesu dobijanja nanočestica srebra u rastvoru PVP [28]. Kao prvi stupanj opisano je formiranje  $\text{Ag}_m^{m+}$ -PVP kompleksa, koordinativnim vezivanjem  $\text{Ag}^+$  jona i PVP molekula, gde je  $m$  broj jona vezan za jedan molekul PVP. Drugi stupanj predstavlja sama

elektrohemijska redukcija  $Ag_m^{m+}$ -PVP kompleksa na katodi, čime se dobijaju adatomski srebra stabilisani PVP lancima ( $Ag_m^0$ -PVP). U sledećem stupnju PVP ubrzava stvaranje velikog broja nukleusa za stvaranje nanočestica srebra, dok poslednji stupanj podrazumeva rast nanočestica srebra, ali ograničen prisustvom molekula PVP.

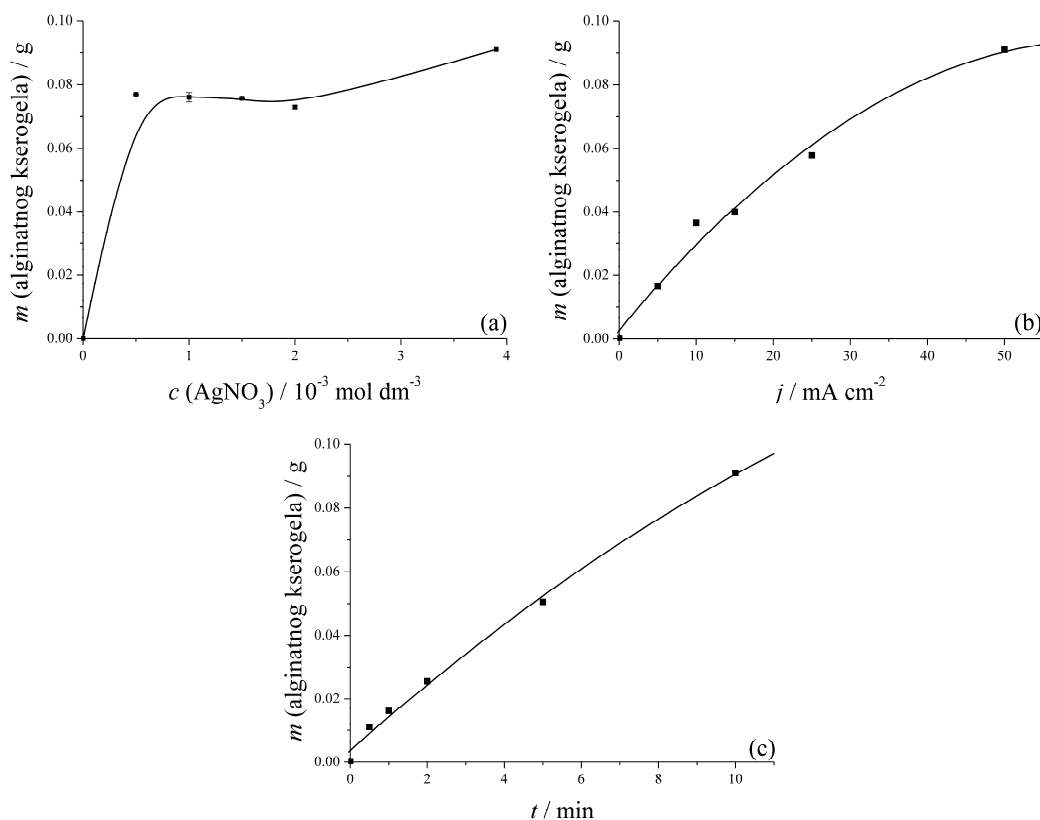
Značaj PVP dolazi do izražaja posebno u stupnju elektrohemijske redukcije. Naime, pošto atomi azota i kiseonika u piroolidonskom prstenu PVP doprinose većoj elektronskoj gustini sp orbitale jona srebra u odnosu na  $H_2O$  u hidratiziranim  $Ag^+$  jonima, joni srebra u  $Ag_m^{m+}$ -PVP kompleksu lakše preuzimaju elektrone sa katode nego hidratizirani  $Ag^+$  joni. Usled toga, lakše dolazi do redukcije  $Ag_m^{m+}$ -PVP kompleksa, nego pojedinačnih  $Ag^+$  jona, čime se značajno smanjuje taloženje srebra na katodi.

Natrijum-alginat je so alginske kiseline, i u rastvoru disosuje na pozitivan jon natrijuma i negativan ostatak alginske kiseline. Naelektrisanje ostatka alginske kiseline dovodi do mogućnosti taloženja alginata u obliku hidrogela na anodi. Naime, kao što će biti diskutovano kasnije, u prisustvu električne struje može doći do oksidacije alginata, odnosno  $-OH$  grupa u ostacima uronskih kiselina alginata, koje mogu da se oksiduju do  $>C=O$  grupa, a one dalje do  $-COOH$  grupa. Na osnovu toga, anodna reakcija specifična za ovaj sistem može biti oksidacija hidroksilnih grupa ostataka alginske kiseline, prikazana jednačinom (5.2):



Na ovaj način verovatno dolazi do umrežavanja alginata, pa se tokom elektrohemijske sinteze nanočestica srebra u rastvoru alginata javlja neželjeni proizvod u vidu alginatnog gela koji se taloži na anodi. Ovaj proces dovodi do smanjenja koncentracije alginata od početnih 2,0 mas. % na 1,9 mas. %. Smanjenje koncentracije alginata je određeno gravimetrijski, merenjem mase osušenog alginatnog gela, tj. kserogela, nataloženog na kontra elektrodi. Povećanje vrednosti svih parametara sinteze koji su varirani u cilju optimizacije (koncentracija  $AgNO_3$  u početnom rastvoru, gustina struje, vreme

implementacije), dovelo je do povećanja mase alginatnog gela na kontra elektrodi (slike 5.1 a, b, c, redom) i posledično do smanjenja sadržaja alginata u Ag/alginatnoj koloidnoj disperziji.



*Slika 5.1. Zavisnost mase alginatnog kserogela nataloženog/umreženog na kontra elektrodi od: a) koncentracije  $\text{AgNO}_3$  u početnom rastvoru, b) gustine struje, i c) vremena implementacije.*

Gubitak sadržaja alginata u koloidnoj disperziji u odnosu na početni je bio između 1,1 i 9,1 mas. %, u zavisnosti od primenjenih eksperimentalnih uslova sinteze. Na osnovu rezultata gravimetrijske metode određivanja smanjenja sadržaja alginata, izračunato je da je prosečna koncentracija alginata u Ag/alginatnoj koloidnoj disperziji bila  $1,91 \pm 0,07$  mas. %. Rezultati koji slede će biti diskutovani pod pretpostavkom da je koncentracija alginata u Ag/alginatnoj koloidnoj disperziji 1,9 mas. %.

I u slučaju elektrohemijske sinteze nanočestica srebra u rastvoru Na-alginata, verovatno je formiranje  $Ag_m^{m+}$ -alginat kompleksa, s obzirom da postoji mogućnost koordinativnog vezivanja srebra sa hidroksilnim i etarskim grupama, kao i atomima kiseonika iz ostataka uronskih kiselina molekula alginata, što će biti pokazano u poglavljima 5.1.4 i 5.1.5. Ipak, s obzirom da je ostatak alginske kiseline negativno naelektrisan, i da na anodi formira hidrogel, nije verovatno da će eventualno formirani kompleks  $Ag_m^{m+}$ -alginat putovati ka katodi na kojoj će se joni srebra redukovati. Veća je verovatnoća da će u rastvoru alginata redukciono sredstvo biti vodonik, formiran u procesu redukcije vode na katodi (jednačina (2.2), poglavlje 2.2.1.2). Vodonik istovremeno može umanjiti taloženje srebra na katodi, s obzirom da je primećeno da prilikom kataforetskog taloženja intenzivno izdvajanje vodonika na katodi smanjuje koncentraciju jona metala na granici faza katoda/elektrolit [235].

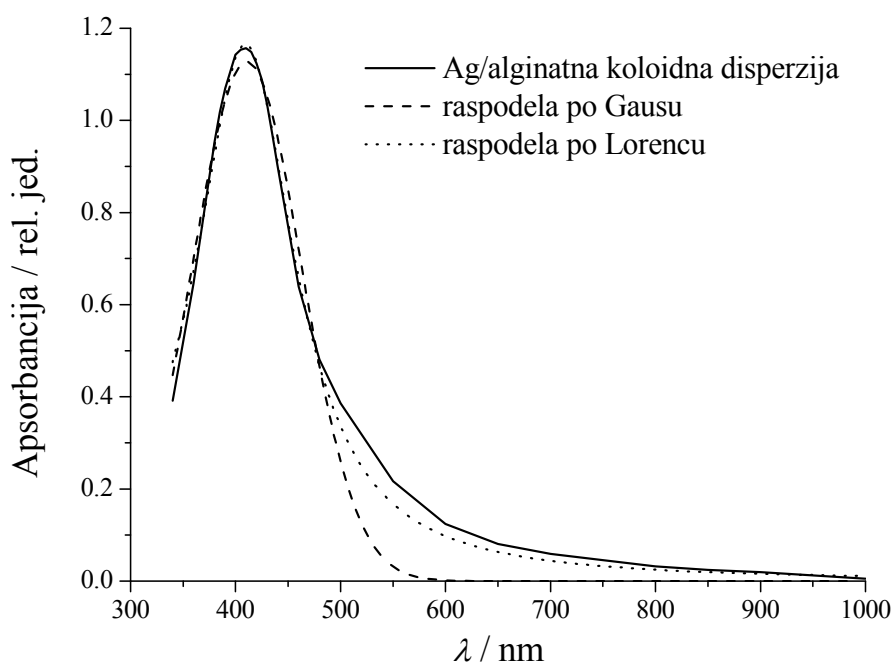
Koloidne disperzije nanočestica srebra i polimera dobijene elektrohemijском sintezom su karakterisane UV-vidljivom spektroskopijom, transmisionom elektronskom mikroskopijom, ispitivanjem raspodele veličina čestica, cikličnom voltametrijom, FT-IR spektroskopijom.

### **5.1.1. UV-VIDLJIVA SPEKTROKOPIJA**

Prisustvo nanočestičnog srebra i stabilnost koloidnih disperzija nanočestica srebra i polimera su praćeni metodom UV-vidljive spektroskopije. Optička svojstva nanočestica metala su posledica kolektivnih oscilacija provodnih elektrona koji interaguju sa elektromagnetnim zračenjem. Električno polje indukuje formiranje dipola u nanočestici. Povratna sila u nanočesticama pokušava da to kompenzuje, što se ispoljava kao jedinstvena talasna dužina na kojoj se pojavljuje maksimum apsorpcije [99]. Na osnovu položaja apsorpcionog maksimuma (talasna dužina) određuje se veličina nanočestica srebra (uobičajena talasna dužina na kojoj se javlja apsorpcioni maksimum nanočestica srebra je oko 400 nm [47]; sitnije nanočestice imaju apsorpcioni maksimum na nižim vrednostima talasne dužine [236]). Intenzitet apsorpcionog maksimuma je proporcionalan koncentraciji dobijenih nanočestica [109, 237, 238], pa je veći



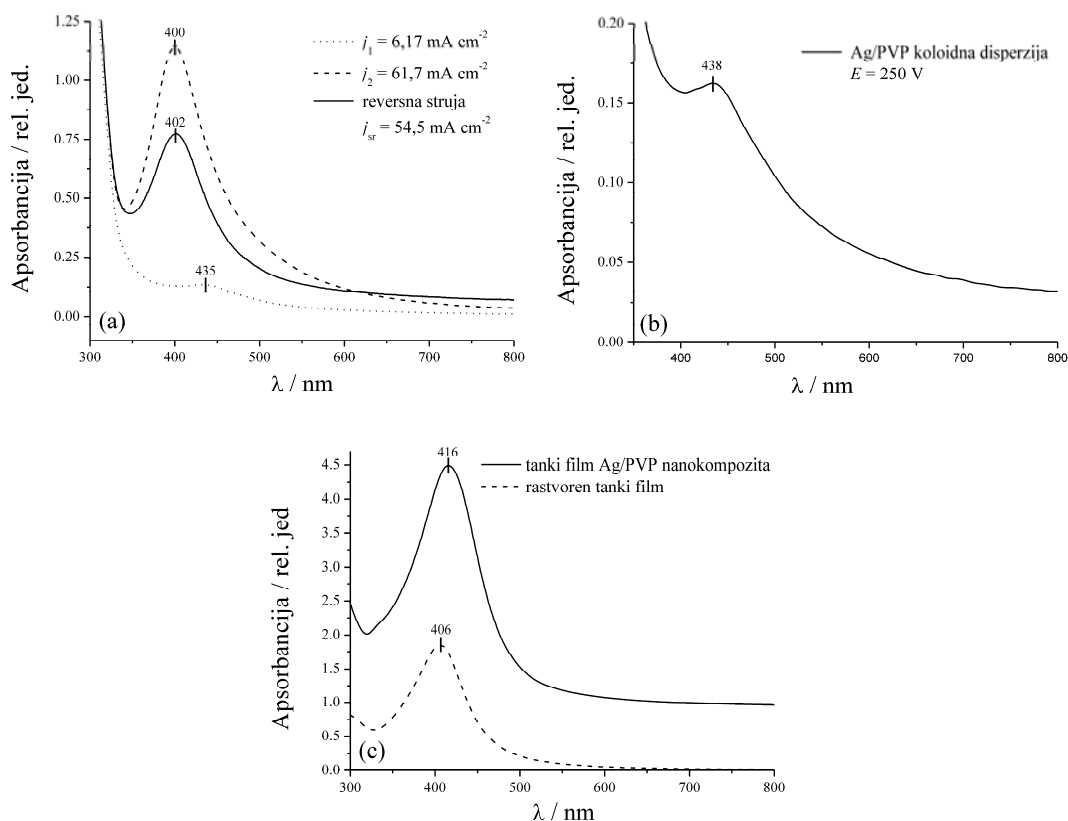
intenzitet pokazatelj veće efikasnosti elektrohemijske sinteze. UV-vidljiva spektroskopija je, takođe, tehnika koja efikasno meri srednju veličinu celokupne populacije nanočestica [239]. Posebno, teorijska predviđanja UV-vidljivih spektara za monodispergovane nanočestice bi trebalo da prate Lorencovu (Lorentzian) raspodelu, dok Gausova (Gauss) raspodela ukazuje na polidisperznost uzorka [240]. U slučaju Ag/PVP i Ag/alginatnih nanokompozita, UV-vidljivi spektri su u većoj saglasnosti sa Lorencovom, nego sa Gausovom raspodelom, što ukazuje na monodisperznu raspodelu veličina nanočestica srebra. Kao reprezentativan primer, prikazan je apsorpcioni spektar Ag/alginatne koloidne disperzije (slika 5.2).



*Slika 5.2. Apsorpcioni spektar Ag/alginatne koloidne disperzije ( $c = 3,9 \text{ mM}$ ,  $j = 50 \text{ mA cm}^{-2}$ ,  $t = 10 \text{ min}$ ), i odgovarajuće raspodele po Lorencu i Gausu na osnovu krive apsorpcionog spektra.*

**Apsorpcioni spektri Ag/PVP koloidnih disperzija** dobijenih pri galvanostatskim uslovima i primenom reversne struje prikazani su na slici 5.3 a,

dok su na slikama 5.3 b i c prikazani apsorpcioni spektri Ag/PVP koloidne disperzije dobijene pri potenciostatskim uslovima ( $E = 250$  mV, slika 5.3 b), i odgovarajućeg Ag/PVP nanokompozita u obliku tankog filma, dobijenog uparavanjem rastvarača, i rastvorenog tankog filma Ag/PVP nanokompozita (slika 5.3 c).



*Slika 5.3. Apсорpcioni spektri: a) Ag/PVP koloidnih disperzija dobijenih gustinama struje  $j_1 = 6,17 \text{ mA cm}^{-2}$  i  $j_2 = 61,7 \text{ mA cm}^{-2}$ , i primenom reversne struje  $j_{sr} = 54,5 \text{ mA cm}^{-2}$ ; b) Ag/PVP koloidne disperzije dobijene pri potenciostatskim uslovima,  $E = 250 \text{ mV}$ ; c) Ag/PVP nanokompozita u obliku tankog filma i rastvorenog Ag/PVP nanokompozita.*

Na slici 5.3 se uočava pojava maksimuma apsorpcionih spektara na talasnoj dužini od oko 400 nm, bez obzira na režim sinteze, što potvrđuje

prisustvo nanočestičnog srebra [47]. Apsorpcioni spektri Ag/PVP koloidnih disperzija dobijenih različitim gustinama struje,  $j_1 = 6,17 \text{ mA cm}^{-2}$  i  $j_2 = 61,7 \text{ mA cm}^{-2}$ , tokom 10 min, pokazuju maksimume na različitim talasnim dužinama (slika 5.3 a). Niža vrednost talasne dužine maksimuma apsorpcionog spektra Ag/PVP koloidne disperzije sintetisane pri  $j_2 = 61,7 \text{ mA cm}^{-2}$  (400 nm) ukazuje na manju veličinu Ag nanočestica [236]. Navedeni rezultat ukazuje na uticaj gustine struje na veličinu čestica, i to takav da se primenom veće gustine struje dobijaju manje nanočestice srebra.

Takođe, na osnovu intenziteta apsorpcionog spektra koji je proporcionalan koncentraciji redukovanih jona srebra [109, 237, 238], uočava se da Ag/PVP koloidna disperzija dobijena gustinom struje od  $61,7 \text{ mA cm}^{-2}$  ima najveću koncentraciju nanočestica srebra. Koloidna disperzija dobijena primenom reversne struje (slika 5.3 a) pokazuje maksimalnu vrednost na 402 nm, što je vrlo blisko vrednosti talasne dužine koja odgovara maksimumu apsorpcionog spektra Ag/PVP koloidne disperzije dobijene gustinom struje od  $61,7 \text{ mA cm}^{-2}$ . Ipak, s obzirom na niži intenzitet maksimuma apsorpcionog spektra ove koloidne disperzije, sinteza nanočestica srebra gustinom struje od  $61,7 \text{ mA cm}^{-2}$  se pokazala kao najefikasnija, jer su pod navedenim eksperimentalnim uslovima dobijene Ag nanočestice najmanje veličine i najveće koncentracije. Naime, reversna struja je primenjena pod pretpostavkom da će u anodnom pulsu doći do oksidacije srebra eventualno nataloženog na katodi, i da će njegovom naknadnom redukcijom, u katodnom pulsu, doći do povećanja prinosa dobijenih nanočestica srebra. Kako je dobijena niža vrednost intenziteta maksimuma apsorpcionog spektra u odnosu na galvanostatski režim, može se zaključiti da je u anodnom pulsu došlo do nepovratne oksidacije ne samo površinskog filma srebra na katodi, već i unutar koloidne disperzije Ag/PVP.

Intenzitet apsorpcionog spektra (1,1) i vrednost talasne dužine koja odgovara maksimumu apsorpcionog spektra (400 nm) Ag/PVP koloidne disperzije dobijene galvanostatski gustinom struje od  $61,7 \text{ mA cm}^{-2}$  odgovaraju istim Ag/PVP koloidne disperzije dobijene radijaciono-hemijskom sintezom (oko 1,8 i 400 nm, redom) [226]. S obzirom da se radijaciono-hemijska sinteza

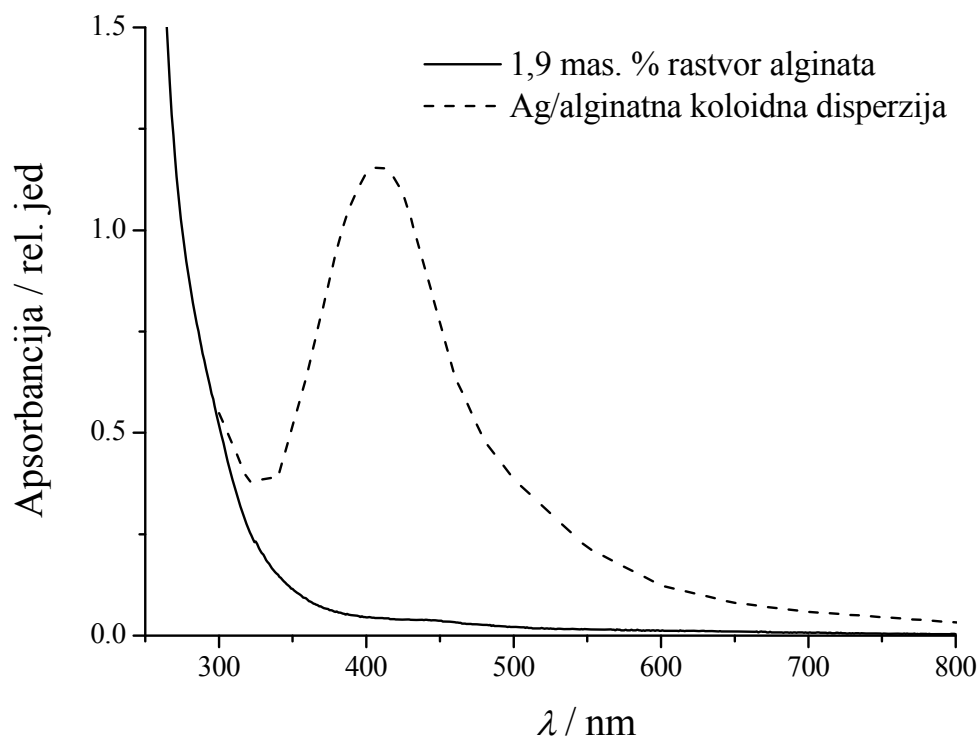
pokazala kao efikasna u sintezi nanočestica plemenitih metala, kako u rastvorima [237], tako i u hidrogelovima [109], može se zaključiti da se galvanostatskom sintezom većim vrednostima gustine struje dobijaju koloidne disperzije nanočestica srebra željenih osobina – visoke koncentracije nanočestica srebra, malih dimenzija.

Na slici 5.3 b se vidi da apsorpcioni spektar Ag/PVP koloidne disperzije dobijene pri potenciostatskim uslovima,  $E = 250$  mV, pokazuje nizak intenzitet i veću vrednost talasne dužine (438 nm) na kojoj se postiže maksimum. Navedene karakteristike spektra ukazuju na nisku koncentraciju dobijenih nanočestica srebra i njihovu brzu aglomeraciju. Poređenjem intenziteta maksimalnih vrednosti i odgovarajućih talasnih dužina apsorpcionih spektara koloidne disperzije, Ag/PVP nanokompozita u obliku tankog filma i rastvorenog nanokompozita (slika 5.3 c) sa apsorpcionim spektrom Ag/PVP koloidne disperzije dobijene pri potenciostatskim uslovima (slika 5.3 b), moglo bi se zaključiti da je Ag/PVP koloidna disperzija dobijena pri potenciostatskim uslovima nestabilna. Nestabilnost Ag/PVP koloidne disperzije se ogleda u značajnoj promeni intenziteta i položaja apsorpcionog maksimuma prilikom formiranja nanokompozitnog filma uparavanjem rastvarača, kao i njegovim ponovnim rastvaranjem. Naime, spektar Ag/PVP koloidne disperzije dobijene pri potenciostatskim uslovima pokazuje apsorpcioni maksimum na 438 nm. Očekivani položaj apsorpcionog maksimuma u spektru tankog filma Ag/PVP nanokompozita bi bio na talasnoj dužini većoj od 438 nm, s obzirom da talasna dužina oscilacije (tj. položaj apsorpcionog maksimuma) zavisi od više faktora, ne samo od veličine i oblika nanočestica, i prosečnog rastojanja između susednih nanočestica metala [241], već i od prirode okolnog medijuma [242]. Stoga se pomeranje položaja apsorpcionog maksimuma nanosfera srebra odvija prema većim talasnim dužinama, i može se objasniti promenom dielektričnih svojstava, odnosno električne permitivnosti okolnog medijuma, ili promenom samog medijuma [243]. Naime, medijum koji okružuje nanočestice srebra u Ag/PVP koloidnoj disperziji je voda, koja ima indeks refrakcije svetlosti 1,33. Nakon upravanja vode, PVP postaje okolni medijum za nanočestice srebra, sa indeksom refrakcije svetlosti od 1,53 [110], uzrokujući pomeranje položaja

apsorpcionog maksimuma ka većim talasnim dužinama, što je i pokazano kod Ag/PVP koloidne disperzije dobijene radijaciono-hemijskom sintezom, i odgovarajućeg tankog filma [226]. Međutim, u slučaju Ag/PVP koloidne disperzije dobijene elektrohemijom pri potenciostatskim uslovima, pomeranje položaja maksimuma apsorpcije je na 416 nm, što je vrednost niža od 438 nm. Nakon rehidratacije, odnosno rastvaranja tankog filma Ag/PVP nanokompozita, položaj apsorpcionog maksimuma dalje opada na 406 nm. Navedeno ukazuje da formiranje Ag/PVP nanokompozitnog filma nije reverzibilan proces, i da je tokom istog verovatno došlo do promene u veličini nanočestica srebra. Vrednost talasne dužine koja odgovara maksimumu apsorpcionog spektra Ag/PVP koloidne disperzije (438 nm) ukazuje na prisustvo većih nanočestica srebra nego u slučaju koloidne disperzije dobijene rastvaranjem tankog filma (406 nm).

Na osnovu svega navedenog, za dobijanje Ag/PVP koloidne disperzije koja je dalje karakterisana i drugim tehnikama odabrani su sledeći eksperimentalni uslovi: galvanostatski režim, gustina struje  $j = 61,7 \text{ mA cm}^{-2}$ , vreme  $t = 10 \text{ min}$ . Takođe, ovaj zaključak je iskorišćen i za sintezu Ag/alginate koloidne disperzije. Optimizacija elektrohemijske sinteze Ag/alginate koloidne disperzije je vršena pri galvanostatskim uslovima.

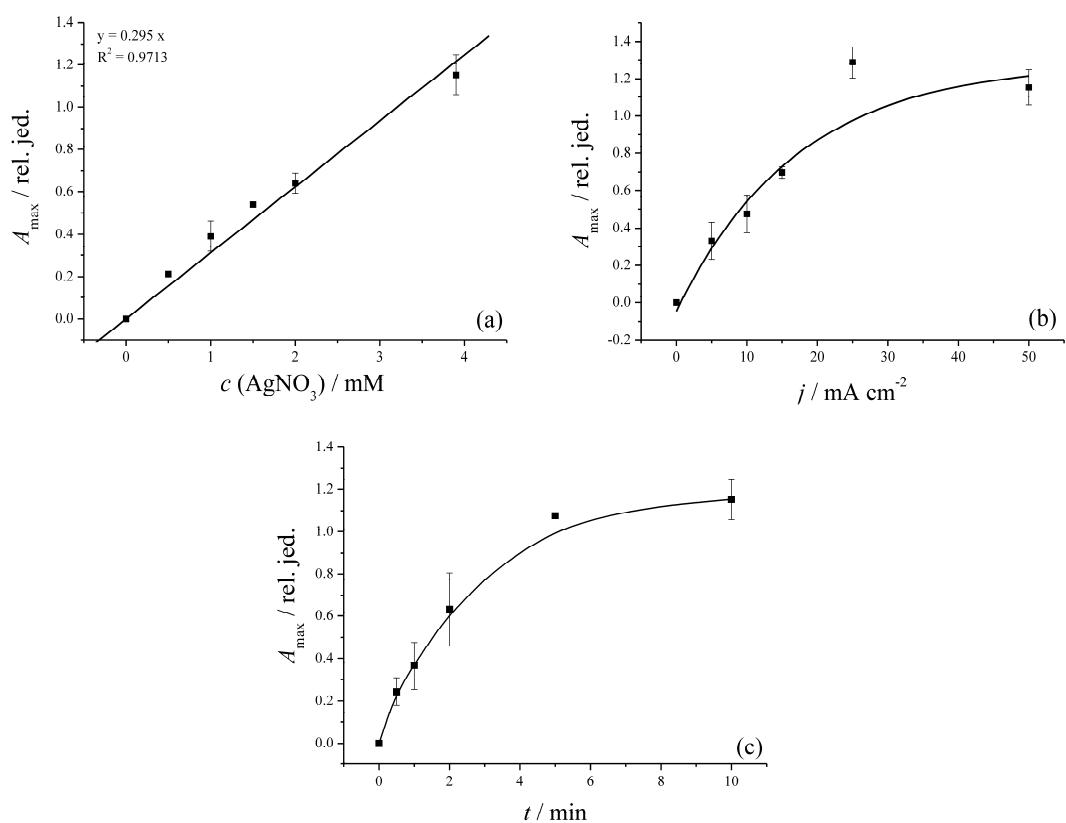
**Ag/alginate koloidne disperzije** sa 1,9 mas. % Na-alginata i različitim koncentracijama nanočestica srebra uspešno su dobijene elektrohemijom, što je i potvrđeno rezultatima UV-vidljive spektroskopije i TEM analize, koji će biti prikazani kasnije. Bez obzira na vrednosti koncentracije  $\text{AgNO}_3$  u polaznom rastvoru alginata za određenu gustinu struje i vreme implementacije, UV-Vis spektri Ag/alginate koloidnih disperzija su pokazali apsorpcioni maksimum u opsegu talasnih dužina od 405 – 440 nm, dok UV-Vis spektri rastvora alginata nisu imali apsorpcioni maksimum u ispitivanom opsegu talasnih dužina, kao što se vidi na slici 5.4. Navedeni rezultati odgovaraju efektu plazmonske rezonance koji potiče od kvantne veličine nanočestica srebra [242] i stoga potvrđuju postojanje Ag nanočestica u Ag/alginate koloidnoj disperziji.



Slika 5.4. Apsorpcioni spektri 1,9 mas. % alginatnog rastvora i Ag/alginatne koloidne disperzije ( $c = 3,9 \text{ mM}$ ,  $j = 50 \text{ mA cm}^{-2}$ ,  $t = 10 \text{ min}$ ).

UV-Vidljivi spektri su korišćeni i za određivanje uticaja koncentracije  $\text{AgNO}_3$  u polaznom rastvoru alginata za određenu gustinu struje i vreme implementacije na količinu i relativnu veličinu formiranih nanočestica, tj. na maksimum apsorbancije,  $A_{\text{maks}}$ , i talasnu dužinu maksimuma apsorbancije,  $\lambda_{\text{maks}}$ , u različitim Ag/alginatnim koloidnim disperzijama (slike 5.5 i 5.6, redom).

Slika 5.5 prikazuje zavisnost maksimuma apsorbancije u Ag/alginatnim koloidnim disperzijama u funkciji koncentracije  $\text{AgNO}_3$  u polaznom rastvoru alginata, primenjene gustine struje i vremena implementacije. Kao što se može videti sa ove slike, povećanje svih parametara sinteze, koncentracije  $\text{AgNO}_3$  u polaznom rastvoru alginata, primenjene gustine struje i vremena implementacije, je dovelo do povećanja maksimuma apsorpcije.

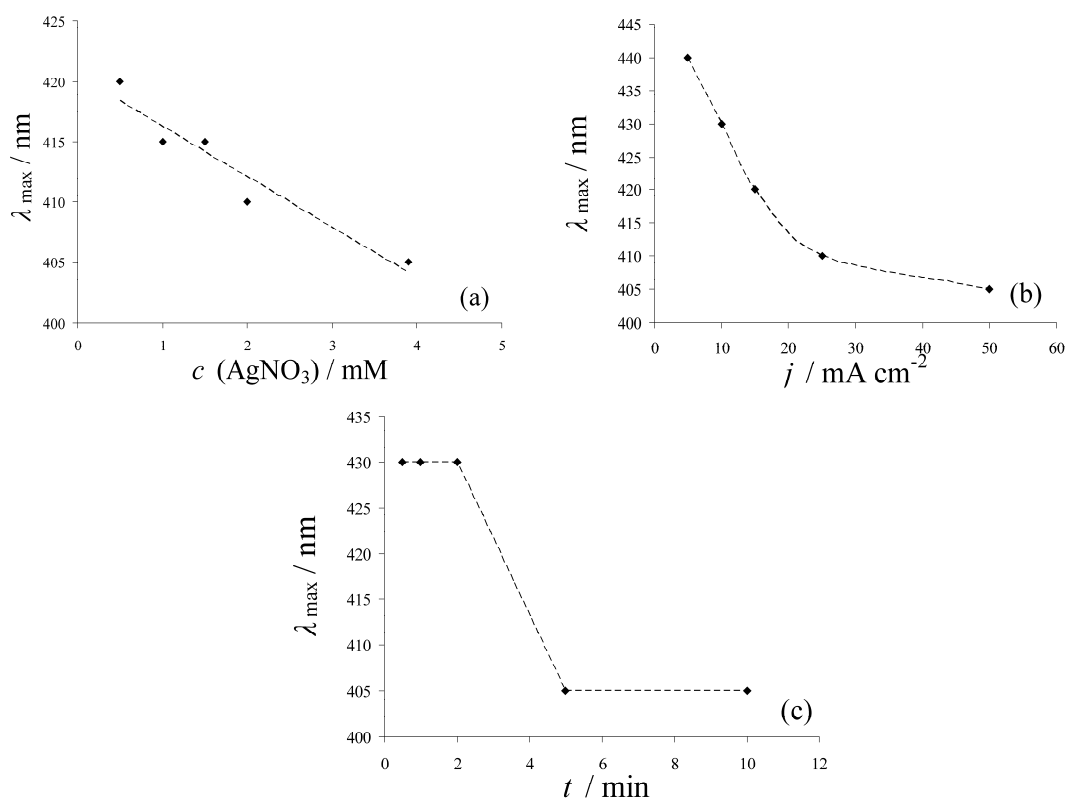


Slika 5.5. Zavisnost maksimuma apsorbancije,  $A_{\text{maks}}$ , u Ag/alginatnim koloidnim disperzijama u funkciji a) koncentracije  $\text{AgNO}_3$  u polaznom rastvoru alginata, b) primenjene gustine struje i c) vremena implementacije.

Primećeno je da povećanje koncentracije  $\text{AgNO}_3$  u polaznom rastvoru alginata, gustine struje i vremena implementacije dovodi do smanjenja  $\lambda_{\text{maks}}$ , dostižući 405 nm u rastvoru sintetisanom sa  $c = 3,9 \text{ mM}$ ,  $j = 50 \text{ mA cm}^{-2}$ ,  $t = 10 \text{ min}$  (slika 5.6).

Linearno povećanje maksimuma apsorpcije sa povećanjem koncentracije  $\text{AgNO}_3$  u polaznom rastvoru alginata (slika 5.5 a) je očekivano, s obzirom da je vrednost apsorbancije proporcionalna koncentraciji formiranih nanočestica srebra [109, 237, 238]. Veća koncentracija  $\text{Ag}^+$  jona u polaznom rastvoru alginata dovodi do veće koncentracije nanočestica. Slično tome, može se

očekivati i da će veće vrednosti gustine struje i duža vremena implementacije rezultirati intenzivnijim formiranjem nanočestica, kao što je i primećeno do vrednosti gustine struje od  $25 \text{ mA cm}^{-2}$  i vremena implementacije od 6 min. Dalje povećanje navedenih parametara je imalo mali uticaj na koncentraciju Ag nanočestica (slike 5.5 b i c) iako su doveli do pomeranja maksimuma apsorpcije ka  $405 \text{ nm}$ , kao što je već rečeno (slika 5.6).



*Slika 5.6. Zavisnost talasne dužine maksimuma apsorpcije,  $\lambda_{\text{maks}}$ , u Ag/alginatnim koloidnim disperzijama u funkciji a) koncentracije  $\text{AgNO}_3$  u polaznom rastvoru alginata, b) primenjene gustine struje i c) vremena implementacije.*

Kao rezultat navedenih ispitivanja, Ag/alginatna koloidna disperzija, dobijena na  $50 \text{ mA cm}^{-2}$ , tokom 10 min, sa koncentracijom  $\text{AgNO}_3$  u polaznom rastvoru alginata od  $3,9 \text{ mmol dm}^{-3}$ , je izabrana za dalja ispitivanja, kao i za



dobijanje Ag/alginatnih nanokompozitnih hidrogelova u obliku sfernih mikročestica, usled veće koncentracije i manjih dimenzija dobijenih Ag nanočestica.

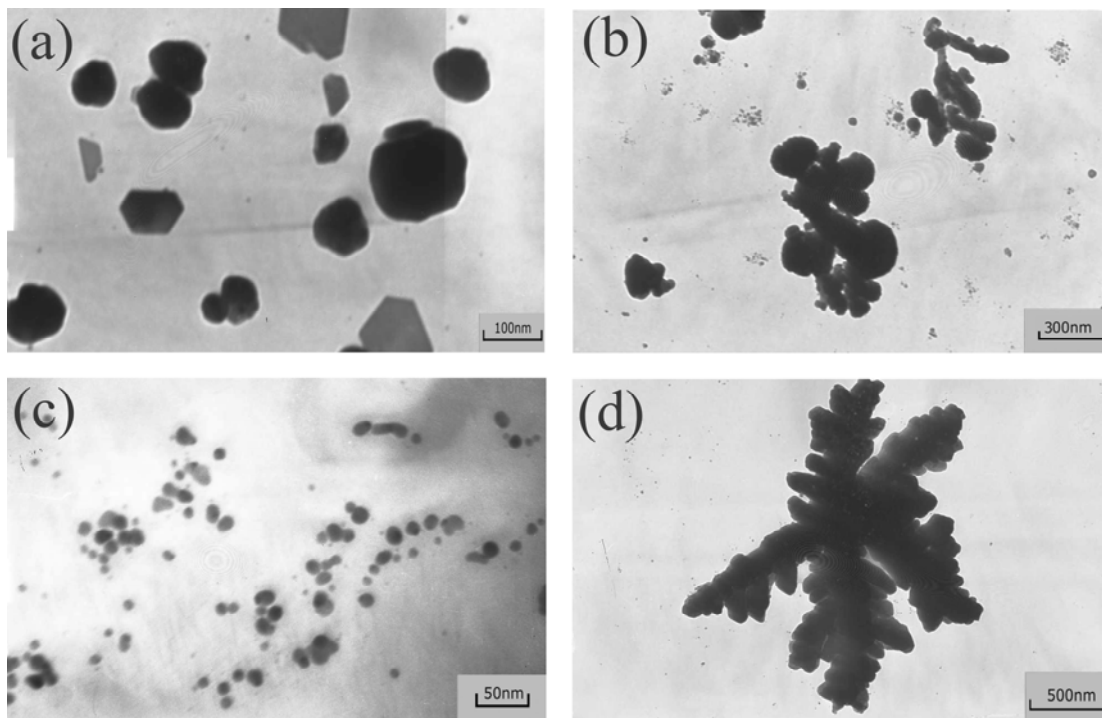
### 5.1.2. TRANSMISIONA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

Na slici 5.7 su prikazane TEM mikrofotografije **Ag/PVP koloidnih disperzija**, dobijenih sintezom pri galvanostatskim uslovima, gustom struje  $j = 61,7 \text{ mA cm}^{-2}$  (slika 5.7 a), primenom reversne struje  $j_{sr} = 54,5 \text{ mA cm}^{-2}$  (slika 5.7 b) i pri potenciostatskim uslovima,  $E = 250 \text{ mV}$  (slike 5.7 c i d).

Sa slika 5.7 a i c se uočava da su individualne čestice dobijene pri galvanostatskim i potenciostatskim uslovima sinteze, dok su primenom reversne struje sintetisani aglomerati čestica (slika 5.7 b). Veličina sintetisanih čestica srebra se razlikuje u zavisnosti od primenjene metode: galvanostatskom sintezom dobijene su čestice u opsegu veličina  $75 - 175 \text{ nm}$ , aglomerati čestica dobijeni primenom reversne struje su reda veličine  $250 \text{ nm}$ , pojedinačne čestice dobijene potenciostatskom sintezom su u opsegu veličina  $5 - 25 \text{ nm}$ .

Prema navedenim rezultatima, najmanje čestice se dobijaju primenom potenciostatske sinteze. Ipak, kako su pri potenciostatskim uslovima dobijene i dendritske strukture (slika 5.7 d), veličine oko  $2 \mu\text{m}$ , ova metoda nije pogodna za sintezu pojedinačnih nanočestica srebra. Dendriti najverovatnije nastaju mehanizmom rasta po kom se sekundarne nanočestice dobijaju ireverzibilnim vezivanjem primarnih nanočestica na veoma orijentisan način (eng. *oriented attachment*) [244]. Prema navedenom mehanizmu, veliki broj malih nanočestica agregira u monokristalne dendrite metala. Naime, pokazano je da čak i nanošenje rastvora  $\text{AgNO}_3$  na bakarne mrežice, i bez korišćenja agenasa stabilizacije ili redukcije može dovesti do stvaranja dendritskih struktura [245]. Slične dendritske strukture nanočestica srebra su dobijene i radijaciono-hemijskom sintezom Ag/PVP koloidne disperzije [226]. Ove strukture imaju značajan potencijal primene u sledećoj generaciji gorivnih ćelija, katalizatora i antimikrobnih prevlaka.

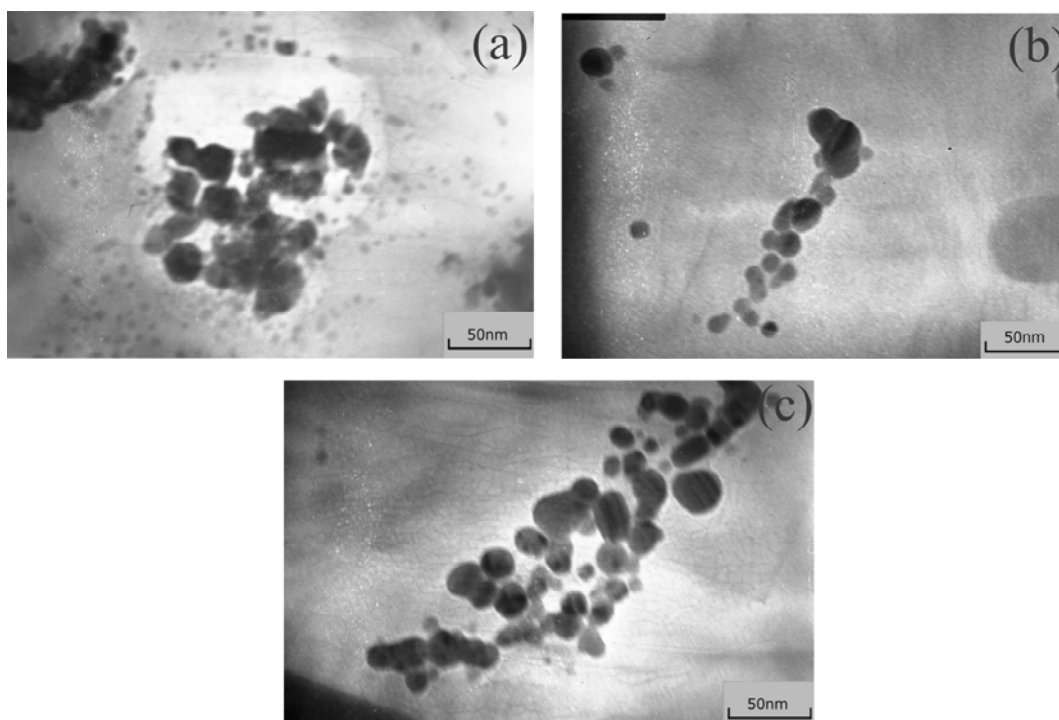
Na osnovu rezultata TEM analize, pokazano je da se metod galvanostatske sinteze može uspešno primeniti za dobijenje pojedinačnih nanočestica srebra.



*Slika 5.7. TEM mikrofotografije Ag nanočestica dobijenih: a) galvanostatskom sintezom gustinom struje  $61,7 \text{ mA cm}^{-2}$  tokom 10 min, b) primenom reversne struje  $j_{\text{sr}} = 54,5 \text{ mA cm}^{-2}$ ; c) potenciostatskom sintezom na potencijalu od 250 mV tokom 10 min; d) dendrit formiran aglomeracijom Ag nanočestica dobijenih potenciostatskom sintezom.*

**Ag/alginate koloidne disperzije** dobijene variranjem vrednosti gustine struje pri koncentraciji  $\text{AgNO}_3$  u polaznom rastvoru alginata od 3,9 mM, za vreme implementacije od 10 min, su analizirane transmisionom elektronskom mikroskopijom (slika 5.8). Dobijene su sferne nanočestice, prečnika od oko 10 – 30 nm, nezavisno od primenjene gustine struje. Nanočestice sintetisane gustinom struje od  $5 \text{ mA cm}^{-2}$  su nešto manje, ali formiraju veće agregate (slika 5.8 a), pa se može smatrati da primenjena gustina

struje ne utiče na veličinu nanočestica srebra. Poznato je iz literature [120, 246] da nanočestice ovih dimenzija pokazuju antimikrobna svojstva.

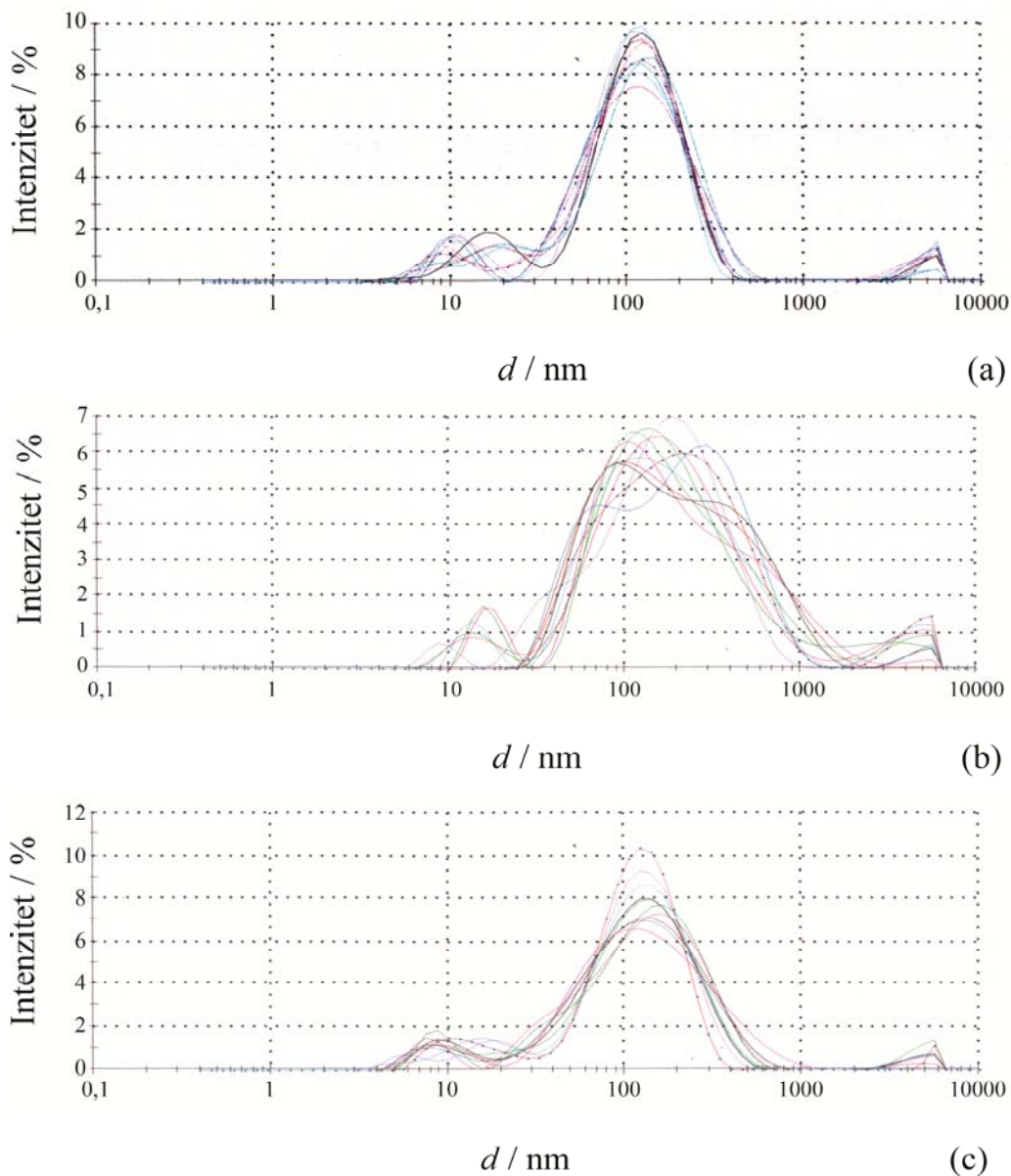


*Slika 5.8. TEM mikrofotografije nanočestica srebra u Ag/alginatnim koloidnim disperzijama dobijenim elektrohemijskom sintezom iz rastvora početne koncentracije  $\text{AgNO}_3$  od 3,9 mM tokom 10 min gustinom struje od:*

*a)  $j = 5 \text{ mA cm}^{-2}$ , b)  $j = 15 \text{ mA cm}^{-2}$ , i c)  $j = 50 \text{ mA cm}^{-2}$ .*

### **5.1.3. RASPODELA VELIČINA NANOČESTICA**

Raspodela veličina nanočestica je određena metodom na principu analize difraktovane svetlosti. Na slici 5.9 prikazana je raspodela veličina nanočestica srebra dobijenih u rastvoru PVP galvanostatskom sintezom gustinom struje od  $61,7 \text{ mA cm}^{-2}$  tokom 10 min (slika 5.9 a), primenom reversne struje  $j_{\text{sr}} = 54,5 \text{ mA cm}^{-2}$  (slika 5.9 b), i potenciostatskom sintezom na potencijalu od 250 mV tokom 10 min (slika 5.9 c).

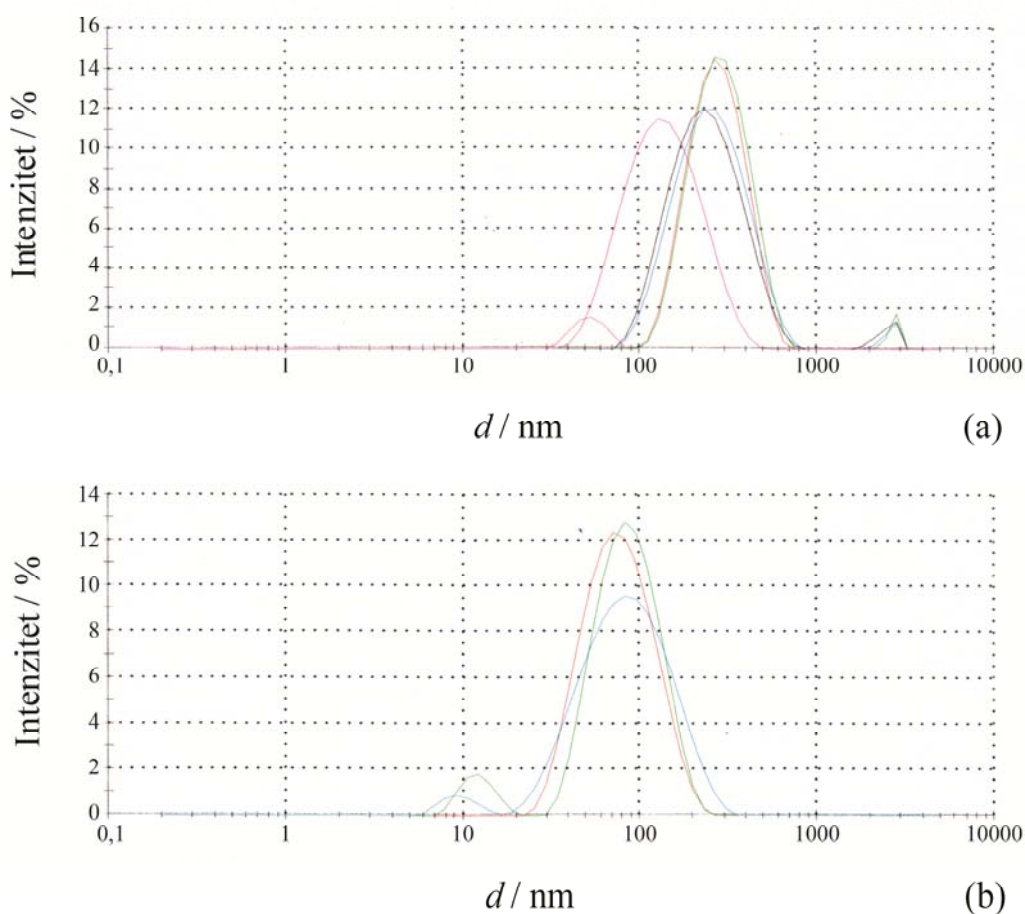


Slika 5.9. Raspodela veličina nanočestica srebra dobijenih u rastvoru PVP: a) galvanostatskom sintezom gustinom struje  $61,7 \text{ mA cm}^{-2}$  tokom 10 min, b) primenom reversne struje od  $j_{\text{sr}} = 54,5 \text{ mA cm}^{-2}$ ; c) potencijostatskom sintezom na potencijalu od 250 mV tokom 10 min.

Sa slike 5.9 a se može uočiti da je galvanostatskom sintezom dobijena uniformna raspodela veličina nanočestica srebra. Takođe, primenom galvanostatskih uslova dobijene su nanočestice srebra najmanjeg prečnika,

srednje vrednosti 75,1 nm, što je u saglasnosti sa rezultatima TEM analize. Na slici 5.9 b očigledna je neuniformna raspodela veličina nanočestica, dobijena primenom reversne struje, uz skoro dvostruko veće nanočestice srebra, prečnika 123 nm. Primenom potenciostatskih uslova dobijene su nanočestice srebra prilično uniformne raspodele veličina, i srednjeg prečnika nešto većeg nego pri galvanostatskim uslovima, i to 76,4 nm (slika 5.9 c).

Na slici 5.10 prikazana je raspodela veličina nanočestica srebra dobijenih u alginatnom rastvoru galvanostatskom sintezom gustinom struje od  $5 \text{ mA cm}^{-2}$  tokom 10 min (slika 5.10 a), i gustinom struje od  $50 \text{ mA cm}^{-2}$  tokom 10 min (slika 5.10 b).



Slika 5.10. Raspodela veličina nanočestica srebra dobijenih u rastvoru alginata galvanostatskom sintezom gustinom struje od a)  $5 \text{ mA cm}^{-2}$ , i b)  $50 \text{ mA cm}^{-2}$ , tokom 10 min.

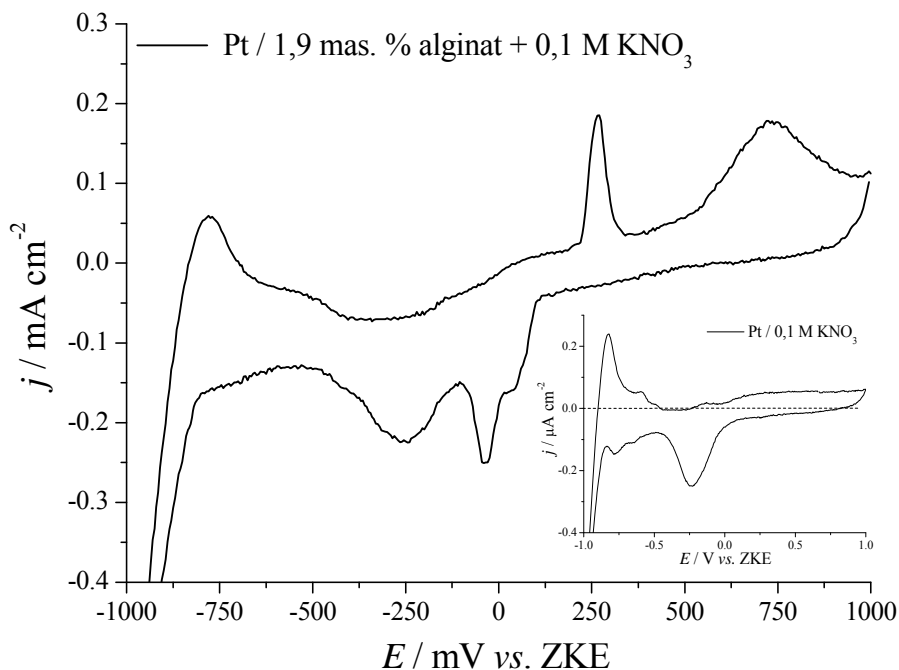
Sa slike 5.10 a se može uočiti da su galvanostatskom sintezom nižom gustinom struje dobijene nanočestice srebra neuniformne raspodele veličina. Dobijene nanočestice srebra su većeg prečnika, srednje vrednosti oko 108 nm. Sa druge strane, galvanostatskom sintezom većom gustinom struje dobijene su nanočestice srebra prilično uniformne raspodele veličina, i srednjeg prečnika znatno manje veličine, 64,7 nm (slika 5.10 b).

#### 5.1.4. CIKLIČNA VOLTAMETRIJA

Ciklična voltometrija je snimljena za Pt elektrodu u 1,9 mas. % rastvoru alginata (slika 5.11), 0,1 M rastvoru  $\text{KNO}_3$ , (slika 5.11, Insert) i u Ag/alginatnoj koloidnoj disperziji ( $c = 3,9 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $j = 50 \text{ mA cm}^{-2}$ ,  $t = 10 \text{ min}$ , slika 5.12), kao i za Pt elektrodu u 1,9 mas. % rastvoru alginata koji je sadržao 0,1 mol  $\text{dm}^{-3}$   $\text{KNO}_3 + 3,9 \text{ mmol dm}^{-3}$   $\text{AgNO}_3$  (slike 5.12 i 5.13) u cilju dobijanja boljeg uvida u proces redukcije srebra.

Ciklični voltamogram Pt elektrode u 1,9 mas. % rastvoru alginata sa 0,1 M  $\text{KNO}_3$  (slika 5.11) je pokazao prisustvo anodnog pika na oko 270 mV, i katodni pik na -40 mV. Ovi strujni pikovi opisuju redoks reakcije alginata. Naime, -OH grupe piranoznih prstenova koji potiču od ostataka uronskih kiselina u molekulu alginata (slika 2.3) mogu da se oksiduju do  $>\text{C}=\text{O}$  ili  $-\text{COOH}$  grupe. Pojava novih apsorpcionih traka koje odgovaraju prisustvu karboksilne grupe u IC spektru alginata posle oksidacije je pokazana i u literaturi [236], što je u saglasnosti sa zaključkom da se navedeni anodni i katodni pikovi javljaju usled oksido-redukcije -OH grupa u (i iz) karboksilne grupe. Takođe, vidi se da su vrednosti gustina struje za ove strujne pikove veoma niske, oko  $0,2 \text{ mA cm}^{-2}$ , što ukazuje na mali udeo oksidisanih -OH grupa. Ovi strujni pikovi se ne javljaju u cikličnim voltamogramima Pt elektrode u rastvorima koji sadrže srebro (slike 5.12 i 5.13), ili su preklopljeni sa intenzivnijim strujnim pikovima koji potiču od oksido-redukcioni procesa  $\text{Ag}/\text{Ag}^+$ , ili nestaju usled interakcije hidroksilne grupe iz alginata sa jonima i/ili nanočesticama srebra. Široki katodni strujni pik koji se javlja na oko -250 mV, potiče od redukcije Pt oksida formiranog tokom snimanja u anodnom smeru (slika 5.11, Insert). Anodni par ovog pika nije

izražen, ali se uočava široko povećanje gustine struje u opsegu potencijala od 0,0 do 1,0 V. Ipak, na voltamogramu Pt elektrode u rastvoru alginata i  $\text{KNO}_3$  (slika 5.11) anodni par se uočava na oko 735 mV.

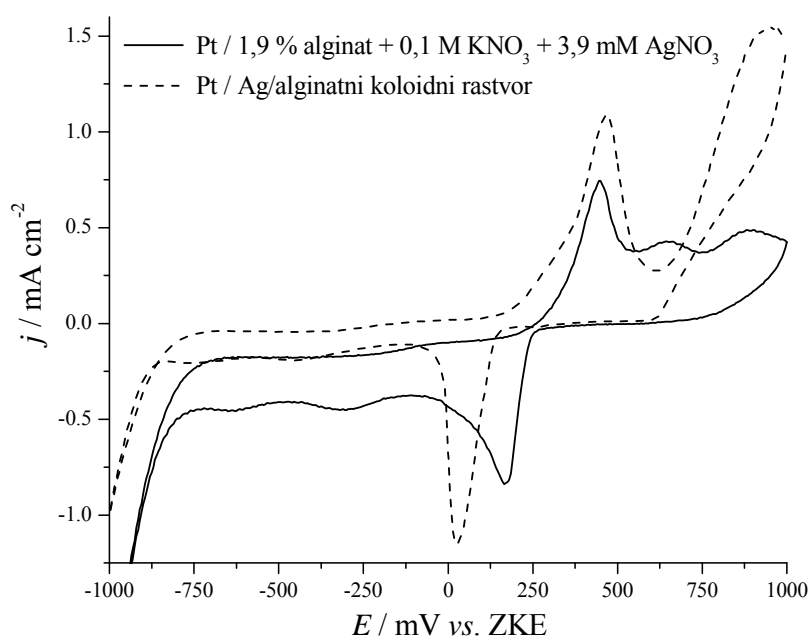


Slika 5.11. Ciklični voltamogram Pt elektrode u 1,9 mas. % rastvoru alginata sa 0,1 M  $\text{KNO}_3$ . Insert: Ciklični voltamogram Pt elektrode u rastvoru 0,1 mol  $\text{dm}^{-3}$   $\text{KNO}_3$ .

Slika 5.12 pokazuje stacionarne ciklične voltamograme Pt elektrode u 1,9 mas. % rastvoru alginata koji sadrži 0,1 mol  $\text{dm}^{-3}$   $\text{KNO}_3$  + 3,9 mmol  $\text{dm}^{-3}$   $\text{AgNO}_3$  i u Ag/alginatnoj koloidnoj disperziji ( $c = 3,9$  mmol  $\text{dm}^{-3}$ ,  $j = 50$  mA  $\text{cm}^{-2}$ ,  $t = 10$  min), koji su pokazali anodne pikove, na oko 465 i 450 mV, redom.

Kao odgovarajući par, jedan katodni pik se pojavio na oko 165 mV (u 1,9 mas. % rastvoru alginata koji sadrži 0,1 mol  $\text{dm}^{-3}$   $\text{KNO}_3$  + 3,9 mmol  $\text{dm}^{-3}$   $\text{AgNO}_3$ ), i oko 25 mV (u Ag/alginatnoj koloidnoj disperziji), koji odgovara

redukciji srebra. U Ag/alginatnoj koloidnoj disperziji se javlja pomeraj ovog katodnog pika, usled pomeranja početka redukcije, ka negativnijim vrednostima potencijala, što može ukazivati na olakšanu redukciju. Naime, ukoliko alginat, kao i PVP [28], formira  $\text{Ag}_m^{m+}$ -alginat kompleks, dolazi do povećanja elektronske gustine sp orbitale jona srebra u ovom kompleksu u odnosu na hidratizane  $\text{Ag}^+$  jone. Usled toga, dolazi do lakše redukcije ovih jona u odnosu na hidratizane jone srebra u rastvoru bez prisustva agensa stabilizacije.

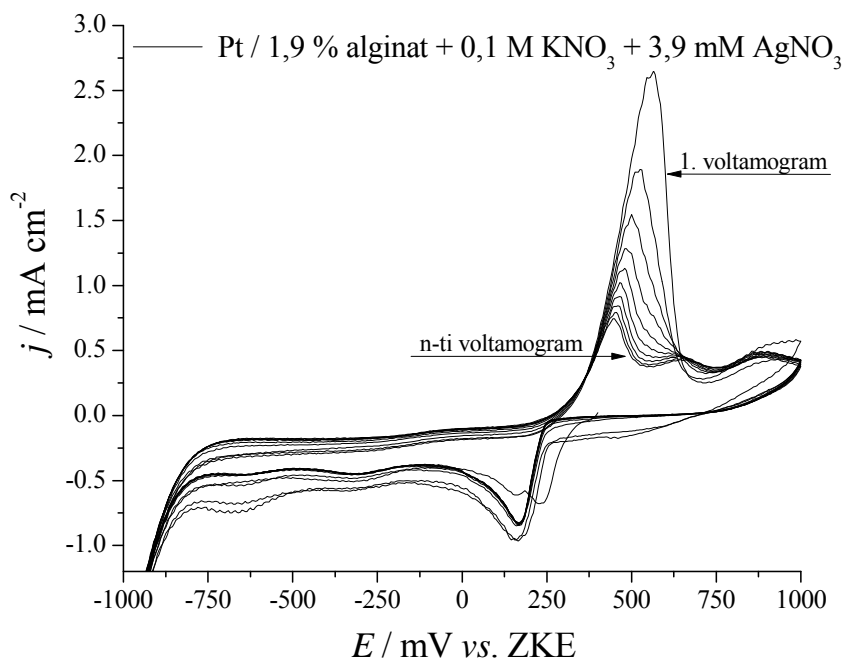


*Slika 5.12. Ciklični voltamogrami Pt elektrode u 1,9 mas. % rastvoru alginata sa  $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{KNO}_3 + 3,9 \text{ mmol dm}^{-3} \text{AgNO}_3$  i Pt elektrode u Ag/alginatnoj koloidnoj disperziji ( $c = 3,9 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $j = 50 \text{ mA cm}^{-2}$ ,  $t = 10 \text{ min}$ ).*

Na stacionarnom cikličnom voltamogramu Pt elektrode u 1,9 mas. % rastvoru alginata koji sadrži  $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{KNO}_3 + 3,9 \text{ mmol dm}^{-3} \text{AgNO}_3$ , drugi anodni maksimum je primećen na oko 645 mV (slika 5.12). Kako ovaj maksimum nema odgovarajući par, trebalo bi razmotriti sve voltamograme Pt elektrode u ovom rastvoru (slika 5.13).



Na slici 5.13, jedan anodni pik se javlja na oko 565 mV, uz sniženje intenziteta i pomeranje mesta pojave pika kao negativnijim vrednostima potencijala sa svakim sledećim ciklusom, dostižući vrednost od 450 mV u stacionarnom voltamogramu (n-ti voltamogram). Između šestog i sedmog voltamograma javlja se novi anodni pik na oko 645 mV kao rezultat razdvajanja odgovarajućeg pika (na 565 mV). Katodni par za anodni pik koji se javlja na 645 mV nije uočen, pa se može zaključiti da se katodni proces redukcije srebra ne menja tokom vremena.



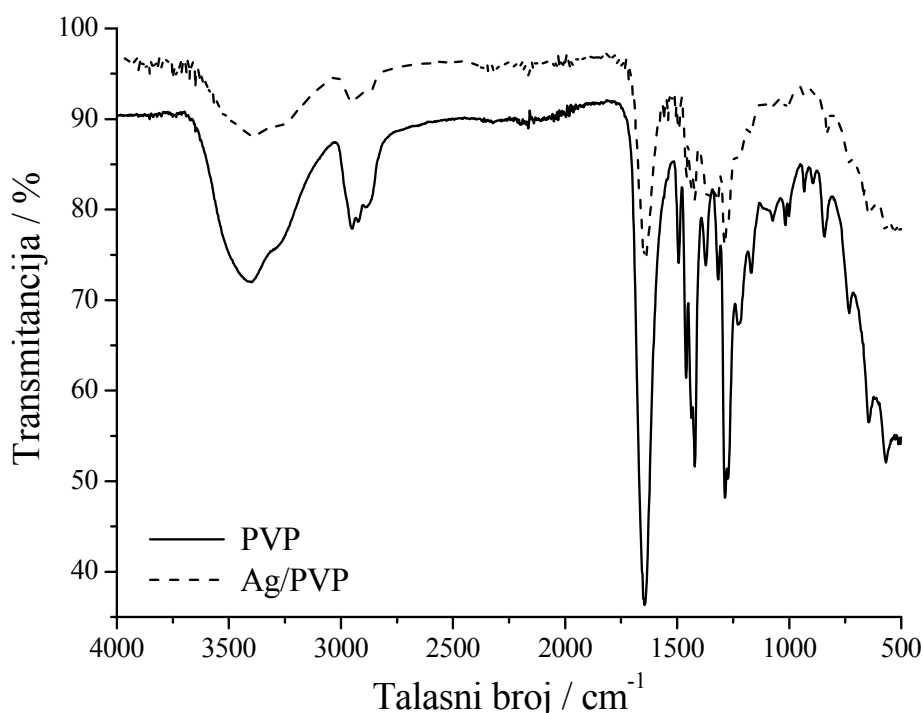
Slika 5.13. Ciklični voltamogrami Pt elektrode u 1,9 mas. % rastvoru alginata koji sadrži 0,1 mol  $dm^{-3}$   $KNO_3$  + 3,9 mmol  $dm^{-3}$   $AgNO_3$ .

Sa druge strane, smanjenje intenziteta strujnog pika na 565 mV ukazuje na smanjenje sadržaja srebra dostupnog za oksidaciju, usled sinteze nanočestica srebra. Pojava drugog anodnog pika na pozitivnijem potencijalu ukazuje da određena količina srebra postaje još manje podložna oksidaciji [236], verovatno usled zarobljavanja nanočestica srebra molekulima alginata u toku ovog

procesa, ukazujući na značajnu stabilnost nanočestica srebra. Navedeno ukazuje da je izbor alginata za elektrohemijsku sintezu nanočestica srebra u rastvoru dobar, uzimajući u obzir da se stabilnije nanočestice formiraju u rastvorima agensa stabilizacije koji pokazuju određeni nivo vezivanja sa jonima srebra i formiranim nanočesticama srebra, što će biti pokazano i rezultatima FT-IR spektroskopije, u sledećem poglavlju.

### 5.1.5. INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA SA FURIJEVOM TRANSFORMACIJOM

Na slici 5.14 prikazani su infracrveni spektri tankih filmova PVP i Ag/PVP nanokompozita, dobijenih uparavanjem rastvarača iz rastvora PVP, odnosno Ag/PVP koloidne disperzije dobijene pri galvanostatskim uslovima, gustinom struje od  $61,7 \text{ mA cm}^{-2}$ .



Slika 5.14. Infracrveni spektri tankih filmova PVP i Ag/PVP nanokompozita.

U Tabeli 5.1 prikazane su vrednosti talasnog broja na kojima se pojavljuju maksimumi na infracrvenim spektrima tankih filmova PVP i Ag/PVP nanokompozita.

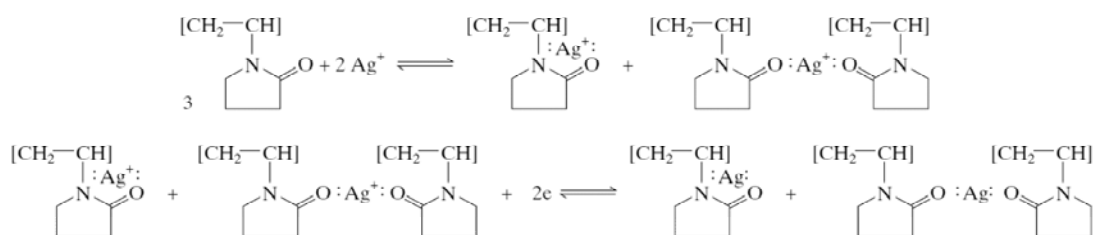
Infracrveni spektri tankih filmova Ag/PVP nanokompozita, prikazani na slici 5.14 pokazuju pomeranja pikova nanokompozita u odnosu na PVP na više mesta, od kojih je najvažnije pomeranje u opsegu talasnog broja između 1695 i 1615  $\text{cm}^{-1}$ , što je opseg pojavljivanja amid-karbonilne grupe, koji predstavlja jedan od najširih opsega za jednu grupu u infracrvenom (IC) spektru [247].

*Tabela 5.1. Vrednosti talasnog broja na kojima se pojavljuju maksimumi na infracrvenim spektrima PVP i Ag/PVP nanokompozita*

Talasni broj / $\text{cm}^{-1}$		Podaci iz literature [247]
PVP	Ag/PVP	
3406	3392	O–H, visoka c: 3200 – 3448 $\text{cm}^{-1}$ , širok pik
2950	2953	istezanje CH grupe: 2954 $\text{cm}^{-1}$
1645	1641	amid-karbonil grupa: 1615 – 1695 $\text{cm}^{-1}$
1427	1425	vibracije 3 <sup>o</sup> azota: 1424 – 1462 $\text{cm}^{-1}$
1278	1282	N–OH kompleks: 1288 $\text{cm}^{-1}$

IC spektar PVP je pokazao sledeće trake: široku apsorpcionu traku na 3406  $\text{cm}^{-1}$ , koja odgovara vibracijama –OH<sup>-</sup> grupe, potom na 2950  $\text{cm}^{-1}$ , koja se pripisuje vibracijama –CH grupe. Najznačajnija traka koja se javlja u spektru PVP, čiji monomer, *N*-vinil-2-pirolidon, sadrži amid-karbonilnu grupu, je ona na 1645  $\text{cm}^{-1}$ . Sledeće karakteristične trake se javljaju na 1427  $\text{cm}^{-1}$  i 1278  $\text{cm}^{-1}$ , usled vibracija tercijarnog atoma azota i N–OH kompleksa, redom. Dobijeni rezultati u saglasnosti sa podacima za PVP nađenim u literaturi [247–249].

Sa druge strane, u spektru Ag/PVP nanokompozitnog filma se uočavaju neke razlike u odnosu na spektar PVP filma, ukazujući na interakcije između molekula PVP i nanočestica srebra. Osnovna razlika je uočena u pomeranju trake koja se pripisuje amid-karbonilnoj grupi, i to sa 1645 cm<sup>-1</sup> u spektru PVP, ka 1641 cm<sup>-1</sup> u spektru Ag/PVP nanokompozitnog filma. Pomeranje talasnog broja >N–C=O grupe se može objasniti slabljenjem amid-karbonilne veze usled delimičnog doniranja elektronskog para azota ili kiseonika iz PVP slobodnoj orbitali nanočestica srebra. Takođe, položaji traka pripisanih vibracijama tercijarnog azota (na 1427 cm<sup>-1</sup>) i N–OH kompleksa (na 1278 cm<sup>-1</sup>), koje su uočene u spektru PVP, su pomereni ka 1425 cm<sup>-1</sup> i 1282 cm<sup>-1</sup>, redom, u spektru Ag/PVP nanokompozitnog filma. Navedene razlike ukazuju na koordinativno vezivanje atoma azota i/ili kiseonika iz molekula PVP i nanočestica srebra, najverovatnije mehanizmom prikazanim jednačinama na slici 5.15 [249, 250].



Slika 5.15. Mogućnosti za koordinativno vezivanje nanočestica srebra i PVP [249, 250].

Ipak, s obzirom da se sve promene u pozicijama traka odnose na karakteristične grupe koje sadrže azot, može se pretpostaviti da je osnovni put koordinativnog vezivanja nanočestica srebra dobijenih elektrohemijском sintezom sa molekulima PVP preko atoma azota u amid-karbonilnom prstenu PVP. Takođe, nađeno je da i veličina nanočestica srebra uslovljava tip koordinacionog vezivanja, usled sternih smetnji pirolidonskog prstena PVP [248]. S druge strane, elektronegativnost azota koja je manja nego elektronegativnost kiseonika, dovodi do povećanja sposobnosti doniranja elektrona azota, u poređenju sa kiseonikom. Zbog toga se nanočestice srebra

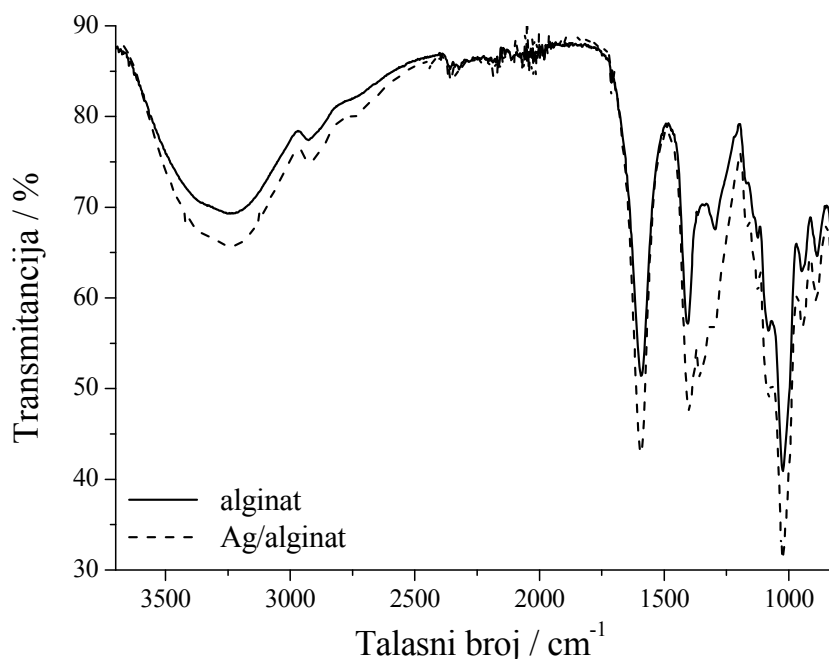
prečnika manjeg od 50 nm koordinativno vezuju za azot, bez obzira na sterne smetnje. Ipak, u slučaju nanočestica sa većim prečnikom, sterne smetnje pirolidonskog prstena imaju veći uticaj, i ne mogu se zanemariti, pa koordinativno vezivanje nanočestica srebra sa molekulima PVP ide preko atoma kiseonika. S obzirom da najveći broj nanočestica srebra u Ag/PVP koloidnoj disperziji dobijenoj elektrohemijском sintezom pri galvanostatskim uslovima, gustinom struje od  $61,7 \text{ mA cm}^{-2}$  ima prečnik oko 75 nm, kao što je pokazano TEM analizom (odjeljak 5.1.2, slika 5.7 a) i ispitivanjem raspodele veličina čestica (odjeljak 5.1.3, slika 5.9) može se zaključiti da je osnovni put interakcije nanočestica srebra sa molekulima PVP koordinativno vezivanje sa atomom kiseonika iz pirolidonskog prstena PVP. Stoga, PVP se može koristiti kao agens stabilizacije prilikom elektrohemijske sinteze Ag nanočestica, s obzirom da pre svega atomi kiseonika, ali i atomi azota polarnih grupa PVP monomera, *N*-vinil-2-pirolidona, mogu donirati elektronski par sp hibridizovanim  $\text{Ag}^+$  jonima, formirajući linearnu koordinativnu vezu [251].

Sličan infracrveni spektar je dobijen i ispitivanjem tankog filma Ag/PVP nanokompozita koloidne disperzije dobijene radijaciono-hemijском sintezom [226]. Na spektru su se pojavile trake koje odgovaraju istim grupama, sa malo pomerenim položajima. S obzirom da je sastav rastvora za sintezu isti, kao i rezultat vezivanja Ag nanočestica sa lancima PVP, uticaj načina sinteze je zanemarljiv. Jedina značajna razlika između ove dve koloidne disperzije (posledično i nanokompozitna filma) je u veličini dobijenih nanočestica srebra: nanočestice srebra dobijene elektrohemijском sintezom su kao što je već rečeno u proseku prečnika 75 nm, dok su iste dobijene radijaciono-hemijском sintezom u proseku prečnika 6 nm [226]. Na osnovu veličine nanočestica, suprotno od nanočestica srebra dobijenih elektrohemijском sintezom, očekivano je da se interakcija Ag nanočestica dobijenih radijaciono-hemijском sintezom sa molekulima PVP vrši mahom koordinativnim vezivanjem sa atomom azota iz pirolidonskog prstena PVP [248].

Interakcija molekula alginata sa nanočesticama srebra je ispitana FT-IR spektroskopijom, na tankim filmovima alginata i Ag/alginatnog nanokompozita.

Filmovi su dobijeni uparavanjem rastvarača iz 1,9 mas. % rastvora alginata i Ag/alginate koloidne disperzije ( $c = 3,9 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $j = 50 \text{ mA cm}^{-2}$ ,  $t = 10 \text{ min}$ ).

Dobijeni IC spektri su prikazani na slici 5.16. Talasni brojevi karakterističnih traka i odgovarajuće oznake, za tanke filmove alginata i Ag/alginate nanokompozita su prikazani u Tabeli 5.2.



*Slika 5.16. Infracrveni spektri tankih filmova alginata i Ag/alginate nanokompozita ( $c = 3,9 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $j = 50 \text{ mA cm}^{-2}$ ,  $t = 10 \text{ min}$ ).*

Spektar alginata je pokazao sledeće apsorpcione trake: široku traku sa maksimumom apsorpcije u oblasti između 3250 – 3400  $\text{cm}^{-1}$  (na 3257  $\text{cm}^{-1}$ ) ukazujući na slabo vodonično vezivanje hidroksilne grupe, praćenu maksimumom na 2927  $\text{cm}^{-1}$ , koji može biti pripisan vibracijama CH grupe. Spektar alginata takođe pokazuje apsorpcione maksimume na 1712, 1593 i 1406  $\text{cm}^{-1}$  koji odgovaraju vibracijama istezanja H–O–C=O grupe,

asimetričnom i simetričnom istežanju karboksilne grupe, redom, praćene apsorpcionim trakama karakterističnim za polisaharidne strukture koje se javljaju na 1367 i 1296  $\text{cm}^{-1}$  (C–C–H i O–C–H savijanje), 1124  $\text{cm}^{-1}$  (C–O istežanje), 1082  $\text{cm}^{-1}$  (C–O i C–C istežanje piranoznih prstenova) i na 1024  $\text{cm}^{-1}$  (C–O istežanje).

*Tabela 5.2. Talasni brojevi karakterističnih grupa i odgovarajuće oznake za tanke filmove alginata i Ag/alginatnog nanokompozita*

Talasni broj / $\text{cm}^{-1}$		Oznaka [252-255]
Alginat	Ag/alginat	
3257	3244	$\nu(\text{OH})$ , slaba H–veza
2927	2929	$\nu(\text{CH})$ , $\alpha$ –anomer
1712	1712	$\nu(\text{HOCO})$
1593	1593	$\nu(\text{COO})_{\text{asim}}$
1406	1400	$\nu(\text{COO})_{\text{sim}}$
1367	1358	$\delta(\text{COH}) + \delta(\text{OCH})$
1296	1298	$\delta(\text{COH}) + \delta(\text{OCH})$
1169	1169	$\nu(\text{CC}) + \nu(\text{CO})$
1124	1124	$\nu(\text{CO}) + \nu(\text{COC})$
1082	1078	$\nu(\text{CO}) + \nu(\text{CCC})$
1024	1026	$\nu(\text{CO}) + \nu(\text{CCO}) + \delta(\text{CC})$
949	947	$\nu(\text{CO}) + \nu(\text{CCH})$
887	891	$\delta(\text{CH})$ , $\beta$ –anomer
814	816	$\delta(\text{CH})$ , $\alpha$ –anomer

Takođe, uočavaju se i karakteristične trake ostataka uronskih kiselina sa maksimumima na  $949\text{ cm}^{-1}$  (vibracije istezanja C–O grupe),  $887\text{ cm}^{-1}$  (C1–H vibracija deformacije ostataka  $\beta$ -manuronske kiseline), i  $814\text{ cm}^{-1}$  (C1–H vibracija deformacije ostataka  $\alpha$ -guluronske kiseline). Navedeni rezultati su u skladu sa rezultatima iz literature za alginat [252-255].

S druge strane, spektar Ag/alginatnog nanokompozitnog filma pokazuje nekoliko razlika u pozicijama pojave maksimuma apsorpcije u odnosu na spektar alginata, što ukazuje na mogućnost vezivanja između molekula alginata i nanočestica srebra. Najvažnije razlike su primećene u dva opsega spektra, između  $1370 - 1205\text{ cm}^{-1}$  i između  $1160 - 1015\text{ cm}^{-1}$ . Apsorpcione trake alginata koje se javljaju u prvom navedenom opsegu, na  $1367\text{ cm}^{-1}$  i  $1296\text{ cm}^{-1}$  u spektru Ag/alginatnog nanokompozitnog filma su pomerene ka  $1358\text{ cm}^{-1}$  i  $1298\text{ cm}^{-1}$ , redom. Ovo ukazuje na interakciju nanočestica srebra sa OH grupama ostataka uronskih kiselina, što je primećeno kao pomeraj vibracije savijanja C–OH grupe. U drugom navedenom opsegu spektra, frekvencija vibracije alginata zabeležena na  $1082\text{ cm}^{-1}$  u spektru Ag/alginatnog nanokompozitnog filma je pomerena na  $1078\text{ cm}^{-1}$  kao rezultat koordinacionog vezivanja OH i etarske grupe sa Ag nanočesticama, slabeći intenzitet C–O veze u ove dve funkcionalne grupe. Šta više, frekvencija C–O grupe se malo pomerila sa  $1024\text{ cm}^{-1}$  zabeleženih za alginat na  $1026\text{ cm}^{-1}$  u spektru Ag/alginatnog nanokompozitnog filma, ukazujući na interakciju C(5) atoma kiseonika iz prstena ostataka guluronske i manuronske kiseline sa Ag nanočesticama. U celini, poređenje pozicija maksimuma apsorpcije u spektrima alginata i Ag/alginatnog nanokompozitnog filma ukazuje na vezivanje hidroksilnih i etarskih grupa, kao i atoma kiseonika iz ostataka uronskih kiselina molekula alginata, koordinacionim vezama sa nanočesticama srebra.

Nalazi dobijeni FT-IR spektroskopijom su u saglasnosti sa rezultatima ciklične voltametrije i ukazuju na vezivanje molekula alginata sa Ag nanočesticama, što ukazuje na dobar izbor alginata za elektrohemijsku sintezu nanočestica srebra. Naime, proces sinteze nanočestica metala predstavlja kompeticiju između dva procesa na površini katode, tj. formiranja nanočestica,

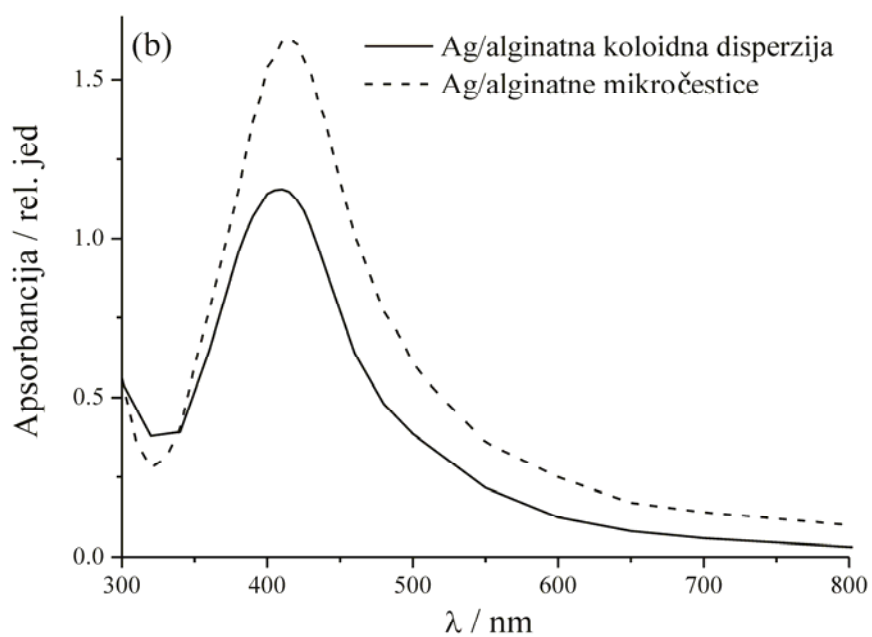
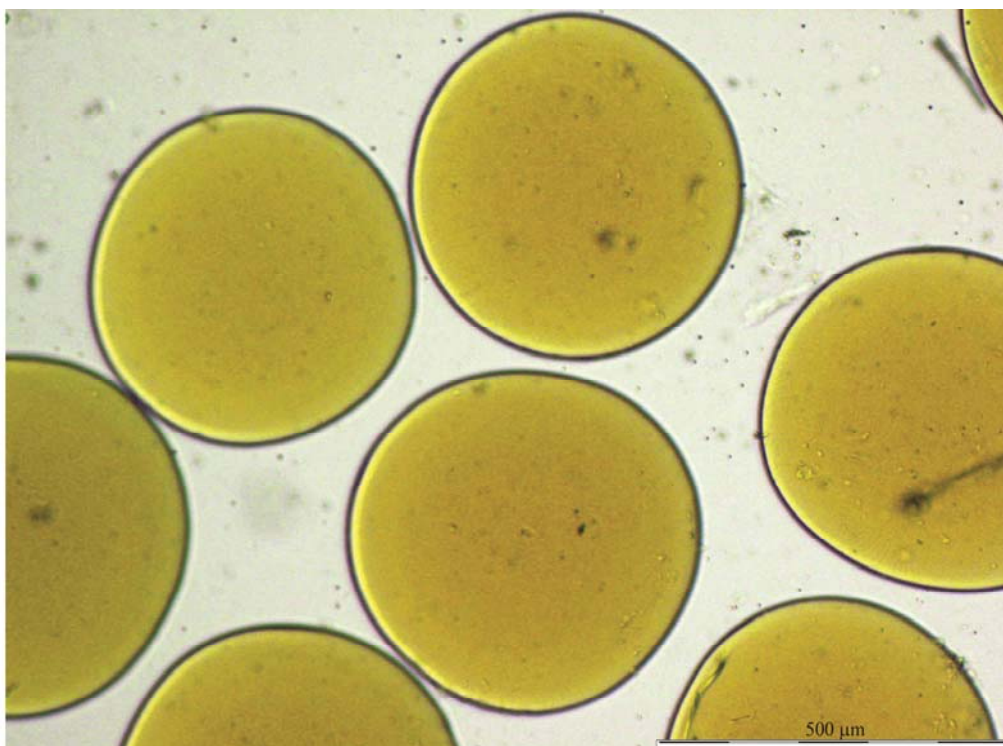


redukcijom na katodi i stabilizacijom metala pomoću agensa stabilizacije, i taloženja metalnog filma na površini katode [29]. Taloženje metala na katodi limitira prinos sinteze nanočestica, jer kada je površina elektrode potpuno prekrivena metalnim talogom, depozicija metalne prevlake na elektrodi je jedini proces koji se na dalje dešava. Stoga je neophodno limitirati proces taloženja metala. Prema tome, uloga agensa stabilizacije je da ubrza formiranje nanočestica srebra, i smanji taloženje metala na katodi [28]. Na dalje, efikasnost agensa stabilizacije je u neposrednoj vezi sa njegovim potencijalom da se veže sa površinom nanočestica metala. Na osnovu navednog, nanočestice srebra su elektrohemijski do sada uspešno sintetisane u rastvorima PVP, PANI, PAMAM, PVA [28, 256-259], i prvi put alginata.

## ***5.2. Ag/ALGINATNI NANOKOMPOZITNI HIDROGEL U OBLIKU MIKROČESTICA DOBIJEN ELEKTROSTATIČKOM EKSTRUZIJOM***

Ag/alginatna koloidna disperzija je sintetisana u cilju dobijanja alginatnih hidrogelova sa inkorporisanim nanočesticama srebra. Sferni oblik mikročestica je odabran kao posebno zanimljiv za imobilizaciju i kontrolisano otpuštanje aktivnih supstanci, među kojima su i nanočestice [260].

Elektrostatičkom ekstruzijom Ag/alginatne koloidne disperzije su dobijeni alginatni hidrogelovi inkorporisani nanočesticama srebra u obliku sfernih mikročestica uniformnih dimenzija (slika 5.17 a).



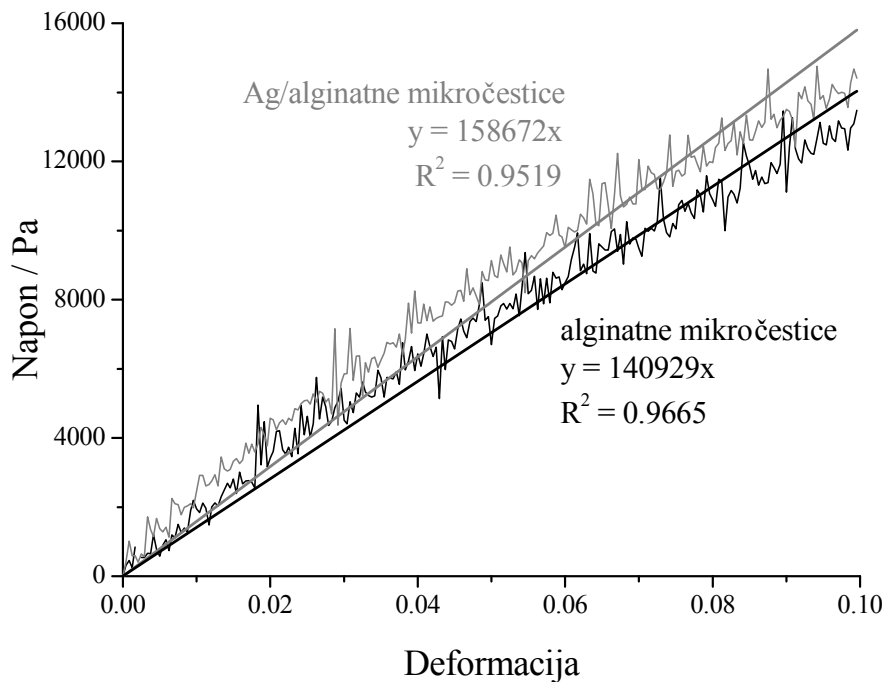
Slika 5.17. a) Mikrofotografija Ag/alginatnog nanokompozitnog hidrogela u obliku mikročestica dobijenih elektrostatičkom ekstruzijom; b) Apsorpcioni spektri Ag/alginatne koloidne disperzije ( $c = 3,9 \text{ mM}$ ,  $j = 50 \text{ mA cm}^{-2}$ ,  $t = 10 \text{ min}$ ), i rastvorenih Ag/alginatnih mikročestica.

Na primenjenim eksperimentalnim uslovima (rastojanje između vrha igle i rastvora  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  2,5 cm; napon između vrha igle i rastvora  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  6-7 kV; protok  $25,2 \text{ ml h}^{-1}$ ), prečnik dobijenih mikročestica je bio  $487,75 \pm 16,5 \text{ }\mu\text{m}$ . Prisustvo Ag nanočestica je potvrđeno UV-vidljivom spektroskopijom rastvorenih mikročestica (slika 5.17 b). Sa slike 5.17 b se može primetiti da se talasna dužina maksimuma apsorpcije zadržala na 405 nm potvrđujući da nije došlo do aglomeracije nanočestica srebra prilikom dobijanja mikročestica. Takođe, nešto veći intenzitet maksimuma apsorpcije je primećen za rastvorene Ag/alginate mikročestice, u poređenju sa Ag/alginate koloidnom disperzijom, usled dalje redukcije  $\text{Ag}^+$  jona tokom elektrostatičke ekstruzije. Stoga, može se zaključiti da praktično sve Ag nanočestice iz Ag/alginate koloidne disperzije ostaju očuvane i nakon inkorporisanja u mikročestice.

### **5.2.1. ISPITIVANJE MEHANIČKIH SVOJSTAVA ALGINATNIH I Ag/ALGINATNIH MIKROČESTICA U BIOREAKTORSKIM USLOVIMA**

Na slici 5.18 su prikazane zavisnosti napona od deformacije za pakovani sloj alginatnih i Ag/alginate mikročestica, dobijenih pod dinamičkim uslovima. Brzina pomeranja motora (kompresije) je iznosila  $337,5 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$ . Veličina alginatnih mikročestica iznosila je  $602 \pm 323 \text{ }\mu\text{m}$ , dok je veličina Ag/alginate mikročestica bila  $555 \pm 22 \text{ }\mu\text{m}$ . Testovi urađeni u dinamičkim uslovima (slika 5.18) pokazuju vrlo mali šum tokom merenja, što ukazuje na uniformnost strukture pakovanih slojeva.

Vrednosti modula elastičnosti pakovanog sloja alginatnih i Ag/alginate mikročestica pri dinamičkoj kompresiji su dobijene kao vrednosti nagiba pravih dobijenih metodom najmanjih kvadrata odstupanja od eksperimentalnih krivih (Tabela 5.3).



*Slika 5.18. Eksperimentalne zavisnosti napona od primenjene deformacije u dinamičkim uslovima u bioreaktoru za pakovane slojeve alginatnih i Ag/alginatnih mikročestica i linearne zavisnosti određene metodom najmanjih kvadrata (eksperimentalne tačke su srednje vrednosti tri merenja).*

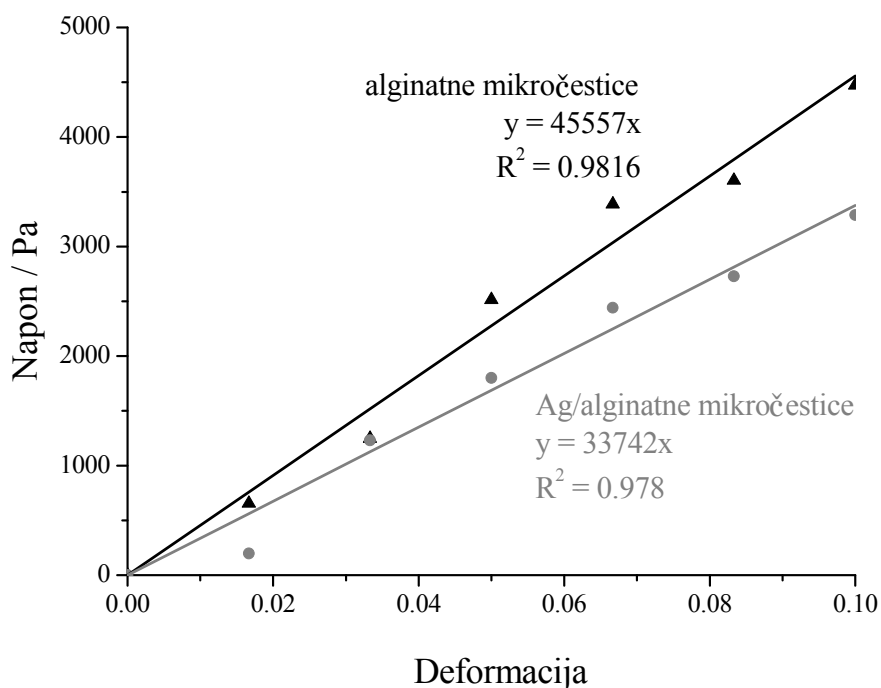
*Tabela 5.3. Vrednosti dinamičkog modula elastičnosti pakovanog sloja alginatnih i Ag/alginatnih mikročestica pri dinamičkoj kompresiji do deformacije od 10 %, pri brzini od  $337,5 \mu\text{m s}^{-1}$*

Uzorak	$E_{din}$ / kPa
Alginatne mikročestice	$141,0 \pm 1,71$
Ag/alginatne mikročestice	$158,7 \pm 4,94$

Modul elastičnosti pakovanog sloja Ag/alginatnih mikročestica ima za oko 12 % veću vrednost od modula elastičnosti pakovanog sloja alginatnih

mikročestica, što sugeriše da se modifikacija materijala nanočesticama srebra ispoljava blagim poboljšanjem mehaničkih svojstava hidrogela, u dinamičkim uslovima.

Na slici 5.19 prikazana je zavisnost napona od deformacije u ravnotežnim uslovima, za vreme relaksacije od 30 min. Vrednosti ravnotežnog modula elastičnosti za alginatne i Ag/alginatne mikročestice dobijene su kao vrednosti nagiba pravih, koje su određene metodom najmanjih kvadrata odstupanja od eksperimentalnih tačaka (Tabela 5.4).



*Slika 5.19. Eksperimentalne vrednosti zavisnosti napona od primenjene deformacije u ravnotežnim uslovima u bioreктору za pakovane slojeve alginatnih i Ag/alginatnih mikročestica i linearne zavisnosti određene metodom najmanjih kvadrata.*

Vrednost ravnotežnog modula elastičnosti pakovanog sloja Ag/alginatnih mikročestica je za oko 23 % manja od vrednosti određene za pakovani sloj

alginatnih mikročestica, što ukazuje da se modifikacija materijala nanočesticama srebra u ovom slučaju loše odražava na mehaničke karakteristike hidrogela, nakon relaksacije od 30 min.

*Tabela 5.4. Vrednosti ravnotežnog modula elastičnosti pakovanog sloja alginatnih i Ag/alginatnih mikročestica*

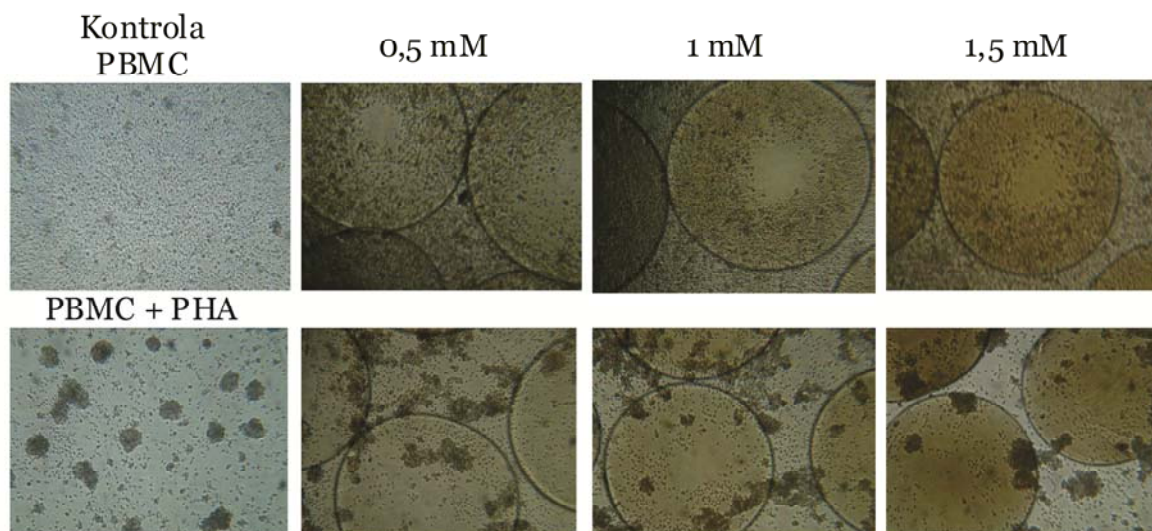
Uzorak	<i>E</i> / kPa
Alginatne mikročestice	45,5
Ag/alginatne mikročestice	33,7

Navedeni rezultati ukazuju da nanočestice srebra verovatno utiču na veće zadržavanje vode unutar mikročestica i pakovanog sloja u dinamičkim uslovima, što dovodi do blagog povećanja modula elastičnosti. Sa druge strane, nanočestice srebra blago narušavaju strukturu hidrogela. Naime, prisustvo nanočestica srebra u koloidnoj disperziji Ag/alginata onemogućava umrežavanje molekula alginata na svim mogućim mestima vezivanja usled koordinativnog vezivanja sa nanočesticama srebra, kao i usled sternih smetnji koje same nanočestice izazivaju. Ipak, smanjenje vrednosti ravnotežnog modula elastičnosti od ~20 % ne umanjuje mogućnost primene Ag/alginatnih mikročestica u tkivnom inženjerstvu.

### **5.2.2. ISPITIVANJE ZAVISNOSTI CITOTOKSIČNOSTI Ag/ALGINATNIH NANOKOMPOZITNIH HIDROGELOVA U OBLIKU MIKROČESTICA OD KONCENTRACIJE INKORPORISANOG SREBRA**

Na slici 5.20 prikazane su mikrofotografije uzoraka ispitivanja citotoksičnog dejstva Ag/alginatnih nanokompozitnih hidrogelova dobijenih iz rastvora različite početne koncentracije (0,5 mM; 1 mM; 1,5 mM) u obliku mikročestica na mononuklearne ćelije periferne krvi (PBMC), bez stimulacije na

proliferaciju i u prisustvu mitogena fitohemaglutinina (PHA), agensa stimulacije na proliferaciju.



*Slika 5.20. Mikrofotografije uzoraka ispitivanja citotoksičnog dejstva Ag/alginatnih nanokompozitnih hidrogelova u obliku mikročestica na PBMC, bez i sa stimulacijom na proliferaciju.*

U Tabeli 5.5 predstavljeno je preživljavanje,  $S$ , PBMC, nestimulisanih, kao i stimulisanih na proliferaciju dodatkom mitogena PHA, koje su rasle u prisustvu Ag/alginatnih nanokompozitnih hidrogelova u obliku mikročestica, dobijenih iz Ag/alginatnih koloidnih disperzija sintetisanih iz polaznih rastvora sa koncentracijama  $\text{AgNO}_3$  od  $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $1,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ , u odnosu na kontrolne uzorke. Preživljavanje,  $S$ , je izračunato prema jednačini (2.1), prikazanoj u odeljku 4.3.2.3.

Iz Tabele 5.5 se uočava da prisustvo Ag/alginatnih nanokompozitnih hidrogelova u obliku mikročestica dobijenih iz polaznog rastvora sa koncentracijom  $\text{AgNO}_3$  od  $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$  dovodi do blagog smanjenja broja PBMC koje preživljavaju, i to nestimulisanih PBMC na oko 75 %, a mitogenom stimulisanih PBMC na oko 64 %, u odnosu na kontrolni uzorak.

*Tabela 5.5. Preživljavanje, S, PBMC, nestimuliranih, kao i stimuliranih na proliferaciju dodatkom mitogena PHA, koje su rasle u prisustvu Ag/alginatnih nanokompozitnih hidrogelova u obliku mikročestica, dobijenih iz Ag/alginatnih koloidnih disperzija sintetisanih iz polaznih rastvora sa koncentracijama AgNO<sub>3</sub> od 0,5 mmol dm<sup>-3</sup>, 1 mmol dm<sup>-3</sup> i 1,5 mmol dm<sup>-3</sup>, u odnosu na kontrolne uzorke*

Koncentracija AgNO <sub>3</sub> u polaznom rastvoru za dobijanje Ag/alginatnih koloidnih disperzija / mmol dm <sup>-3</sup>	S / %	
	PBMC	PBMC + PHA
0,5	74,95 ± 5,36	63,73 ± 7,80
1	59,04 ± 35,45	57,01 ± 24,63
1,5	51,69 ± 21,71	50,09 ± 26,33

Takođe, prisustvo Ag/alginatnih nanokompozitnih hidrogelova u obliku mikročestica dobijenih iz polaznog rastvora sa koncentracijom AgNO<sub>3</sub> od 1 mmol dm<sup>-3</sup> blago umanjuje preživljavanje ciljnih PBMC na oko 60 %, dok je preživljavanje PBMC stimuliranih pomoću PHA smanjeno na oko 57 %, u odnosu na kontrolni uzorak. Povećanje koncentracije AgNO<sub>3</sub> u polaznom rastvoru na 1,5 mmol dm<sup>-3</sup> izraženo umanjuje preživljavanje ciljnih PBMC, i to nestimuliranih na oko 52 %, a stimuliranih na proliferaciju na oko 50 %, u odnosu na kontrolni uzorak. Primećuje se da su vrednosti standardne devijacije u druga dva eksperimenta velike, što je posledica prisustva nejednakog broja mikročestica u pojedinim sudićima plejta, koji je, usled veće koncentracije srebra, uticao na proliferaciju i broj ćelija koje preživljavaju u odgovarajućim sudićima.

Prisustvo Ag/alginatnih nanokompozitnih hidrogelova u obliku sfernih mikročestica koje sadrže veće koncentracije srebra, dovodi do izraženijeg umanjenja preživljavanja ciljnih zdravih imunokompetentnih PBMC, nestimuliranih i mitogenom stimuliranih na proliferaciju. Na osnovu skale citotoksičnosti (odeljak 4.3.2.3) smatra se da je upotreba Ag/alginatnih



nanokompozitnih hidrogelova u obliku mikročestica dobijenih iz polaznog rastvora sa koncentracijom  $\text{AgNO}_3$  od  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$ , koja blago umanjuje preživljavanje ciljnih PBMC na oko 60 % u odnosu na kontrolni uzorak, bezbedna sa stanovišta citotoksičnosti, za upotrebu u biomedicini.

### **5.3. Ag/PVP NANOKOMPOZITNI HIDROGEL DOBIJEN ELEKTROHEMIJSKOM SINTEZOM**

U poglavlju 5.1 naveden je mogući mehanizam zaštite nanočestica srebra pomoću PVP tokom njihovog elektrohemijskog dobijanja. Naveden je značaj koordinativnog vezivanja između jona srebra i PVP molekula, koji je posebno izražen u stupnju elektrohemijske redukcije. Povećanje elektronske gustine u sp orbitali jona srebra u  $\text{Ag}_m^{m+}$ -PVP kompleksu (usled koordinativnog vezivanja sa atomima azota i kiseonika iz pirolidonskog prstena PVP) u odnosu na hidratizane  $\text{Ag}^+$  jone, olakšava preuzimanje elektrona sa katode, pa se i joni iz  $\text{Ag}_m^{m+}$ -PVP kompleksa lakše redukuju nego pojedinačni hidratizani  $\text{Ag}^+$  joni. Elektrohemijaska sinteza nanočestica srebra u rastvoru PVP u prvom stupnju podrazumeva stvaranje  $\text{Ag}_m^{m+}$ -PVP kompleksa, a potom i redukciju jona srebra iz kompleksa u atome stabilisane molekulima PVP, kao katodnu reakciju.

Elektrohemijaska redukcija podrazumeva reakciju na samoj katodi. Formiranje  $\text{Ag}_m^{m+}$ -PVP kompleksa u hidrogelu je podjednako verovatno kao i u rastvoru PVP. Ipak, u slučaju hidrogela, mobilnost PVP lanaca je ograničena, tj. onemogućena njihovim umrežavanjem. Stoga, slično kao u slučaju elektrohemijske sinteze nanočestica srebra u rastvoru alginata, verovatniji mehanizam redukcije nanočestica srebra jeste pomoću vodonika izdvojenog redukcijom vode na katodi (jednačina 2.2).

#### **5.3.1. UV–VIDLJIVA SPEKTROSKOPIJA**

Prisustvo nanočestičnog srebra u Ag/PVP nanokompozitima je potvrđeno UV-vidljivom spektroskopijom. U cilju određivanja optimalnih vrednosti

parametara sinteze nanočestica srebra, utvrđene su zavisnosti maksimuma apsorpcije Ag/PVP nanokompozita u funkciji sastava rastvora, vremena implementacije, i primenjenog napona. Merenja apsorpcije su izvedena na talasnoj dužini koja odgovara njenoj maksimalnoj vrednosti.

Na slici 5.21 prikazani su apsorpcioni spektri Ag/PVP nanokompozita dobijenih pri konstantnom naponu od 150 V tokom 4 min, nakon bubrenja PVP hidrogelova u rastvorima  $3,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3} \text{ AgNO}_3$  (slika 5.21 a) i  $3,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3} \text{ AgNO}_3$  sa  $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$  (slika 5.21 b).

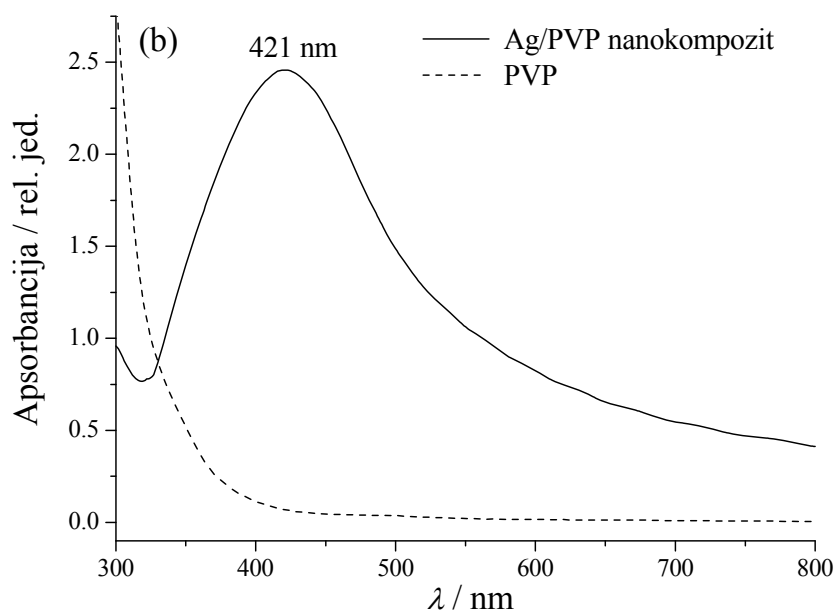
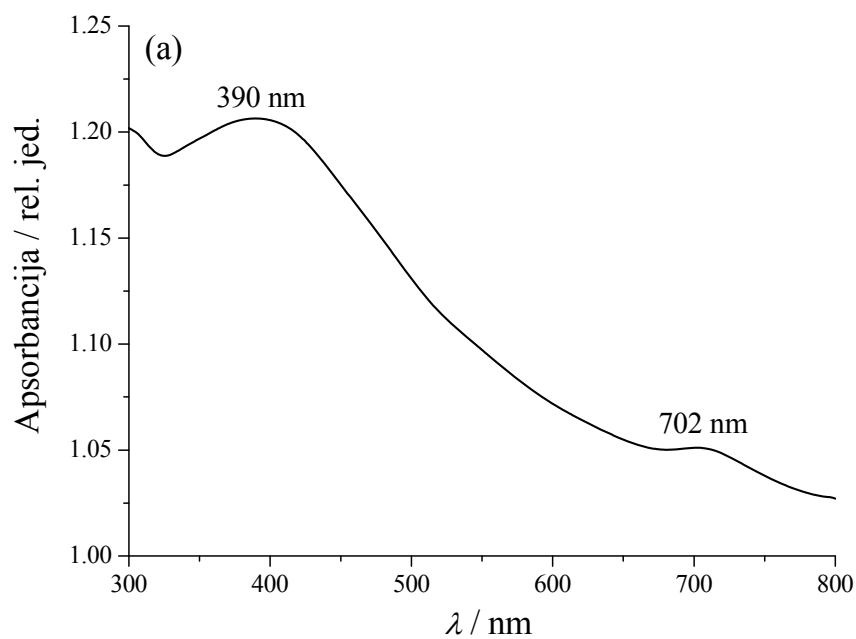
Prisustvo nanočestičnog srebra potvrđuje pojava maksimuma apsorpcionih spektara na talasnim dužinama od oko 400 nm [47], nezavisno od sastava rastvora za bubrenje. Ipak, intenzitet apsorpcije Ag/PVP nanokompozita dobijenog sintezom nakon bubrenja PVP hidrogela u rastvoru  $3,9 \text{ mM AgNO}_3$  (slika 5.21 a) je značajno niža od intenziteta apsorpcije Ag/PVP nanokompozita dobijenog sintezom nakon bubrenja PVP hidrogela u rastvoru  $3,9 \text{ mM AgNO}_3$  sa  $0,1 \text{ M KNO}_3$  (slika 5.21 b).

Takođe, pojava novog maksimuma apsorpcije na oko 702 nm u apsorpcionom spektru Ag/PVP nanokompozita dobijenog sintezom nakon bubrenja u rastvoru  $3,9 \text{ mM AgNO}_3$  (slika 5.21 a) govori o prisustvu aglomerata srebra [47]. Oblik apsorpcionog spektra sa dva maksimuma apsorpcije potvrđuje prisustvo agregata štapićastog oblika, s obzirom da postoje dve ose po kojima je moguće oscilovanje za čestice ne-sfernog oblika, transverzalna i longitudinalna [51, 261] ili uparivanje plazmona između aglomerata. Longitudinalne oscilacije su veoma osetljive na odnos između veličina prečnika [51, 261]. Sistemi sa ne-sfernom geometrijom nanočestica se dobijaju uglavnom hemijskim metodama, i to povećanjem odnosa koncentracija  $\text{Ag}^+/\text{PVP}$ , čime se rast kristala usmerava duž izabrane kristalografske ose, i to one koja nije stabilisana polimerom [262]. Takođe, pokazano je da se štapićaste forme nanočestica srebra mogu dobiti radijaciono-hemijskom sintezom Ag/PVP koloidne disperzije, korišćenjem polimera kraćeg lanca i niže koncentracije [226]. U slučaju elektrohemijske sinteze može se pretpostaviti da se smanjenjem provodljivosti mogu dobiti

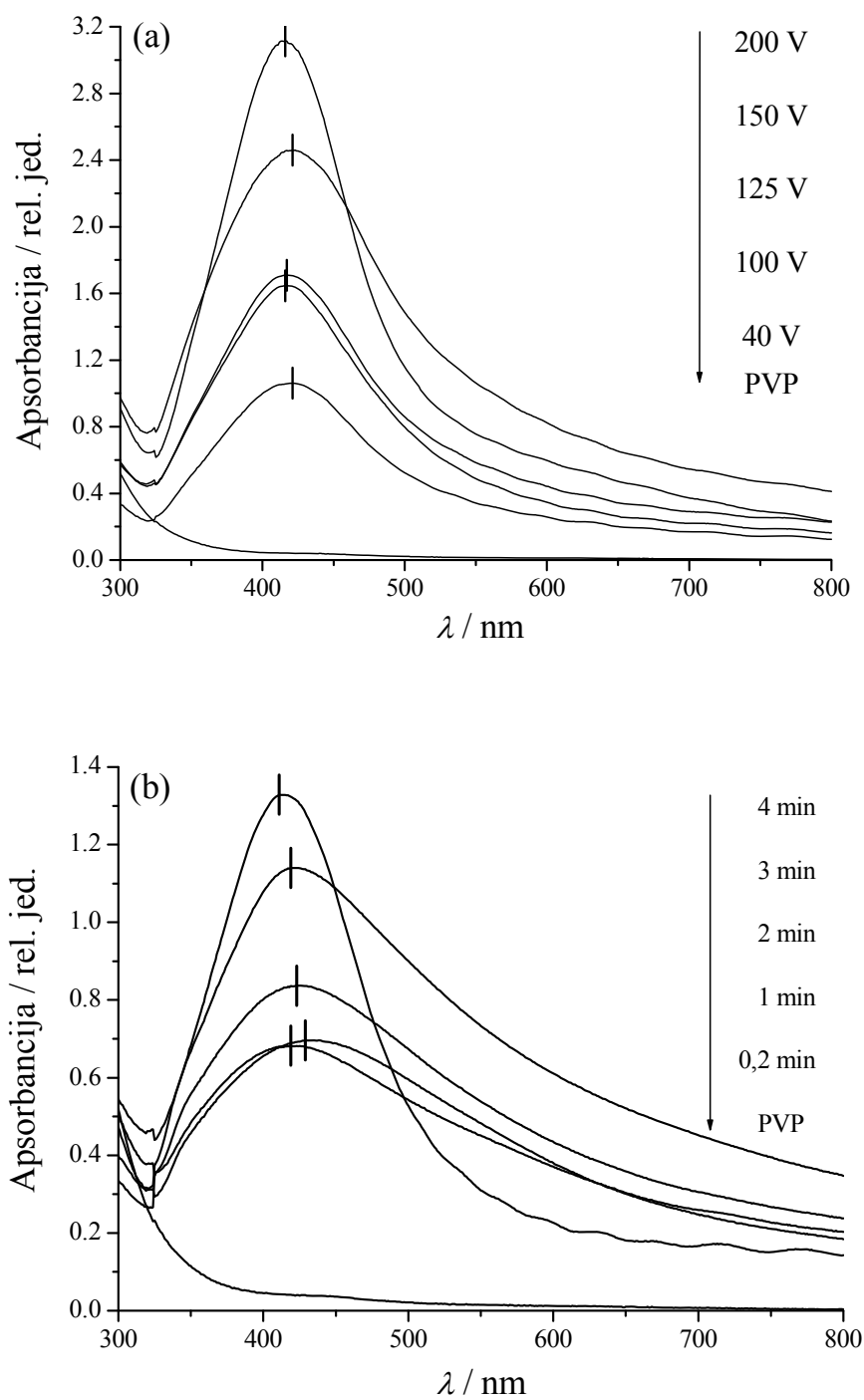
štapićaste formacije, ali kako to nije bio cilj ovog rada, nisu vršena dalja ispitivanja.

Sve navedeno ukazuje da se korišćenjem rastvora veće provodljivosti (3,9 mM AgNO<sub>3</sub> sa 0,1 M KNO<sub>3</sub>) za sintezu Ag/PVP nanokompozita obezbeđuju bolji uslovi za dobijanje veće koncentracije Ag nanočestica sfernog oblika, i izbegava njihova aglomeracija. Stoga je za dalja ispitivanja kao rastvor za bubrenje PVP hidrogelova korišćen rastvor 3,9 mM AgNO<sub>3</sub> sa 0,1 M KNO<sub>3</sub>.

Na slikama 5.22 a i 5.22 b prikazani su apsorpcioni spektri Ag/PVP nanokompozita dobijenih variranjem vrednosti primenjenog napona od 40 – 200 V pri vremenu implementacije od 4 min, i variranjem vrednosti vremena implementacije od 0,2 – 4 min pri naponu od 30 V. Svi navedeni apsorpcioni spektri pokazuju maksimum na talasnoj dužini od 417 ± 4 nm, što potvrđuje formiranje nanočestica srebra (slika 5.22). Sa slike se takođe može videti da intenzitet apsorpcije, koji je proporcionalan koncentraciji nanočestica srebra, raste sa povećanjem vrednosti primenjenog napona i vremena implementacije, do vrednosti od 200 V i 4 min, redom (slike 5.22 a i 5.22 b).



Slika 5.21. Apsorpcioni spektri Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova dobijenih pri konstantnom naponu od 150 V tokom 4 min, nakon bubrenja PVP hidrogelova u rastvorima a)  $3,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3} \text{ AgNO}_3$  i b)  $3,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3} \text{ AgNO}_3$  sa  $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$ .



*Slika 5.22. Apsorpcioni spektri hidrogelova PVP i Ag/PVP nanokompozita dobijenih na: a) različitim vrednostima primenjenog napona tokom 4 min, i b) različitim vrednostima vremena implementacije na 30 V.*

U cilju određivanja optimalnih uslova sinteze nanočestica srebra unutar PVP hidrogela, vrednosti talasne dužine maksimuma apsorpcije,  $\lambda_{maks}$ , i širina pika na poluvisini maksimuma apsorpcije,  $\beta$ , za apsorpcione spektre hidrogelova Ag/PVP nanokompozita dobijenih pri različitim eksperimentalnim uslovima su prikazani u Tabeli 5.6.

*Tabela 5.6. Parametri apsorpcionih spektara: talasna dužina maksimuma apsorpcije,  $\lambda_{maks}$ , i širina pika na poluvisini maksimuma apsorpcije,  $\beta$ , za apsorpcione spektre hidrogelova Ag/PVP nanokompozita dobijenih pri različitim eksperimentalnim uslovima*

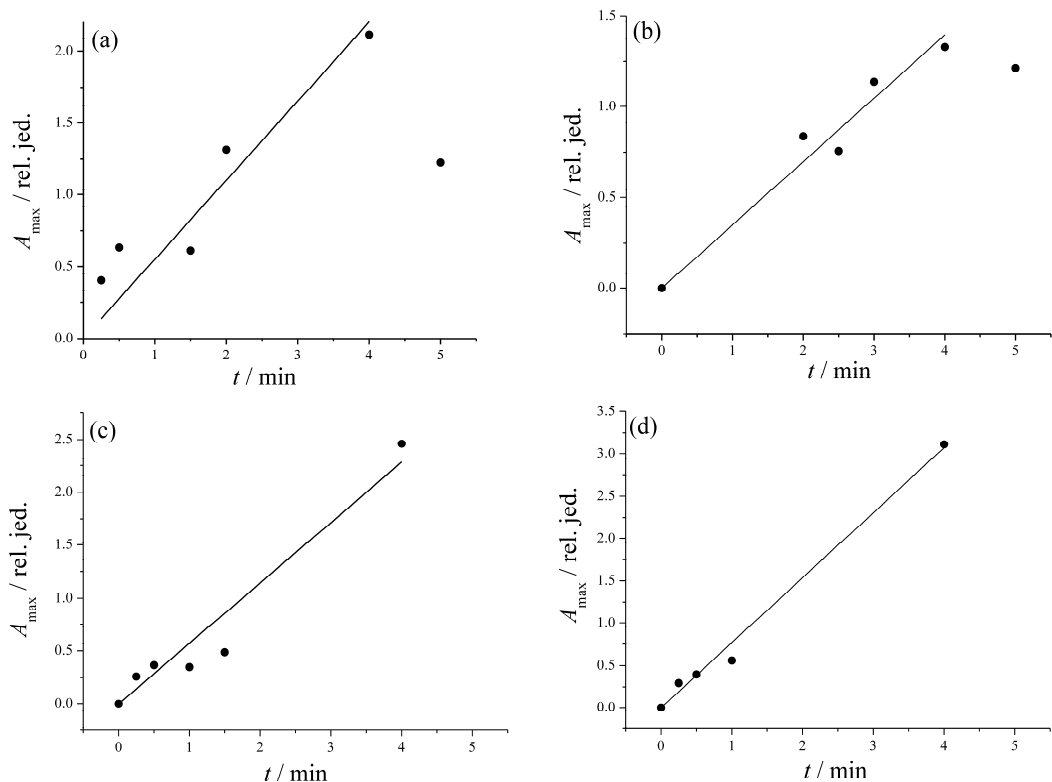
<i>t = 4 min</i>		
<i>U / V</i>	<i><math>\lambda_{maks}</math> / nm</i>	<i><math>\beta</math> / nm</i>
40	421	147
75	410	182
100	416	148
125	417	151
150	421	183
200	416	120

Imajući u vidu da niže vrednosti talasne dužine maksimuma apsorpcije i širine pika na poluvisini maksimuma apsorpcije odgovaraju manjim nanočesticama srebra [263], primenjeni napon od 200 V i vreme implementacije od 4 min su odabrani kao optimalni uslovi za intezu nanočestica srebra. Najveća vrednost apsorpcije, koja odgovara najvećoj koncentraciji nanočestica srebra inkorporisanih u PVP hidrogel, je primećena u slučaju Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela dobijenog pri ovim uslovima, pa su sva dalja ispitivanja vršena na uzorcima navedenog nanokompozitnog hidrogela. Veće vrednosti primenjenog napona i produžena vremena implementacije nisu doveli do povećanja koncentracije nanočestica srebra, verovatno usled pregrevanja elektrohemijske ćelije (podaci nisu prikazani).

Treba reći da prisustvo nanočestičnog srebra unutar PVP hidrogela nije evidentno tokom i neposredno nakon sinteze; potpuno žuto obojenje Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela se javilo 24 h nakon sinteze. Ovo ukazuje na postepen proces formiranja nanočestica srebra. Naime, prvi stupanj formiranja nanočestica srebra bi bila redukcija  $\text{Ag}^+$  jona u Ag atome, što se odvija kao katodna reakcija. Tako formirani Ag atomi postaju semena ili jezgra za dalji rast i formiranje nanočestica srebra, koje daju žutu boju Ag/PVP nanokompozitnim hidrogelovima. U literaturi je prikazano da formiranje nanočestica srebra, koje podrazumeva nukleaciju i rast, predstavlja rezultat klasične nukleacije i rasta, agregativne nukleacije i rasta, i procesa Osvaldovog (Ostwald) zrenja, koji se mogu odvijati ili konsektivno ili paralelno [239]. Smatra se da nanočestice dobijene iz molekularnih (atomskih) prekursora nastaju klasičnom nukleacijom i rastom, dok nanočestice koje potiču iz manjih nanokristala rastu procesom Osvaldovog zrenja. Takođe, ima navoda da agregativni rast doprinosi u oba navedena procesa rasta [239].

Rezultati ispitivanja uticaja vremena implementacije na koncentraciju dobijenih nanočestica srebra prikazani su na slici 5.23, kao zavisnosti maksimuma apsorbanije,  $A_{\text{max}}$ , Ag/PVP nanokompozita dobijenih sintezom nakon bubrenja u rastvoru 3,9 mM  $\text{AgNO}_3$  sa 0,1 M  $\text{KNO}_3$  pri različitim vrednostima primenjenog napona, od vremena implementacije.

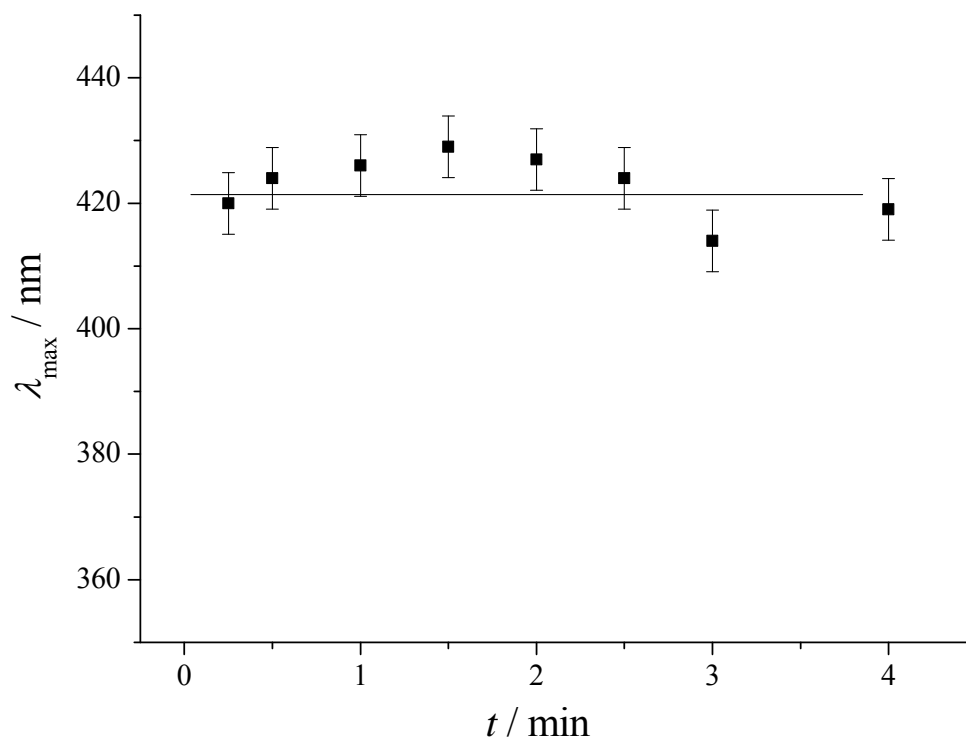
Sa slike 5.23 uočava se linearna zavisnost maksimuma apsorbanije Ag/PVP nanokompozita od vremena implementacije. Produženje vremena implementacije do 4 min je, kao što je i bilo očekivano, dovelo do porasta maksimuma apsorbanije, usled povećanja koncentracije dobijenih nanočestica srebra, budući da je apsorbanija Ag/PVP nanokompozita proporcionalna koncentraciji prisutnih nanočestica srebra [109, 237]. Dalje povećanje vremena implementacije, međutim, dovodi do smanjenja koncentracije dobijenih nanočestica srebra, samim tim i do smanjenja maksimuma apsorbanije (slike 5.23 a i 5.23 b). Stoga je vreme implementacije od 4 min izabrano kao optimalno za sintezu nanočestica srebra u PVP hidrogelu, odnosno dobijanje Ag/PVP nanokompozita.



*Slika 5.23. Zavisnosti maksimuma apsorbancije,  $A_{\max}$ , Ag/PVP nanokompozita, dobijenih sintezom nakon bubrenja u rastvoru 3,9 mM  $\text{AgNO}_3$  sa 0,1 M  $\text{KNO}_3$  pri konstantnoj vrednosti napona od: a) 15 V, b) 30 V, c) 150 V, i d) 200 V, od vremena implementacije.*

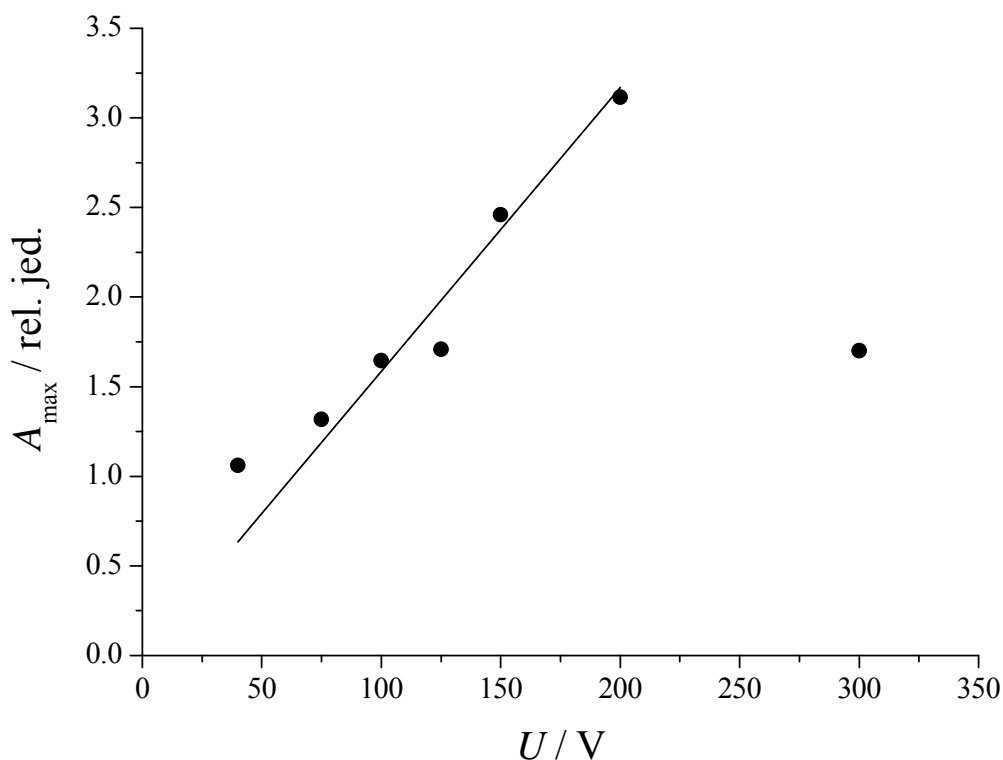
Takođe, maksimumi apsorbancije se i ovde uočavaju na talasnim dužinama od oko 400 nm, što ponovo potvrđuje prisustvo nanočestičnog srebra. S obzirom da su vrednosti talasnih dužina koje odgovaraju maksimumima apsorbancije bliske, može se zaključiti da nema značajne razlike u veličini nanočestica, što je prikazano na primeru Ag/PVP nanokompozita dobijenih pri naponu od 15 V i različitim vremenima implementacije (slika 5.24). Srednja vrednost talasne dužine maksimuma apsorbancije,  $\lambda_{\max}$ , Ag/PVP nanokompozita dobijenih pri konstantnoj vrednosti napona od 15 V, pri različitim vremenima implementacije je iznosila  $423 \pm 5$  nm.





*Slika 5.24. Talasna dužina maksimuma apsorbancije,  $\lambda_{\max}$ , Ag/PVP nanokompozita dobijenih sintezom nakon bubrenja u rastvoru 3,9 mM  $\text{AgNO}_3$  sa 0,1 M  $\text{KNO}_3$  pri konstantnoj vrednosti napona od 15 V, u funkciji vremena implementacije.*

Rezultati ispitivanja uticaja primenjenog napona na koncentraciju dobijenih nanočestica srebra prikazani su na slici 5.25, kao zavisnosti maksimuma apsorbancije Ag/PVP nanokompozita dobijenih sintezom nakon bubrenja u rastvoru 3,9 mM  $\text{AgNO}_3$  sa 0,1 M  $\text{KNO}_3$  tokom 4 min, od primenjenog napona.

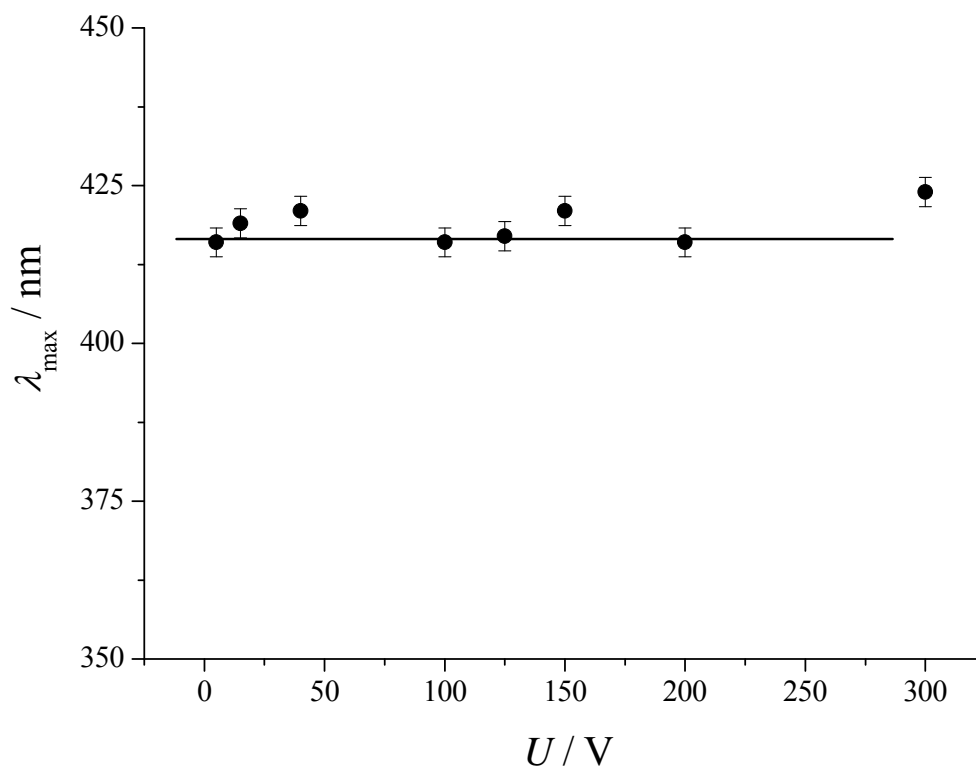


Slika 5.25. Zavisnosti maksimuma apsorbancije,  $A_{max}$ , Ag/PVP nanokompozita dobijenih sintezom nakon bubrenja u rastvoru 3,9 mM  $AgNO_3$  sa 0,1 M  $KNO_3$  tokom 4 min, od primenjenog napona.

Sa slike 5.25 se uočava linearna zavisnost maksimuma apsorbancije Ag/PVP nanokompozita, tj. koncentracije nanočestica srebra [109, 237], od vrednosti primenjenog napona. Za isto vreme implementacije od 4 min, povećanje primenjenog napona je dovelo do porasta koncentracije redukovano srebra, i to do vrednosti od 200 V. Dalje povećanje napona, međutim, dovelo je do smanjenja vrednosti maksimuma apsorbancije, tj. do smanjenja koncentracije dobijenih nanočestica srebra, stoga je napon od 200 V izabran kao optimalan za sintezu Ag/PVP nanokompozita.

Vrednosti talasnih dužina koje odgovaraju maksimumu apsorbancije su i u ovom slučaju bliske (slika 5.26), pa se može zaključiti da nema značajne

razlike u veličini nanočestica, što je prikazano na primeru Ag/PVP nanokompozita dobijenih tokom 4 min pri različitim vrednostima napona, na slici 5.26. Srednja vrednost talasne dužine maksimuma apsorpcije,  $\lambda_{\max}$ , Ag/PVP nanokompozita dobijenih tokom 4 min je iznosila  $418 \pm 2$  nm.



*Slika 5.26. Talasna dužina maksimuma apsorpcije,  $\lambda_{\max}$ , Ag/PVP nanokompozita dobijenih sintezom nakon bubrenja u rastvoru 3,9 mM  $\text{AgNO}_3$  sa 0,1 M  $\text{KNO}_3$  tokom 4 min, u funkciji primenjenog napona.*

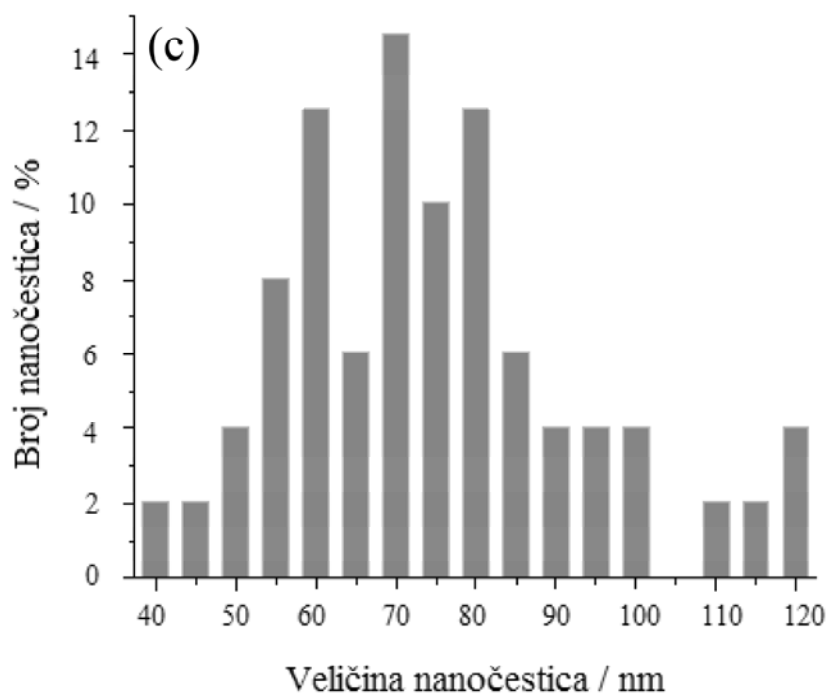
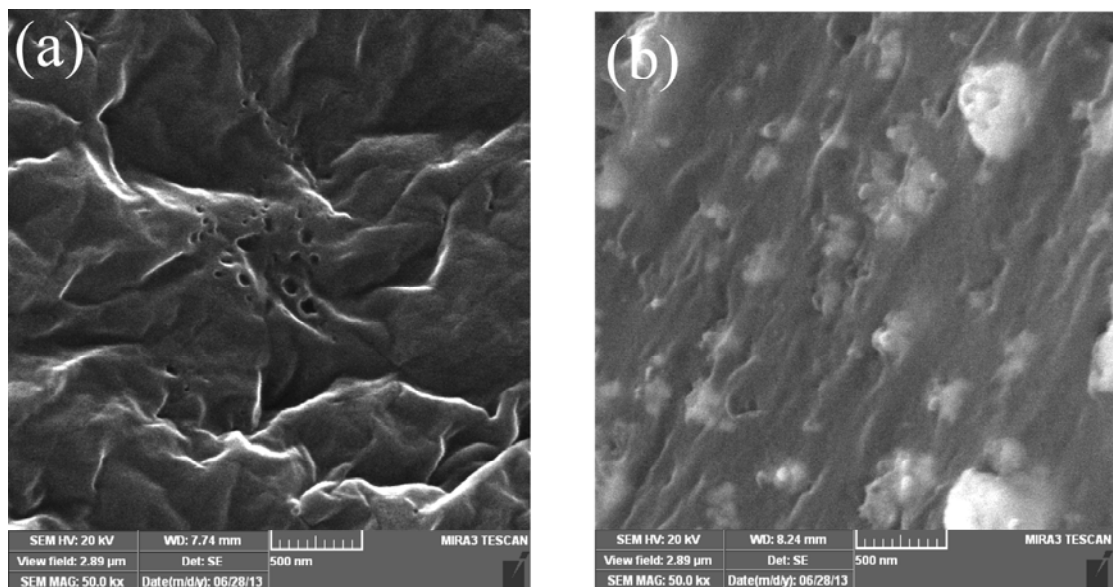
Na osnovu analize rezultata UV-vidljive spektroskopije može se zaključiti da su  $\text{AgNO}_3$  rastvor početne koncentracije 3,9 mM sa 0,1 M  $\text{KNO}_3$ , vreme implementacije od 4 min i napon od 200 V vrednosti parametara koje su se pokazale optimalnim za sintezu nanočestica srebra u PVP hidrogelu, odnosno dobijanje Ag/PVP nanokompozita.

Uzorci Ag/PVP nanokompozita dobijeni radijaciono-hemijskom sintezom nanočestica srebra u PVP hidrogelovima su pokazali apsorpcione spektre istog oblika, sa položajem maksimuma apsorpcije na oko 405 nm [227].

### **5.3.2. VISOKO-REZOLUCIONA SKENIRAJUĆA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA**

Kako bi se ispitala unutrašnja struktura, poprečni presezi PVP hidrogela i Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela (dobijenog na 200 V tokom 4 min) su snimljeni visokorezolucionom skenirajućom elektronskom mikroskopijom (FE-SEM). Veličina šupljina u mreži PVP hidrogela, kao i nanočestica srebra određene su pomoću kompjuterskog programa za analizu slike (Cell<sup>A</sup>, Olympus, Tokio, Japan). Na slici 5.27 prikazane su dobijene mikrofotografije: slika 5.27 a prikazuje mikrofotografiju mreže PVP hidrogela, slika 5.27 b PVP hidrogel sa inkorporisanim nanočesticama srebra, dok je na slici 5.27 c prikazan histogram raspodele veličina nanočestica srebra.

Primećeno je da se mreža PVP hidrogela sastoji od relativno uniformnih šupljina, veličine  $449 \pm 72$  nm (slika 5.27 a). Na slici 5.27 b ove šupljine nisu uočene. Duž poprečnog preseka Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela se vidi mnoštvo klastera malih nanočestica srebra. Izmerena veličina nanočestica srebra je iznosila  $75 \pm 19$  nm, dok je prosečna veličina klastera  $209 \pm 33$  nm. Poređenjem rezultata FE-SEM sa rezultatima UV-vidljive spektroskopije uočeno je da spektroskopija prepoznaje nanočestice, a ne klasterne, što navodi na zaključak da položaj maksimuma apsorpcije od 416 nm (Ag/PVP nanokompozit dobijen na 200 V tokom 4 min) odgovara veličini nanočestica od 75 nm. Navedeno je u skladu sa podacima pronađenim u literaturi, gde položaji maksimuma apsorpcije od 416 nm i 418 nm odgovaraju veličini nanočestica od 55 nm i 60 nm, redom [264, 265].



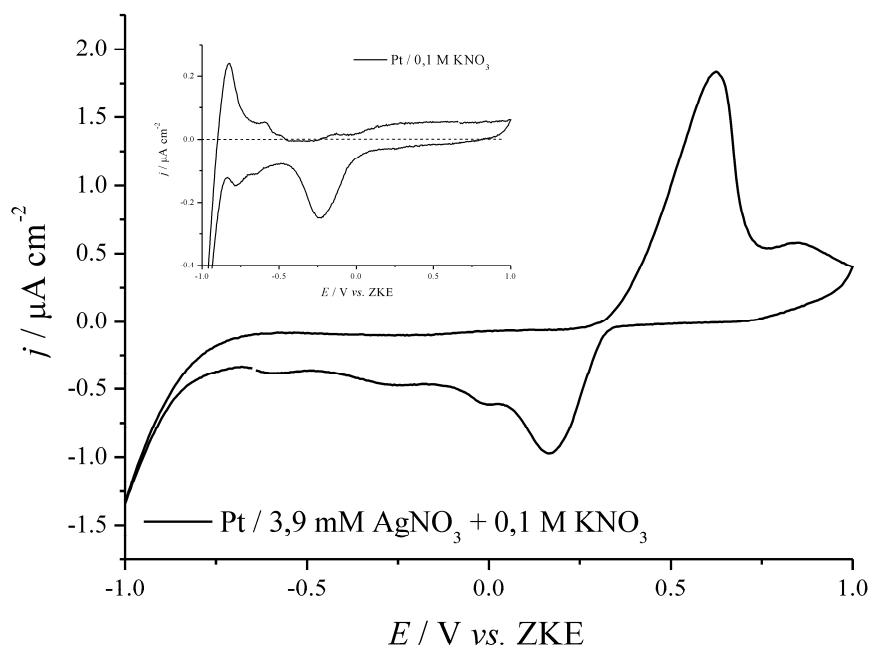
*Slika 5.27. FE-SEM mikrofotografije PVP hidrogela a) bez i b) sa inkorporisanim nanočesticama srebra, i c) histogram raspodele veličina nanočestica srebra.*

Slični rezultati su dobijeni transmisijom elektronskom mikroskopijom Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela dobijenog radijaciono-hemijskom sintezom [227]. Veličina sintetisanih nanočestica je bila u opsegu od 10 do 60 nm. Kako su uzorci za TEM pripremljeni mlevenjem kserogelova i njihovim naknadnim bubrenjem u vodi, može se pretpostaviti da je mlevenjem izazvana agregacija i/ili aglomeracija nanočestica. Stoga se na TEM mikrofotografijama vide nanočestice dimenzija većih od očekivanih, s obzirom da se položaj maksimuma apsorpcije na UV-vidljivom spektru ovih nanokompozita nalazi na talasnoj dužini od 405 nm.

### **5.3.3. CIKLIČNA VOLTAMETRIJA**

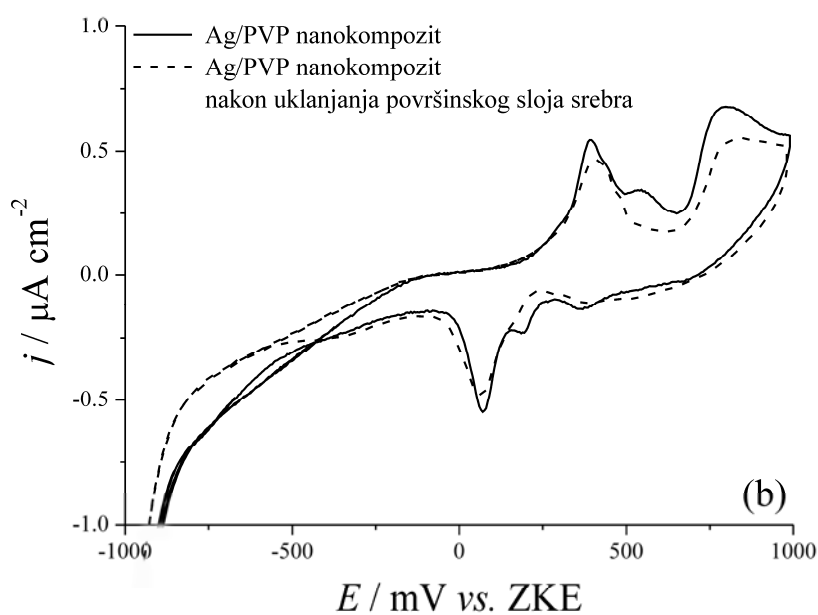
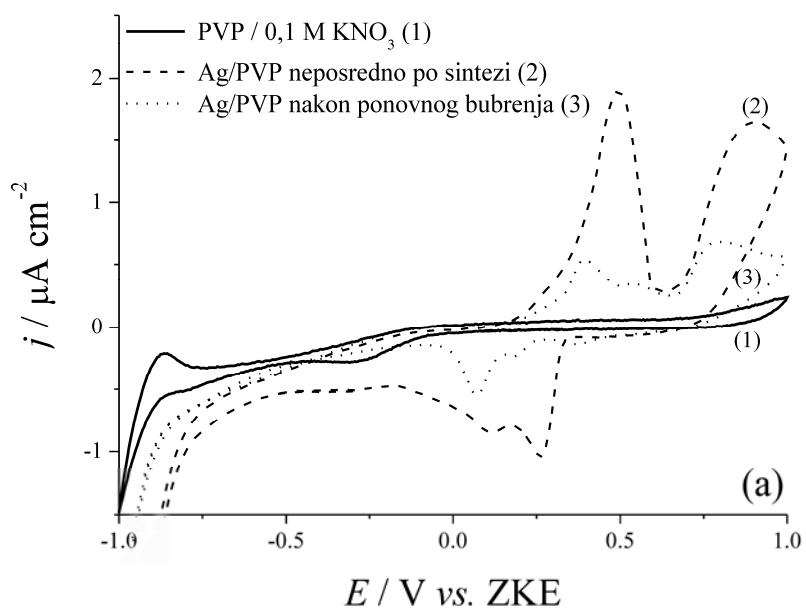
U cilju dobijanja dodatnih informacija o redukciji jona srebra u nanočestice srebra unutar PVP hidrogela, i procene eventualnih sporednih efekata sinteze, Ag/PVP nanokompozitni hidrogelovi su ispitani cikličnom voltametrijom. Radi poređenja, prvo su ispitani rastvori koji su sadržali  $3,9 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ AgNO}_3$ , 10 mas. % PVP i  $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$  (bilo da su sadržali jednu komponentu ili sve navedene), radi uvida u oksido-redukcijske procese koji se javljaju u vodenim rastvorima (slika 5.28). Na slici 5.28, u Insertu je radi preglednosti ponovo prikazan ciklični voltamogram Pt elektrode u rastvoru  $0,1 \text{ M KNO}_3$  (slika 5.11, Insert). Na ovom voltamogramu se uočava široki katodni strujni pik na  $-250 \text{ mV}$ , koji potiče od redukcije Pt oksida formiranog tokom snimanja u anodnom smeru. Anodni par ovog pika nije izražen, ali se uočava široko povećanje gustine struje u opsegu potencijala od  $0,0$  do  $1,0 \text{ V}$ .

Procesi redukcije i oksidacije u rastvoru koji je sadržao srebro (slika 5.28) su primećeni kao glavni katodni pik na oko  $160 \text{ mV}$ , koji odgovara taloženju srebra na platinskoj elektrodi, i anodni pik na oko  $600 \text{ mV}$  koji odgovara oksidaciji nataloženog srebra. Manji široki anodni pik na  $\sim 850 \text{ mV}$  se verovatno može pripisati daljoj oksidaciji srebra u  $\text{Ag}_2\text{O}$ .



*Slika 5.28. Ciklični voltamogrami Pt elektrode u rastvoru  $3,9 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ AgNO}_3 + 0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$ . Inset: Ciklični voltamogram Pt elektrode u rastvoru  $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$ .*

Ciklični voltamogrami Pt elektrode u PVP hidrogelu i Ag/PVP nanokompozitnom hidrogelu, dobijenom na 200 V tokom 4 min, su prikazani na slici 5.29.



Slika 5.29. a) Ciklični voltamogrami Pt elektrode u PVP hidrogelu (kriva 1), u Ag/PVP nanokompozitnom hidrogelu neposredno nakon sinteze (kriva 2), i u Ag/PVP nanokompozitnom hidrogelu nakon ponovnog bubrenja u rastvoru  $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$  (kriva 3); b) Ciklični voltamogrami Pt elektrode u Ag/PVP nanokompozitnom hidrogelu nakon ponovnog bubrenja u rastvoru  $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$  i Pt elektrode u istom Ag/PVP nanokompozitnom hidrogelu nakon uklanjanja površinskog sloja srebra.



Ispitivanja su vršena neposredno nakon sinteze, kao i nakon sušenja hidrogela i njegovog ponovnog nabubrenja u  $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$ , s obzirom da hidrogel po sintezi nije bio obojen, dok je isti, ponovo nabubren bio tamno žute boje (što je i očekivano, s obzirom na prisustvo nanočestica srebra). Naime, neposredno nakon sinteze Ag/PVP hidrogel je bezbojan (obojenje postaje uočljivo tek nakon 24 h, kao što je već rečeno u odeljku 5.3.1.), što navodi na pretpostavku da je veći deo srebra još uvek u obliku Ag atoma, i da proces rasta još uvek nije započeo. Značajno veći intenzitet gustine struje krive 2 (slika 5.29 a) čini se kao potvrda ove ideje, s obzirom da ukazuje na veću mobilnost komponenata sistema. Sa druge strane, ciklični voltamogram Pt elektrode u Ag/PVP nanokompozitnom hidrogelu nakon ponovnog nabubrenja u rastvoru  $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$  (kriva 3, slika 5.29 a) pokazuje niže vrednosti strujnih pikova, što ukazuje na manju pokretljivost usled prisustva nanočestica srebra. Navedeni rezultat potvrđuje inkorporisanje nanočestica srebra unutar mreže PVP hidrogela.

Na slici 5.29 a se vidi da Ag/PVP nanokompozitni hidrogel neposredno nakon sinteze (kriva 2) pokazuje anodni pik na oko 490 mV i jedan (širok i neuobičajenog oblika) na 900 mV. Kao njihovi parovi, javljaju se dva katodna pika na  $\sim 115 \text{ mV}$  i  $\sim 265 \text{ mV}$ . Ovaj ciklični voltamogram podseća na voltamogram Pt elektrode u rastvoru  $\text{AgNO}_3 + \text{KNO}_3$  koji nije sadržao agens stabilizacije (slika 5.28), što je u saglasnosti sa pretpostavkom da je neposredno nakon sinteze, veći deo srebra još uvek u obliku Ag atoma, i da proces rasta još uvek nije započeo.

U slučaju ponovo nabubrenog Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela (kriva 3), sve gustine struje su značajno manje, što, kao što je već rečeno ukazuje na inkorporisanje nanočestica srebra unutar mreže PVP hidrogela. Ovde se razlikuju tri anodna pika na oko 390 mV, 545 mV i 800 mV, koji mogu biti u vezi sa različitim oksidativnim procesima srebra. Odgovarajući katodni pikovi su primećeni na  $\sim 70 \text{ mV}$ ,  $\sim 185 \text{ mV}$  i  $\sim 370 \text{ mV}$ . S obzirom na pojavu trećeg para strujnih pikova, uzet je u obzir, i proveren, uticaj neželjenog efekta sinteze, koji se ogledao u taloženju srebra na površini hidrogela. Spoljni sloj hidrogela je

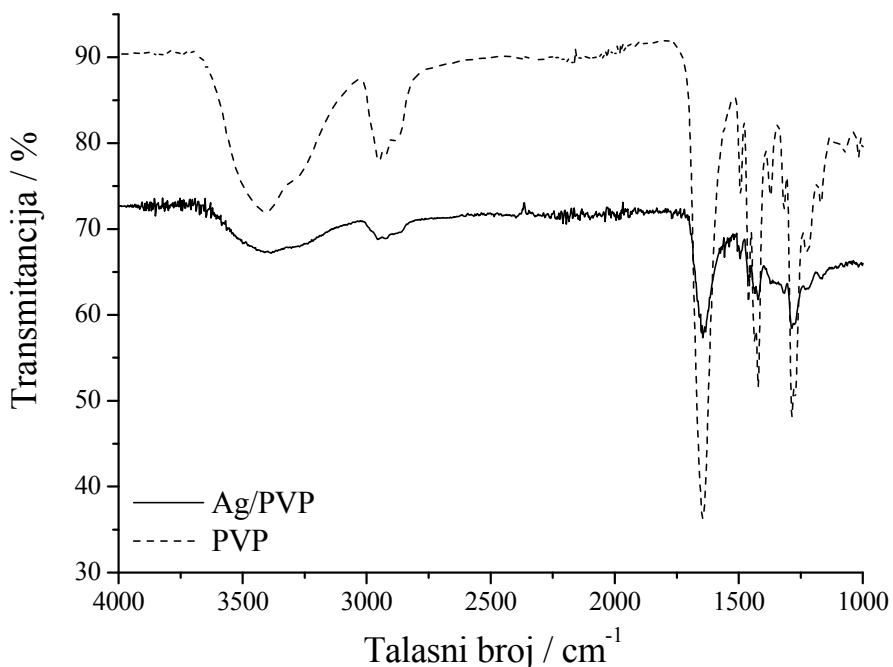
odstranjen sečenjem, i ciklični voltamogram Pt elektrode u Ag/PVP nanokompozitu je ponovo snimljen (slika 5.29 b). Novi ciklični voltamogram nije ispoljio ni anodni pik na 545 mV, niti katodni na 185 mV, što ukazuje da se navedeni par strujnih pikova može pripisati procesima oksido-redukcije površinskog sloja srebra koji se taloži kao spoljni sloj na hidrogelu, tokom sinteze nanočestica srebra. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa procesima oksido-redukcije srebra u rastvoru (slika 5.28), s obzirom da se odgovarajući par strujnih pikova javlja na 600 mV i 160 mV. Malo pomeranje položaja pikova na 545 mV, odnosno 185 mV može biti objašnjeno uticajem mreže hidrogela. Druga dva para strujnih pikova se odnose na procese oksido-redukcije nanočestica srebra. Par 390 mV/70 mV se može pripisati oksido-redukciji manjih nanočestica srebra koje su pokretljivije, dok se par 800 mV/370 mV može odnositi na oksido-redukciju većih nanočestica srebra, koje su manje pokretljive usled koordinacionog vezivanja sa molekulima PVP.

Navedeni rezultati ukazuju na postojanje dva tipa nanočestica srebra unutar hidrogela, jednih relativno slobodnih, i podložnih oksidaciji, i drugih koji su već koordinativnim vezama povezane sa molekulima PVP, i stoga manje reaktivne. Kako su i rezultati visokorezolucione skenirajuće elektronske mikroskopije pokazali da male nanočestice formiraju klastere unutar mreže hidrogela (odjeljak 5.3.2), takozvane slobodne nanočestice bi bile one povezane samo među sobom, dok su one manje reaktivne stacionirane neposredno na granici faza sa PVP hidrogelom.

#### **5.3.4. INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA SA FURIJEVOM TRANSFORMACIJOM**

Interakcije makromolekula PVP sa nanočesticama srebra su ispitane FT-IR spektroskopijom. Infracrveni spektri su snimljeni za PVP hidrogel i Ag/PVP nanokompozite dobijene nakon bubrenja PVP hidrogela u rastvoru 3,9 mM AgNO<sub>3</sub> sa 0,1 M KNO<sub>3</sub> pri vremenu implementacije od 4 min i vrednostima napona od 40 V, 75 V, 100 V, 125 V, 150 V i 200 V. Promena u izgledu infracrvenog spektra Ag/PVP nanokompozita u funkciji primenjenog

napona nije uočena. Na slici 5.30 prikazani su infracrveni spektri PVP i Ag/PVP nanokompozita dobijenog pri konstantnom naponu od 200 V.



*Slika 5.30. Infracrveni spektri PVP i Ag/PVP nanokompozita dobijenog nakon bubrenja PVP hidrogela u rastvoru 3,9 mM AgNO<sub>3</sub> sa 0,1 M KNO<sub>3</sub> pri vremenu implementacije od 4 min i naponu od 200 V.*

U Tabeli 5.7 prikazane su vrednosti talasnog broja na kojima se pojavljuju maksimumi na infracrvenim spektrima PVP hidrogela i Ag/PVP nanokompozita, kao i karakteristične grupe koje odgovaraju pojavi maksimuma na određenim vrednostima talasnih brojeva.

Iz Tabele 5.7 se vidi da postoje izvesne razlike u položajima grupa u IC spektrima PVP i Ag/PVP nanokompozita. Poređenjem sa Tabelom 5.1. (odjeljak 5.1.5.) u kojoj su prikazane vrednosti talasnog broja na kojima se pojavljuju maksimumi na IC spektrima tankih filmova PVP i Ag/PVP nanokompozita dobijenih uparavanjem rastvarača iz rastvora PVP i koloidne disperzije Ag/PVP

dobijene galvanostatskom sintezom gustom struje od 61,7 mA cm<sup>-2</sup>, uočava se da se iste trake, i na istim vrednostima talasnog broja javljaju u oba slučaja. Navedeno ukazuje da rezultati FT-IR spektroskopije ne zavise od vrste uzorka, već isključivo od komponenti i njihovih interakcija. Može se zaključiti da i u Ag/PVP nanokompozitnom hidrogelu dolazi do koordinativnog vezivanja između pirolidonskog prstena PVP i nanočestica srebra. Kako su nanočestice srebra u hidrogelu u proseku prečnika oko 75 nm (FE-SEM, odeljak 5.3.2.), usled sternih smetnji, veća je verovatnoća koordinativnog vezivanja nanočestica srebra sa kiseonikom iz pirolidonskog prstena PVP [248].

*Tabela 5.7. Vrednosti talasnog broja na kojima se pojavljuju maksimumi na infracrvenim spektrima PVP hidrogela i Ag/PVP nanokompozita*

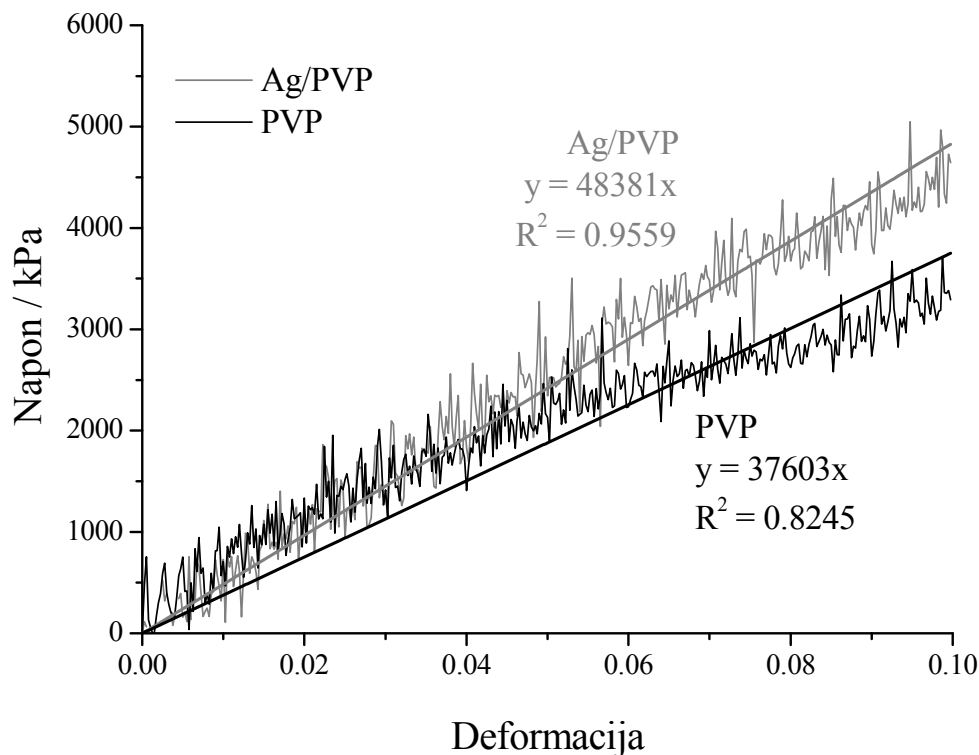
Talasni broj / cm <sup>-1</sup>		Grupa
PVP	Ag/PVP	
3406	3392	vibracije –OH grupe
2950	2953	istezanje –CH grupe
1645	1641	vibracije >N–C=O grupe
1427	1425	vibracije 3 <sup>o</sup> azota
1278	1282	N–OH kompleks

### **5.3.5. BIOREAKTORSKA EVALUACIJA MEHANIČKIH SVOJSTAVA**

Za evaluaciju potencijala za biomedicinsku upotrebu Ag/PVP nanokompozita korišćen je novi bioreaktor sa dinamičkom kompresijom spregnutom sa perfuzijom simulirane telesne tečnosti (SBF), pri fiziološkim režimima koji simuliraju *in vivo* uslove u artikulanoj hrskavici (dinamička kompresija pri deformaciji od 10 %, frekvencija 0,42 Hz, režim „1 h rad/1 h pauza“, brzina protoka medijuma 5 · 10<sup>-3</sup> cm<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> koja odgovara površinskoj brzini medijuma od 25 μm s<sup>-1</sup>; navedeni uslovi su postavljeni tako da imitiraju hodanje, i brzine protoka krvi u kapilarima (površinska brzina medijuma je u

opsegu od 10 – 100  $\mu\text{m s}^{-1}$ ). Diskovi PVP hidrogela i Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela su testirani pri deformaciji od 10 % u dva režima: a) pri dinamičkoj kompresiji, i brzini pomeranja motora od 337,5  $\mu\text{m s}^{-1}$  i b) pri postepenom povećanju deformacije sa koracima od 100  $\mu\text{m}$  pri istoj brzini pomeranja motora sa pauzama od 30 min. U svim eksperimentima, napon je bio skoro linearna funkcija primenjene deformacije za oba tipa hidrogela (slike 5.31 (režim a) i 5.32 (režim b)). Vrednosti modula kompresije za PVP i Ag/PVP nanokompozitni hidrogel su izračunate kao nagibi eksperimentalnih krivih napon – deformacija (slika 5.32).

Vrednost modula kompresije dobijenog pri brzini pomeranja motora od 337,5  $\mu\text{m s}^{-1}$  za diskove PVP hidrogela je 37,6 kPa, a za diskove Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela oko 22,3 % veća: 48,4 kPa (slika 5.31), što ukazuje da prisustvo nanočestica srebra dovodi do malog opadanja elastičnosti hidrogela. Jedan od faktora koji doprinosi različitom biomehaničkom ponašanju Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela u odnosu na PVP hidrogel može biti u mogućnosti zadržavanja fluida. Sporije otpuštanje simulirane telesne tečnosti iz Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela se može objasniti zarobljavanjem jona koji potiču iz simulirane telesne tečnosti u šupljinama hidrogela koje su već zaposednute nanočesticama srebra, otežavajući tranzit ovih jona kroz Ag/PVP nanokompozitni hidrogel. Takođe, naelektrisavanje nanočestica srebra tokom vremena, kao rezultat interakcija sa rastvorom simulirane telesne tečnosti, koja je polielektrolit, može da utiče na stepen bubrenja nanokompozita, i na odgovarajuća mehanička svojstva, zadržavajući određenu količinu tečnosti duže vreme nego PVP hidrogel, verovatno usled solvatacije naelektrisanih nanočestica srebra. Sorpcione karakteristike ispitivanih uzoraka su u saglasnosti sa navedenim rezultatima, i biće detaljnije diskutovane u sledećem odeljku.

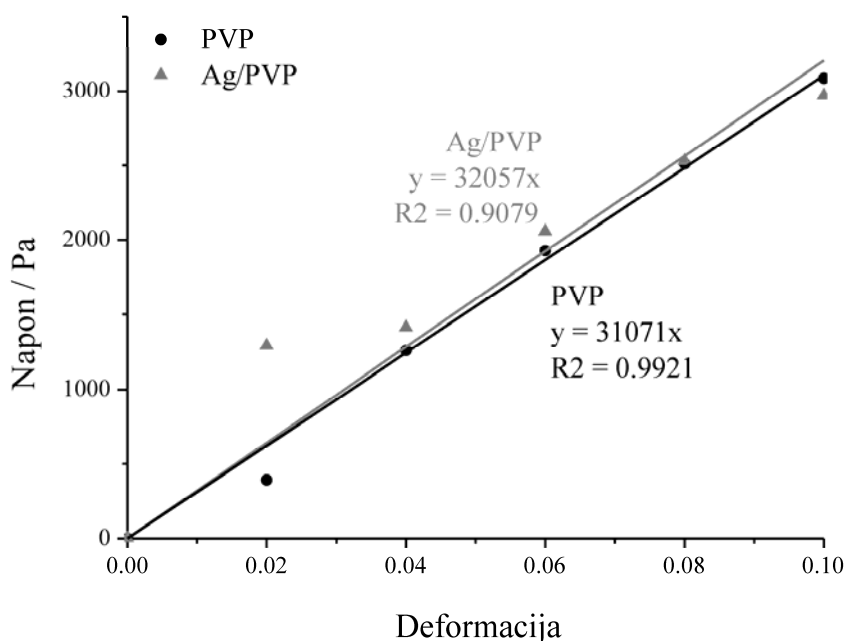


*Slika 5.31. Reprezentativni odnosi napon – deformacija i najbolji linearni modeli za diskove PVP hidrogela i Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela pri brzini pomeranja motora od  $337,5 \mu\text{m s}^{-1}$  (prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti tri merenja).*

Drugi eksperiment u bioreaktoru, izveden pri postepenom povećanju deformacije sa koracima od  $100 \mu\text{m}$  i pauzama od 30 min, je omogućio određivanje ravnotežnog modula kompresije, koji odgovara Jangovom modulu elastičnosti, za PVP hidrogel i Ag/PVP nanokompozitni hidrogel. Vremenski period od 30 min je omogućio relaksaciju napona hidrogelova, tj. relaksaciju polimerne mreže PVP. Prilikom ispitivanja mehaničkih karakteristika Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova dobijenih radijaciono-hemijskim putem, eksperimentalno je potvrđeno da je 30 min dovoljno da se dostignu ravnotežne vrednosti napona (odgovori senzora opterećenja mereni nakon 30 min i nakon

48 h su se razlikovali samo za oko 5 %) [227]. Ravnotežni odnosi napon – deformacija, kao i isti dobijeni pri brzini pomeranja motora od  $337,5 \mu\text{m s}^{-1}$ , su pratili linearni trend, i ravnotežni moduli kompresije su takođe izračunati kao nagibi eksperimentalno dobijenih zavisnosti napon – deformacija (slika 5.32).

Izračunate vrednosti ravnotežnog modula kompresije su slične: 31,1 kPa za diskove PVP hidrogela i 32,0 kPa za diskove Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela. Razlika između vrednosti za PVP i Ag/PVP nanokompozitni hidrogel (2,8 %) je značajno niža od one dobijene pri dinamičkoj kompresiji (22,3 %). Ovo može ukazivati da prisustvo nanočestica srebra nema uticaj na biomehanička svojstva PVP hidrogela, s obzirom da su vrednosti za ravnotežni modul dobijene nakon relaksacije polimerne mreže.



*Slika 5.32. Reprezentativne zavisnosti napon – deformacija i najbolji linearni modeli za diskove PVP hidrogela i Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela pri postepenom povećanju deformacije sa koracima od  $100 \mu\text{m}$  svakih 30 min (prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti tri merenja).*

Mogućnost merenja mehaničkih svojstava uzoraka hidrogelova pomoću ovog bioreaktorskog sistema je dokazana dobijenim vrednostima ravnotežnog modula kompresije, koje su, za oba tipa uzoraka, PVP hidrogel i Ag/PVP nanokompozitni hidrogel, u saglasnosti sa literaturnim vrednostima Jangovog modula za hemijski umrežene PVP hidrogelove, koje se kreću u opsegu od 19 kPa do 504 kPa [266]. Imajući u vidu da je, prema Guu (Gu) i saradnicima [180], vrednost Jangovog modula elastičnosti humane artikularne hrskavice između 1,9 – 14,4 MPa, PVP i Ag/PVP nanokompozitni hidrogelovi ne zadovoljavaju mehanička svojstva zahtevana za primenu u obliku implantata za meka tkiva, preciznije hrskavicu. Međutim, primena PVP hidrogela i Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela u medicini je ipak obećavajuća, s obzirom da su minimalne vrednosti Jangovog modula nađene u literaturi, a potrebne za primenu hidrogelova kao obloga za rane u opsegu od 1,5 – 150 kPa [178, 179]. Ovo ukazuje da sa aspekta mehaničkih svojstava, obe vrste ispitivanih hidrogelova mogu biti primenljive u medicini. U budućnosti, mehanička svojstva se mogu poboljšati, npr. ko-polimerizacijom, kako bi izuzetna biokompatibilnost Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela mogla biti iskorišćena za različite primene u medicini.

Pomenuti PVP i Ag/PVP nanokompozitni hidrogelovi dobijeni radijaciono-hemijskom sintezom su pokazali nešto drugačije ponašanje u bioreaktoru [227]. Naime, ispitivanja modula kompresije u dinamičkim uslovima nisu dala jedinstvene vrednosti: za diskove PVP hidrogela vrednost je varirala u opsegu od 56,0 – 64,8 kPa, dok je za diskove Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela bila u intervalu od 54,6 – 87,1 kPa. Takođe, vrednosti ravnotežnog modula kompresije za diskove PVP hidrogela su bile u opsegu od 26,5 – 27,1 kPa, dok su za diskove Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela bile između 30,7 kPa i 55,5 kPa. Mehanička svojstva ispitivanih hidrogelova su varirala od serije do serije, ukazujući na značajnu zavisnost svojstava od nasumičnog procesa umrežavanja polimera polimerizacijom po tipu radikala, i naknadnom redukcijom Ag<sup>+</sup> jona. Iako je primećeno variranje vrednosti ravnotežnog modula kompresije, u svim eksperimentalnim serijama su dobijene nešto veće vrednosti modula za Ag/PVP nanokompozitni hidrogel.



U celini, prikazani rezultati ukazuju na znatnu elastičnost PVP hidrogelova dobijenih gama zračenjem, verovatno uslovljenu visokim udelom gela, koji je određen gravimetrijski i iznosio je 94 %.

### 5.3.6. SORPCIONE KARAKTERISTIKE

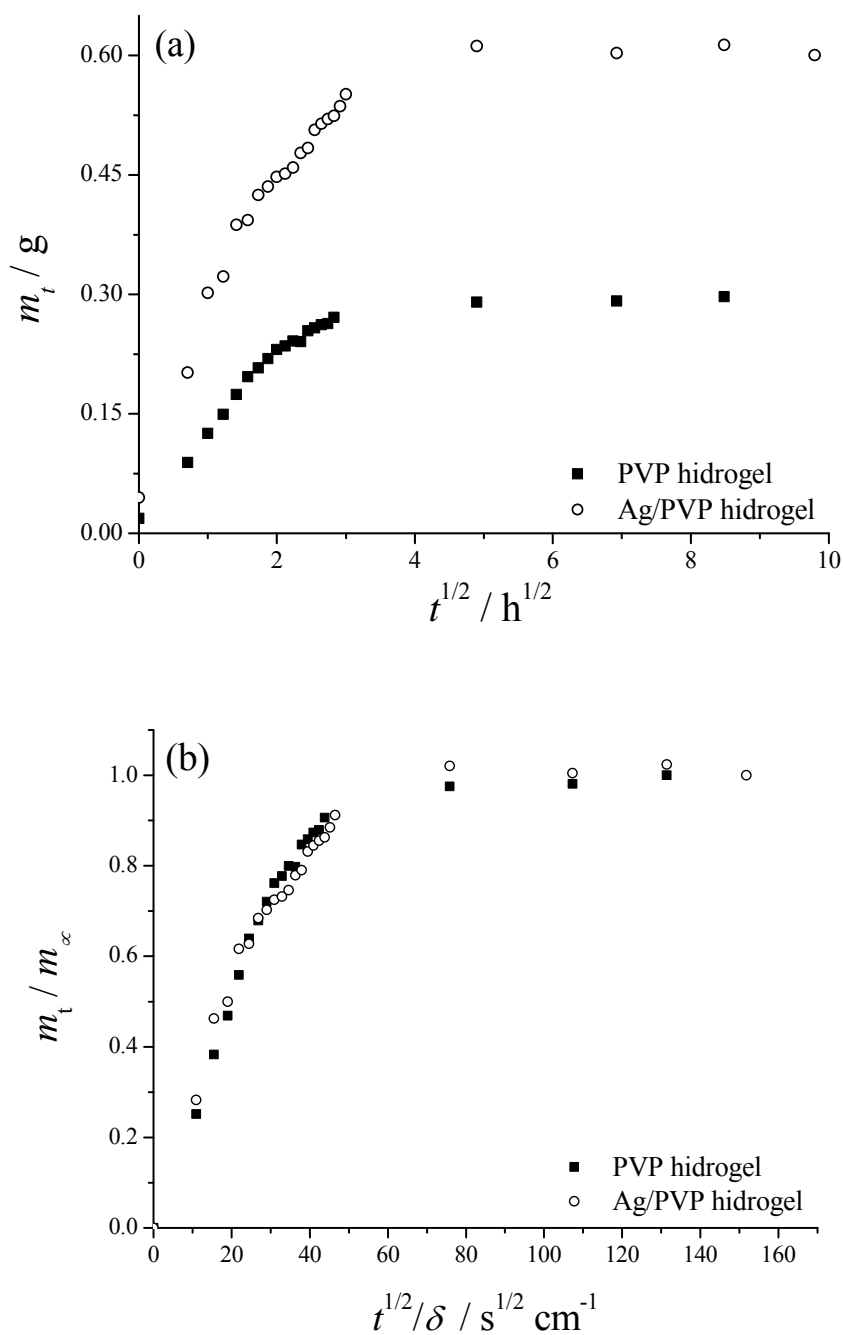
U cilju određivanja sorpcionih karakteristika PVP i Ag/PVP kserogelova (suvih gelova), apsorpcija simulirane telesne tečnosti je praćena tokom 72 h u simuliranoj telesnoj tečnosti na  $37 \pm 1$  °C i ispitana gravimetrijski. Na slici 5.33 a su prikazane sorpcione krive. Redukovane sorpcione krive (slika 5.33 b) su prikazane kao zavisnost  $m_t / m_\infty$  vs.  $t^{1/2} / \delta$ , prateći drugi Fikov zakon difuzije prikazan jednačinom (5.3), za ravnu ploču i kratka vremena [267]:

$$\frac{m_t}{m_\infty} = \frac{4}{\delta} \frac{D^{1/2}}{\pi^{1/2}} t^{1/2} \quad (5.3)$$

gde je  $m_t$  količina simulirane telesne tečnosti apsorbovane u vremenu  $t$ ,  $m_\infty$  je količina simulirane telesne tečnosti apsorbovane u ravnoteži,  $D$  koeficijent difuzije simulirane telesne tečnosti kroz PVP i Ag/PVP nanokompozitni hidrogel, i  $\delta$  debljina uzoraka.

Kao što se može primetiti sa slike 5.33 a, početna apsorpcija simulirane telesne tečnosti je linearna dok se ne dostigne ravnotežno stanje. Linearnost je u saglasnosti sa pretpostavkom da se apsorpcija podvrgava drugom Fikovom zakonu difuzije. Vrednosti koeficijenta difuzije,  $D$ , simulirane telesne tečnosti kroz PVP hidrogel i Ag/PVP nanokompozitni hidrogel su izračunate iz nagiba početnog linearnog dela redukovanih sorpcionih krivih (slika 5.33 b). Dobijene vrednosti su iznosile  $1,23 \cdot 10^{-4}$  cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> za PVP i  $1,33 \cdot 10^{-4}$  cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> za Ag/PVP nanokompozitni hidrogel. Koeficijent difuzije simulirane telesne tečnosti u Ag/PVP nanokompozitni hidrogel je malo veći nego u PVP hidrogel, i to oko 8 %, ukazujući na malo olakšanu apsorpciju simulirane telesne tečnosti u Ag/PVP nanokompozitni hidrogel, u odnosu na PVP. Može se pretpostaviti da prisustvo nanočestica srebra širi mrežu PVP hidrogela, omogućujući nešto bržu

difuziju simulirane telesne tečnosti, i stoga poboljšavajući kapacitet apsorpcije Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela.

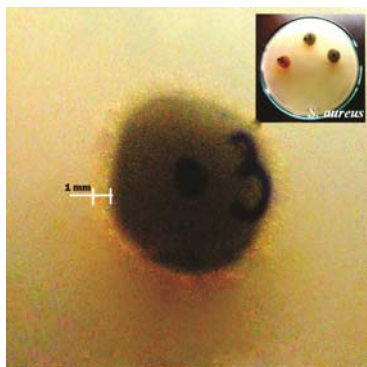


Slika 5.33. a) Sorpcione krive i b) redukovane sorpcione krive PVP hidrogela i Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela u simuliranoj telesnoj tečnosti na 37°C.

Dobijene sorpcione krive su u saglasnosti sa blagim razlikama u biomehaničkim karakteristikama PVP hidrogela i Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela, dobijenim ispitivanjem mehaničkih svojstava pri dinamičkoj kompresiji. Veća vrednost dinamičkog modula kompresije, dobijena za Ag/PVP nanokompozitni hidrogel, može biti uzrokovana većom količinom simulirane telesne tečnosti apsorbovane tokom istog vremena, u poređenju sa PVP. Ovo ukazuje da porast kapaciteta bubrenja, kao i smanjenje elastičnosti hidrogela, može biti posledica inkorporisanja nanočestica srebra. Uzrok se može naći u činjenici da nanočestice srebra, kada se inkorporišu unutar mreže PVP hidrogela, šire PVP mrežu, omogućujući bržu difuziju simulirane telesne tečnosti. Usled zadržavanja rastvora, one čine PVP hidrogel nešto čvršćim pogoršavajući elastična svojstva polimerne mreže, ali samo u uslovima dinamičke kompresije. Slično je pokazano i na primeru Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela dobijenog radijaciono-hemijskom sintezom, čija vrednost ravnotežnog stepena bubrenja je veća oko 17 % od istog izračunatog za PVP hidrogel [227].

### **5.3.7. ISPITIVANJE ANTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI Ag/PVP NANOKOMPOZITNIH HIDROGELOVA**

Ispitivanje antibakterijske aktivnosti je vršeno agar difuzionim testom. Antibakterijska aktivnost Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova je ispitana dejstvom na *Staphylococcus aureus*. Nakon 24 h inkubacije, vidljiva je jasna zona od oko ~1 mm oko diskova uzoraka (slika 5.34), ukazujući na izostanak rasta mikroorganizama. Ovo ukazuje na dostizanje minimalne inhibitorne koncentracije otpuštenog srebra oko uzoraka Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela. Nakon uklanjanja uzoraka Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela iz Petri šolja, zona inhibicije bakterijskog rasta je takođe primećena na površini agara, na mestima na kojima su se nalazili uzorci, ukazujući na brzu difuziju srebra kroz agar odozgo na dole.



*Slika 5.34. Uzorci Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela korišćeni pri ispitivanju antibakterijske aktivnosti prema S. aureus agar difuzionim testom.*

Navedeni rezultati ukazuju da Ag/PVP nanokompozitni hidrogel efikasno otpušta nanočestice srebra i/ili  $\text{Ag}^+$  jone i indukuje baktericidne efekte prema *S. aureus*. Međutim, antibakterijska aktivnost Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela je očigledno limitirana brzinom difuzije nanočestica srebra kroz supstrat od čvrstog agara (gel). Agar difuzioni test je korišćen kao preliminarni test za potvrdu antimikrobne aktivnosti Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela.

#### **5.4. CITOTOKSIČNOST I OTPUŠTANJE SREBRA IZ Ag/PVP NANOKOMPOZITNIH HIDROGELOVA KAO PARAMETRI PREDVIĐANJA PRIMENE U IN VIVO USLOVIMA**

Rezultati navedeni u prethodnim odeljcima ukazuju na uspešnu sintezu nanočestica srebra kako u rastvorima, tako i u polimernom hidrogelu. Dobijene nanočestice su željenih karakteristika, oblika i dimenzija, i ceo sistem, svojim antibakterijskim dejstvom, poboljšavaju.

U daljem tekstu, biće pokazano da Ag/PVP nanokompozitni hidrogelovi zaista imaju mogućnost biomedicinske primene, jer obezbeđuju antibakterijska

svojstva, istovremeno ne čineći štetu okolini. Rezultati ukazuju da bi se finim podešavanjem koncentracije nanočestica srebra mogao naći dobar izbor antimikrobnog agensa bezbedan za različite vrste ćelija okolnih tkiva, s obzirom da je od ranije poznato da se citotoksičnost nanočestica srebra različito ispoljava prema različitim vrstama ćelija [268, 269].

#### **5.4.1. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI**

##### **5.4.1.1. Preliminarni eksperimenti**

U preliminarnim eksperimentima, preživljavanje ciljnih PBMC i HeLa ćelija koje su rasle u prisustvu PVP hidrogela ili Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela dobijenog iz PVP hidrogela bubrenog u rastvoru AgNO<sub>3</sub> koncentracije 3,9 mmol dm<sup>-3</sup>, je određeno MTT testom.

Prisustvo PVP hidrogela je uzrokovalo samo blago smanjenje preživljavanja ciljnih ćelija. Naime, 84 ± 9 % PBMC i 73 ± 9 % HeLa ćelija, u odnosu na kontrolni uzorak, je preživelo nakon 72 h, odnosno 96 h inkubacije, redom. Sa druge strane, prisustvo Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela je smanjilo broj PBMC i HeLa ćelija, redom, na 60 ± 7 %, odnosno 56 ± 8 %, u odnosu na kontrolni uzorak.

Navedeni rezultati ukazuju da nema značajne razlike u osetljivosti normalnih mononuklearnih ćelija periferne krvi zdravih dobrovoljaca, i malignih HeLa ćelija na prisustvo PVP hidrogela, odnosno Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela. Naredni eksperimenti su, stoga, rađeni samo na PBMC.

##### **5.4.1.2. Ispitivanje zavisnosti citotoksičnosti Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova od koncentracije inkorporisanog srebra**

Nakon preliminarnih eksperimenata, citotoksičnost PVP hidrogela i Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova u kulturama PBMC je dalje ispitivana kao funkcija koncentracije nanočestica srebra inkorporisanih u Ag/PVP

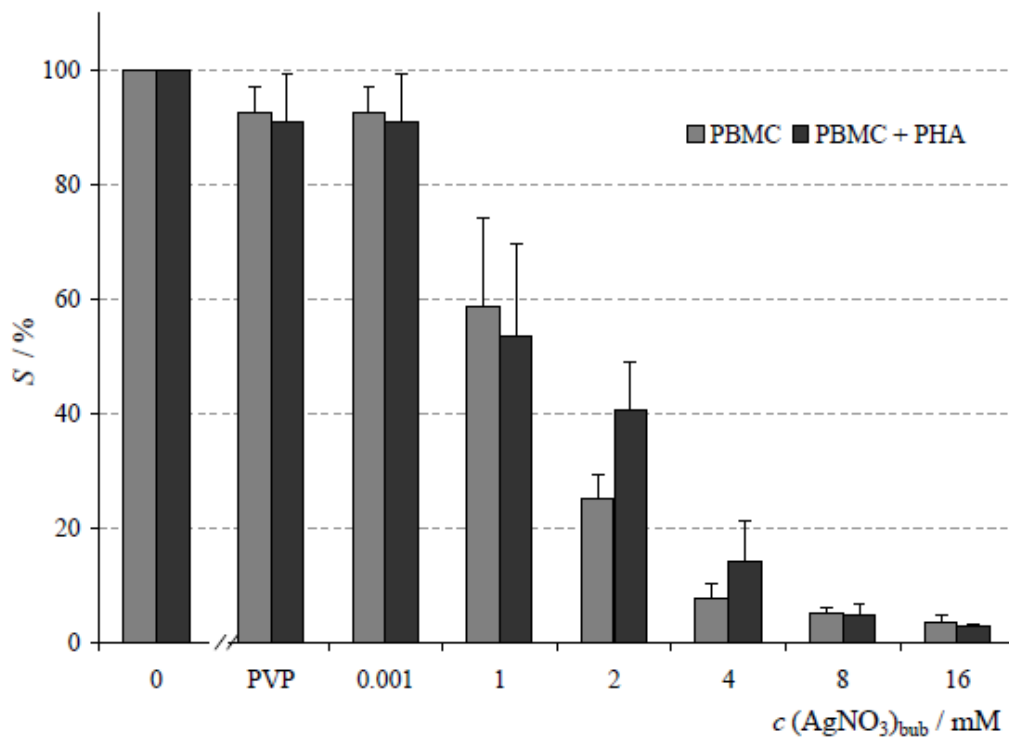
nanokompozitnim hidrogelovima. Takođe, citotoksičnost uzrokovana prisustvom nanočestica srebra je poređena sa citotoksičnošću koju je izazvalo prisustvo  $\text{Ag}^+$  jona, iz rastvora  $\text{AgNO}_3$  u različitim koncentracijama. Poređenje dejstva različitih formi srebra na ćelije nije neuobičajeno, s obzirom da se još uvek razmatra da li su antimikrobno dejstvo i toksičnost prema eukariotskim ćelijama nanočestica srebra izraženije nego dejstvo jona srebra. Rezultati citotoksičnosti ove dve forme su različiti [npr. 143, 144], ali i saglasni u tome da koncentracija srebra utiče na citotoksičnost. Pokazano je, takođe, da citotoksičnost može biti i u funkciji odnosa nanočestica srebra i jona u uzorku [24].

Slika 5.35 predstavlja preživljavanje, *S*, PBMC, nestimuliranih, kao i stimuliranih na proliferaciju dodatkom mitogena PHA, koje su rasle u prisustvu PVP hidrogela i Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova, dobijenih iz PVP hidrogela bubrenog u rastvorima  $\text{AgNO}_3$  različitih koncentracija ( $1 \text{ mmol dm}^{-3}$  –  $16 \text{ mmol dm}^{-3}$ ), u odnosu na kontrolne uzorke. Radi poređenja, na slici 5.36 je prikazano preživljavanje, *S*, PBMC, nestimuliranih, kao i stimuliranih na proliferaciju dodatkom mitogena PHA, koje su bile izložene dejstvu  $\text{Ag}^+$  jona, iz rastvora  $\text{AgNO}_3$  u različitim koncentracijama, takođe u odnosu na kontrolne uzorke.

Može se primetiti da je povećanje koncentracije srebra, bilo u Ag/PVP nanokompozitnim hidrogelovima (slika 5.35), bilo u rastvorima  $\text{AgNO}_3$  (slika 5.36) dovelo do smanjenja u preživljavanju ciljnih ćelija, odnosno PBMC.

Trebalo bi naglasiti da je prisustvo PVP hidrogela dovelo do neznatnog smanjenja u preživljavanju PBMC, i to na  $92,6 \pm 4,7 \%$  za nestimulirane, i  $91,0 \pm 8,5 \%$  za PHA stimulirane PBMC, u odnosu na kontrolni uzorak (slika 5.35). Sa druge strane, u prisustvu Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova, preživljavanje PBMC je znatno smanjeno (slika 5.36). Sa slike je očigledno da se, prema skali citotoksičnosti datoj u odeljku 4.3.2.3, blaga citotoksičnost uočava za uzorke Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova dobijenih iz PVP hidrogela bubrenog u rastvorima koncentracije  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$ , i manje, dok je prisustvo Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova dobijenih iz PVP hidrogela bubrenog u

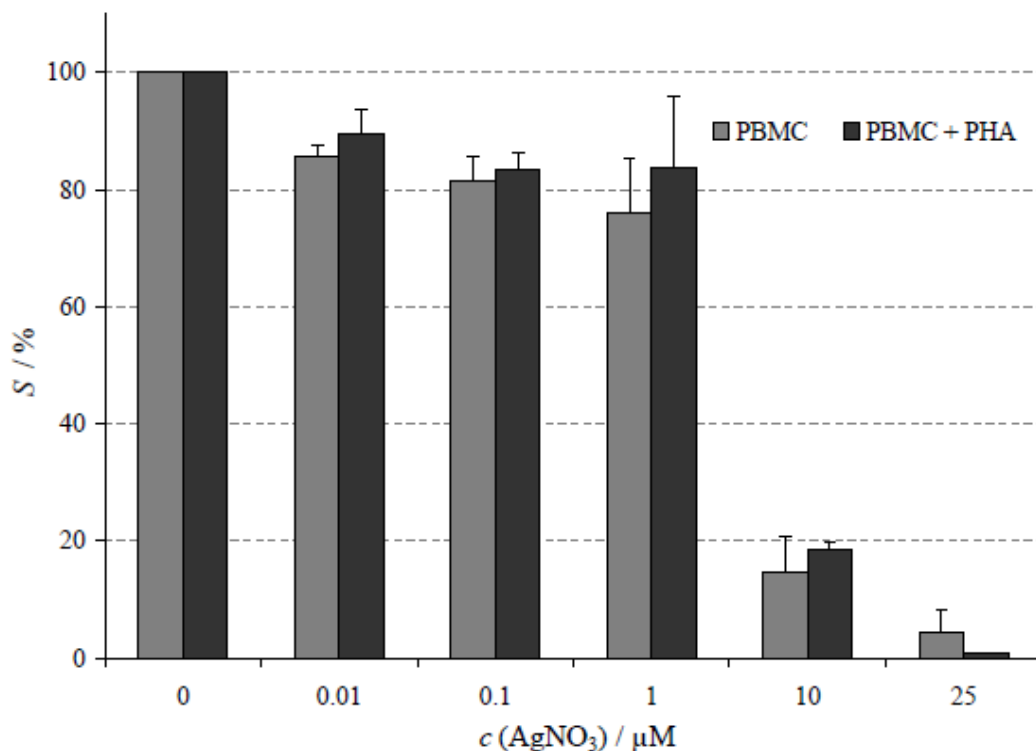
rastvorima veće koncentracije uzrokovalo značajno smanjenje u preživljavanju PBMC. Uočeno je i da nije bilo značajne razlike u dejstvu Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova na nestimulisane i PBMC stimulisane na proliferaciju pomoću PHA.



*Slika 5.35. Preživljavanje, S, PBMC nestimuliranih i stimuliranih na proliferaciju pomoću PHA nakon 72 h u prisustvu PVP hidrogela ili Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova dobijenih iz PVP hidrogelova bubrenih u rastvorima  $\text{AgNO}_3$  različite koncentracije,  $c(\text{AgNO}_3)_{\text{bub}}$ , u poređenju sa kontrolnim uzorkom (prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost tri merenja).*

Efekti direktnog izlaganja ispitivanih ćelija dejstvu  $\text{Ag}^+$  jona iz rastvora  $\text{AgNO}_3$  različite koncentracije su prikazani na slici 5.36. Uočava se da prisustvo jona srebra do koncentracije  $\leq 1 \mu\text{mol dm}^{-3}$  dovodi do blagog smanjenja u preživljavanju PBMC, što odgovara blagoj citotoksičnosti (skala, odeljak

4.3.2.3). Međutim, prisustvo  $\text{Ag}^+$  jona u koncentraciji od samo  $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$  dovodi do veoma velikog smanjenja u preživljavanju PBMC, na manje od 20 % u odnosu na kontrolni uzorak. Ni u ovom slučaju nije uočen uticaj dodatka PHA na preživljavanje PBMC.



*Slika 5.36. Preživljavanje, S, PBMC nestimuliranih i stimuliranih na proliferaciju pomoću PHA nakon 72 h u zavisnosti od koncentracije  $\text{AgNO}_3$ ,  $c(\text{AgNO}_3)$ , u poređenju sa kontrolnim uzorkom (prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost dva merenja).*

Vrednosti  $\text{IC}_{50}$ , koja se definiše kao koncentracija ispitivanog agensa koja dovodi do smanjenja preživljavanja ćelija na 50 % u odnosu na kontrolni uzorak, određene sa slike 5.36, iznosile su  $4,8 \mu\text{mol dm}^{-3}$  i  $5,6 \mu\text{mol dm}^{-3}$  za nestimulirane PBMC i PBMC stimulirane na proliferaciju pomoću PHA, redom. Dobijene vrednosti su poredive sa ranije objavljenim rezultatima [270]. U navedenoj studiji humani fibroblasti kože su izlagani dejstvu  $\text{AgNO}_3$  u opsegu



koncentracija od  $4,12 \mu\text{mol dm}^{-3}$  do  $82,4 \mu\text{mol dm}^{-3}$  u toku 8 h i 24 h. Nakon 24 h, prisustvo  $\text{Ag}^+$  jona u koncentraciji od  $16,5 \mu\text{mol dm}^{-3}$  je dovelo do smanjenja u sadržaju proteina na 50 % u odnosu na kontrolni uzorak, u kulturi koja je sadržala 10 % goveđeg fetalnog seruma. Ipak, u ovoj studiji nije praćeno duže vreme izlaganja ćelija jonima srebra. Nešto veće vrednosti  $\text{IC}_{50}$  dobijene u našem radu nakon 72 h izlaganja PBMC jonima srebra, potvrđuju činjenicu da je citotoksičnost u odnosu na humane ćelije funkcija ne samo koncentracije jona i perioda izlaganja ćelija, već i tipa ćelija.

Na osnovu ovde prikazanih *in vitro* eksperimenata, može se primetiti da nanočestice srebra kao i joni ispoljavaju različitu citotoksičnost prema PBMC, i to u zavisnosti od koncentracije. Uz to, nije uočena značajna razlika kada je ispitivano dejstvo na PBMC stimulisane na proliferaciju pomoću PHA. Rezultati ovog ispitivanja ukazuju da je isti, blago citotoksični efekat dejstva ispitivanih agenasa na PBMC, dobijen usled prisustva  $\text{Ag}^+$  jona koncentracije  $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ , i usled prisustva nanočestica srebra iz Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela dobijenog iz PVP hidrogela bubrenog u rastvoru  $\text{AgNO}_3$  koncentracije  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$ , što je vrednost veća za tri reda veličine. Ipak, tokom perioda inkubacije nije otpuštena celokupna količina nanočestica srebra iz Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova, što je bilo očigledno jer nisu izgubili žuto obojenje. Stoga su koncentracije nanočestica srebra, odnosno jona, otpuštenih iz Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova u hranjivi medijum izračunate na osnovu eksperimentalnih podataka i modelovanja kinetike otpuštanja (odeljak 5.4.2.1.).

#### **5.4.2. ISPITIVANJE OTPUŠTANJA SREBRA IZ Ag/PVP NANOKOMPOZITNOG HIDROGELA**

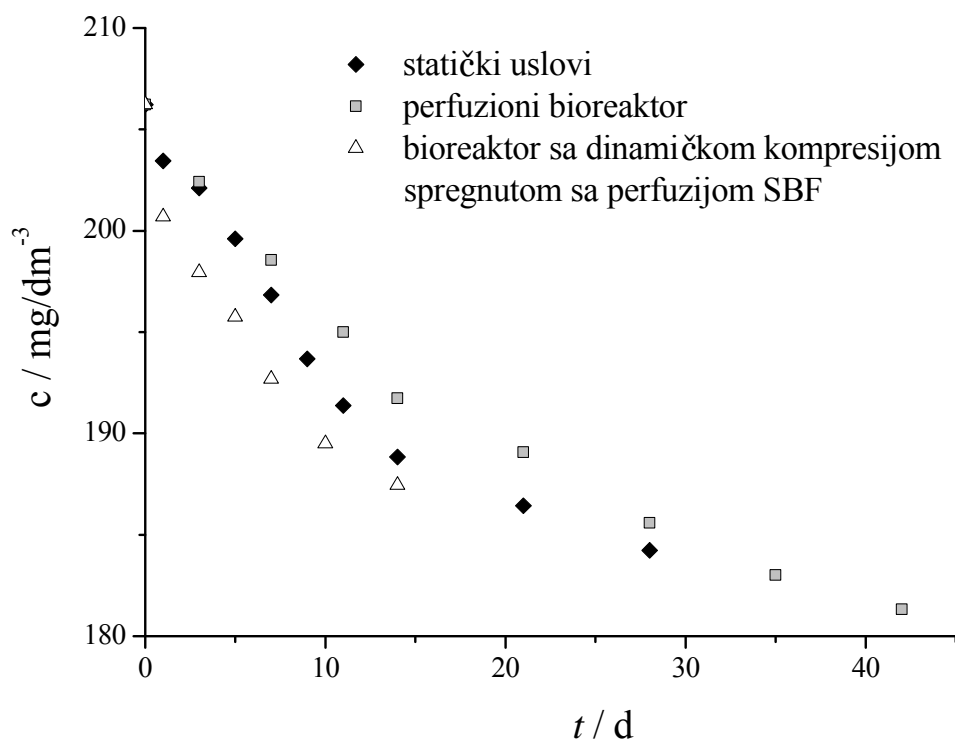
Na slici 5.37 je prikazan pad koncentracije srebra unutar Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela pri statičkim uslovima, u perfuzionom bioreaktoru, i u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom spregnutom sa perfuzijom simulirane telesne tečnosti, do 42. dana otpuštanja.

Početna koncentracija nanočestica srebra unutar Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela, dobijenog iz PVP hidrogela bubrenog u rastvoru  $\text{AgNO}_3$  koncentracije  $3,9 \text{ mmol dm}^{-3}$ , je bila  $206,2 \pm 62,2 \text{ mg dm}^{-3}$ . Ova vrednost predstavlja oko 50 % od očekivane, ukoliko bi redukcija jona srebra prisutnih u nabubrelom PVP hidrogelu bila potpuna ( $3,9 \text{ mmol dm}^{-3} = 420,8 \text{ mg dm}^{-3}$ ). Eksperimentalno određena vrednost je korišćena u daljim izračunavanjima u okviru odeljka 5.4.2.1. *Difuzija*, koji sledi.

Razlike u profilima otpuštanja srebra u tri različite eksperimentalne postavke su bile statistički zanemarljive (ispod 3 %), što ukazuje da je pri svim primenjenim eksperimentalnim uslovima dominantni način prenosa mase interna/unutrašnja difuzija. Ovaj podatak sugeriše da se protok simulirane telesne tečnosti i u perfuzionom bioreaktoru i u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom spregnutom sa perfuzijom simulirane telesne tečnosti odvija mahom oko uzoraka, a ne kroz njih, čime difuzija postaje jedini mehanizam otpuštanja srebra. Takođe, kako količina otpuštenog srebra u bioreaktorima nije značajno veća od iste u statičkim uslovima, pa samim tim površinsko spiranje srebra nije doprinelo povećanju količine otpuštenog srebra, zaključuje se da površine Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova nisu značajni izvori nanočestica srebra. Treba navesti i da je nešto sporije otpuštanje srebra primećeno u eksperimentalnoj postavci u perfuzionim bioreaktorima, u poređenju sa statičkim uslovima, verovatno rezultat češće izmene medijuma, i usled toga blagog povećanja pogonske sile u sistemu ispitivanom u statičkim uslovima.

Sa druge strane, koncentracije srebra preostalog u Ag/PVP nanokompozitnom hidrogelu ispitivanom u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom spregnutom sa perfuzijom simulirane telesne tečnosti su konzistentno bile niže od koncentracija preostalih u uzorcima ispitivanim u druga dva sistema. Ovo ukazuje na nešto brže otpuštanje srebra u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom spregnutom sa perfuzijom simulirane telesne tečnosti (slika 5.37), verovatno usled dinamičke kompresije. Naime, dinamička kompresija je vršena pri deformaciji uzorka od 10 %, i brzini pomeranja motora od  $337,5 \text{ } \mu\text{m s}^{-1}$ , kojom se postiže frekvencija od 0,37 Hz, u režimu „1 h rad/1 h

pauza“, što je omogućilo nešto brže otpuštanje srebra. Količina srebra otpuštenog tokom 14 dana u ovom bioreaktoru je oko 9 % početnog sadržaja srebra. Važno je naglasiti da postoji realna mogućnost da efekti dinamičke kompresije nisu izraženi u očekivanoj meri usled recirkulacije medijuma unutar hidrogela tokom faze dekompresije (relaksacije polimerne mreže hidrogela). Stoga, ukupni efekat je zanemarljiv u poređenju sa čistom difuzijom očekivanom u statičkim uslovima (slika 5.37). Podaci prikazani na slici 5.37 su srednje vrednosti tri merenja, čije su standardne devijacije bile u okviru 10 % od vrednosti. Ipak, radi jasnoće slike, nisu umetnute oznake za standardnu devijaciju.



*Slika 5.37. Koncentracije srebra unutar Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela tokom ispitivanja otpuštanja srebra pri statičkim uslovima, u perfuzionim bioreaktorima i u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom spregnutom sa perfuzijom simulirane telesne tečnosti (prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost tri merenja).*

Zanimljivo je kvantitativno prikazati smanjenje koncentracije srebra u Ag/PVP nanokompozitnom hidrogelu. Bez obzira na eksperimentalne uslove, ukupno smanjenje koncentracije srebra preostalog u uzorcima je prilično nisko. Najveća količina otpuštenog srebra je uočena nakon 42 dana otpuštanja u statičkim uslovima (slika 5.37), i to samo 12 %. Neznatni uticaji hidrodinamičkih uslova u bioreaktorima na brzinu otpuštanja srebra su najverovatnije uzrokovani stabilnošću nanočestica srebra unutar veoma umreženog PVP hidrogela, usled koordinativnih veza između nanočestica srebra i amid-karbonilne grupe molekula PVP [227]. Kao rezultat stabilnosti nanočestica srebra unutar PVP hidrogela, Ag/PVP nanokompozitni hidrogelovi se mogu koristiti duže vreme, zadržavajući sterilnost.

#### 5.4.2.1. Difuzija

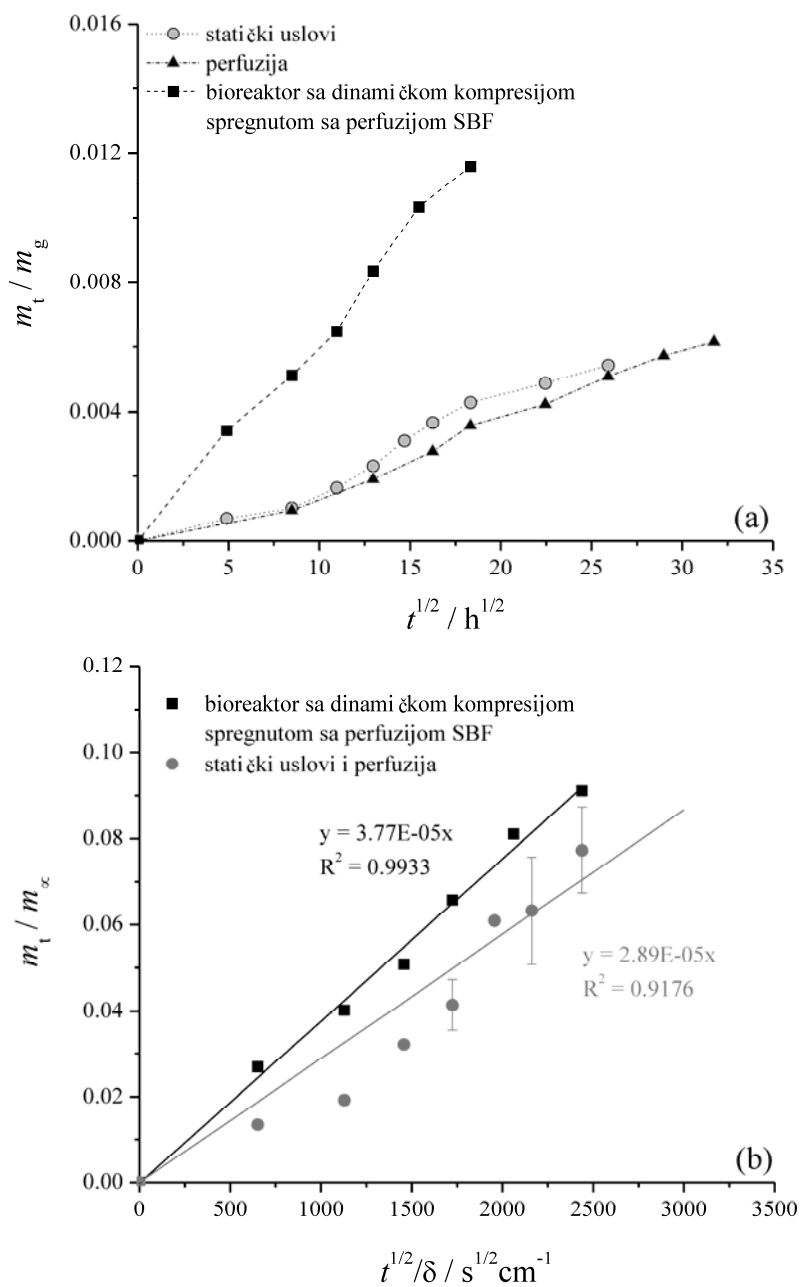
Uticaj različitih eksperimentalnih uslova (statički uslovi, perfuzioni bioreaktori, bioreaktor sa dinamičkom kompresijom spregnutom sa perfuzijom simulirane telesne tečnosti) na otpuštanje srebra iz Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela je kvantitativno određen primenom drugog Fikovog zakona difuzije.

Desorpcija srebra iz Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela je praćena tokom vremena na  $37 \pm 1$  °C. Na slici 5.38 a su prikazane desorpcione krive. Redukovane krive desorpcije (slika 5.38 b) su prikazane kao zavisnost  $m_t / m_\infty$  us.  $t^{1/2} / \delta$ , prateći drugi Fikov zakon difuzije prikazan jednačinom (5.3), za ravnu ploču i kratka vremena [267], gde je  $m_t$  količina srebra otpuštenog u vremenu  $t$ ,  $m_\infty$  ukupna količina srebra u Ag/PVP nanokompozitnom hidrogelu koja može biti otpuštena u beskonačno dugom vremenu,  $D$  je koeficijent difuzije srebra kroz Ag/PVP nanokompozitni hidrogel, a  $\delta$  debljina Ag/PVP uzoraka.

Kao što se može primetiti sa slike 5.38 a, početna desorpcija srebra je linearna. Linearnost je u saglasnosti sa pretpostavkom da se desorpcija podvrgava drugom Fikovom zakonu difuzije. Postepeno dostizanje ravnotežnog stanja u slučaju statičkih i perfuzionih uslova je vidljivo posle 14 dana, dok za eksperiment izveden u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom spregnutom sa perfuzijom SBF ravnotežno stanje nije dostignuto. Sa slike 5.38 a je očigledno da

su razlike u vrednostima otpuštanja srebra dobijenim pri statičkim uslovima i perfuziji male (oko 14 %). Stoga je drugi Fikov zakon difuzije primenjen na srednju vrednost merenja pri statičkim uslovima i perfuziji, i dobijena je jedinstvena vrednost za koeficijent difuzije u ove dve eksperimentalne postavke. Vrednosti koeficijenta difuzije,  $D$ , nanočestica srebra kroz Ag/PVP nanokompozitni hidrogel u različitim hidrodinamičkim uslovima su izračunate iz nagiba početnog linearnog dela redukovanih sorpcionih krivih (slika 5.38 b). Uticaj dinamičke kompresije se uočava kroz rezultate dobijene prilikom ispitivanja otpuštanja srebra u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom spregnutom sa perfuzijom simulirane telesne tečnosti, koji su modelovani odvojeno od rezultata dobijenih ispitivanjem u druga dva sistema.

Vrednost koeficijenta difuzije nanočestica srebra kroz Ag/PVP nanokompozitni hidrogel od  $1,64 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  je izračunata iz nagiba redukovane krive desorpcije za eksperimente izvedene pri statičkim uslovima i u perfuzionim bioreaktorima, kao jedinstvena vrednost, dok je prividni koeficijent difuzije od  $2,79 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  izračunat za otpuštanje srebra u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom spregnutom sa perfuzijom simulirane telesne tečnosti. Vidi se da je dinamička kompresija dovela do povećanja brzine otpuštanja srebra (prikazane kao vrednost prividnog koeficijenta difuzije) iz Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela od oko 40 %, u poređenju sa brzinom otpuštanja srebra pri statičkim uslovima i u perfuzionim bioreaktorima.



Slika 5.38. a) Krive desorpcije i b) linearni delovi redukovanih krivih desorpcije i odgovarajući linearni modeli za otpuštanje srebra iz Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela pri statičkim uslovima i u perfuzionim bioreaktorima (jedinствена kriva), kao i u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom spregnutom sa perfuzijom simulirane telesne tečnosti.

Drugi Fikov zakon difuzije se može iskoristiti za predviđanje performansi i moguće dužine primene Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova u različitim sredinama, i to u kombinaciji sa rezultatima ispitivanja citotoksičnih efekata. Naime, pokazano je da Ag/PVP nanokompozitni hidrogel dobijen iz PVP hidrogela bubrenog u rastvoru AgNO<sub>3</sub> koncentracije 1 mmol dm<sup>-3</sup> ispoljava blago citotoksično dejstvo na PBMC, nakon 72 h otpuštanja srebra u 0,6 cm<sup>3</sup> medijuma (slika 5.35). Ukupna količina srebra u ovom Ag/PVP nanokompozitnom hidrogelu ( $m_{\infty}$ ) je izračunata i iznosi 52,9 mg dm<sup>-3</sup>. Ukoliko se primeni jednačina drugog Fikovog zakona difuzije (5.3), i vrednost koeficijenta difuzije od  $1,64 \cdot 10^{-10}$  cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>, koja je određena za otpuštanje srebra u statičkim uslovima, i  $m_{\infty}$  od 52,9 mg dm<sup>-3</sup>, finalna koncentracija srebra otpuštenog u medijum nakon 72 h ( $m_t$ ) je izračunata i iznosi 0,4 μmol dm<sup>-3</sup>. Imajući u vidu da je blaga citotoksičnost ovog Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela dostignuta nakon 72 h, to je vreme nakon kog bi trebalo ukloniti, odnosno promeniti oblogu za tretman rane.

Sa druge strane, sistem koji simulira fiziološke uslove u artikularnoj hrskavici (bioreaktor sa dinamičkom kompresijom spregnutom sa perfuzijom simulirane telesne tečnosti) bi odgovarao implantatu mekog tkiva u sinovijalnom zglobu, npr. kolena. Zapremina sinovijalne tečnosti u zdravim humanim zglobovima je u opsegu od 0,5 cm<sup>3</sup> do 2,0 cm<sup>3</sup> [271, 272]. Ipak, kako se sinovijalna tečnost kontinualno izmenjuje trans-sinovijalnim protokom kroz sinovijalne limfne sudove, voda i proteini sinovijalne tečnosti se menjaju u periodu od 2 h ili manje [272]. Na osnovu navedenog, drugi Fikov zakon difuzije se može primeniti za izračunavanje količine srebra otpuštenog iz istog Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela dobijenog iz PVP hidrogela bubrenog u rastvoru AgNO<sub>3</sub> koncentracije 1 mmol dm<sup>-3</sup>, ukoliko bi se potencijalno implantirao u koleno, tokom 2 h potrebnih za potpunu zamenu simulirane telesne tečnosti, odnosno sinovijalne tečnosti. Korišćenjem jednačine (5.3), vrednosti prividnog koeficijenta difuzije od  $2,79 \cdot 10^{-10}$  cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> izračunate za otpuštanje srebra u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom spregnutom sa perfuzijom simulirane telesne tečnosti, i ukupne količine srebra u ovom Ag/PVP nanokompozitnom hidrogelu ( $m_{\infty} = 52,9$  mg dm<sup>-3</sup>), količina srebra otpuštenog nakon 2 h ( $m_t$ ) je

izračunata i iznosi  $0,1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ , odnosno  $0,03 \mu\text{mol dm}^{-3}$ , za zapreminu sinovijalne tečnosti u zdravim humanim zglobovima od  $0,5 \text{ cm}^3$  i  $2 \text{ cm}^3$ , redom. Navedeni rezultati ukazuju da tokom vremena potrebnog za potpunu zamenu sinovijalne tečnosti u zglobu kolena, odnosno za 2 h, koncentracija otpuštenog srebra neće dostići vrednost od  $0,4 \mu\text{mol dm}^{-3}$  za koju je pokazano da ima samo blago citotoksično dejstvo na PBMC. Druga pogodnost koju bi ispoljio implantat Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela je u zadržavanju sterilnosti tokom dužeg vremena.

Predviđanja drugog Fikovog zakona difuzije ukazuju da bi Ag/PVP nanokompozitni hidrogelovi mogli biti primenljivi i kao obloge za tretman rana, i kao implantati za hrskavicu, bez nepovoljnih efekata u odnosu na okolno tkivo.

Modelovanje otpuštanja srebra je omogućilo i poređenje citotoksičnih efekata nanočestica srebra otpuštenih iz Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova i istih uočenih dejstvom  $\text{Ag}^+$  jona iz rastvora  $\text{AgNO}_3$ . Preciznije, blago citotoksično dejstvo je uočeno izlaganjem PBMC prisustvu Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela dobijenog iz PVP hidrogela bubrenog u rastvoru  $\text{AgNO}_3$  koncentracije  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$ , kao i direktnim izlaganjem  $\text{Ag}^+$  jonima u koncentraciji od  $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$  (slike 5.35 i 5.36, redom). Ipak, izračunata koncentracija nanočestica srebra i/ili jona otpuštenih u medijum iz ovog Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela nakon 72 h otpuštanja pri statičkim uslovima iznosi  $0,4 \mu\text{mol dm}^{-3}$ , što je poredivo sa koncentracijom  $\text{Ag}^+$  jona koji su izazvali isti efekat blage citotoksičnosti ( $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ). Ovaj rezultat sugerise da oblik/forma srebra ima mali uticaj na citotoksično dejstvo u odnosu na PBMC. Ipak, srebro u obliku nanočestica, inkorporisano unutar hidrogela, se može kontinualno otpuštati obezbeđujući dugoročnu zaštitu od mikroorganizama. Istovremeno,  $\text{Ag}^+$  joni u rastvorima obezbeđuju zaštitu samo u trenutku primene, s obzirom da telesne tečnosti, kao što je sinovijalna tečnost, saliva i znoj, spiraju strane elemente.



## 6. ZAKLJUČCI

- Elektrohemijском sintezom uspešno su dobijene nanočestice srebra, kako u rastvorima poli(*N*-vinil-2-pirolidona), PVP, i alginata, tako i u PVP hidrogelovima. Optimizacijom je utvrđeno da je za sintezu u rastvoru najefikasniji galvanostatski režim, dok je za dobijanje nanočestica u hidrogelu potrebno vršiti sintezu na konstantnom naponu. Povećanjem gustine struje dobijene su koloidne disperzije sa većom koncentracijom nanočestica; tako je za sintezu nanočestica srebra u rastvoru PVP odabrana gustina struje od 61,7 mA cm<sup>-2</sup>, dok je za sintezu nanočestica srebra u rastvoru alginata odabrana gustina struje od 50 mA cm<sup>-2</sup>. Optimalna vrednost napona za sintezu nanočestica u PVP hidrogelu je bila 200 V.
- Rezultati UV-vidljive spektroskopije pokazuju da su u svim navedenim sistemima dobijene nanočestice srebra. Saglasnost dobijenih spektara sa Lorencovom raspodelom ukazuje na monodisperznost uzoraka.
- TEM analizom je utvrđeno da su sferne čestice dobijene galvanostatskom sintezom u rastvorima PVP i alginata, prečnika oko 75 nm i 30 nm, redom. FE-SEM ispitivanja su pokazala da su u PVP hidrogelu dobijene sferne nanočestice prečnika oko 75 nm. Ispitivanja raspodele veličina čestica u koloidnim disperzijama su potvrdila nalaze mikroskopskih analiza.
- Ciklična voltometrija i FT-IR spektroskopija su potvrdile izbor kako PVP, tako i alginata za elektrohemijску sintezu nanočestica srebra, ukazujući na koordinativno vezivanje između nanočestica srebra i atoma azota i/ili kiseonika iz pirolidonskog prstena PVP, odnosno nanočestica srebra i hidroksilnih i etarskih grupa, kao i atoma kiseonika iz ostataka uronskih kiselina molekula alginata.
- Ag/PVP i Ag/alginatni hidrogelovi, u obliku diska, odnosno mikročestica, su pokazali adekvatna mehanička svojstva u bioreaktorskim uslovima. Rezultati ukazuju da nanočestice srebra verovatno utiču na veće zadržavanje vode unutar hidrogelova u dinamičkim uslovima, što dovodi do blagog povećanja modula elastičnosti. Upotreba Ag/PVP

nanokompozitnog hidrogela u medicini je obećavajuća, s obzirom da vrednosti Jangovog modula odgovaraju vrednostima potrebnim za primenu hidrogelova kao obloga za rane. Sa druge strane, nanočestice srebra blago narušavaju strukturu Ag/alginatnog hidrogela. Naime, s obzirom da se Ag/alginatni hidrogel dobija umrežavanjem koloidne disperzije, prisustvo nanočestica srebra u koloidnoj disperziji Ag/alginata onemogućava umrežavanje molekula alginata na svim mogućim mestima vezivanja usled koordinativnog vezivanja sa nanočesticama srebra, kao i usled sternih smetnji koje same nanočestice izazivaju (što nije slučaj kod Ag/PVP nanokompozita, jer se nanočestice formiraju *in situ* u već formiranom PVP hidrogelu). Ipak, smanjenje vrednosti ravnotežnog modula elastičnosti od ~20 % ne umanjuje mogućnost primene Ag/alginatnih mikročestica u tkivnom inženjerstvu. Rezultati analize sorpcionih karakteristika su u saglasnosti sa blagim razlikama u biomehaničkim karakteristikama PVP hidrogela i Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela.

- Rezultati ispitivanja citotoksičnosti Ag/PVP i Ag/alginatnih nanokompozitnih hidrogelova pokazali su uticaj koncentracije AgNO<sub>3</sub> u polaznim rastvorima za bubrenje, odnosno sintezu na citotoksičnost uzoraka. Utvrđeno je da nanokompoziti dobijeni iz polaznog rastvora koncentracije 1 mmol dm<sup>-3</sup> pokazuju samo blago toksično dejstvo prema PBMC ćelijama. Istovremeno, navedeni Ag/PVP nanokompoziti zadržavaju antibakterijsko dejstvo prema *Staphylococcus aureus*.
- Otpuštanje srebra je rađeno u različitim hidrodinamičkim uslovima, statički, u perfuzionom bioreктору, i u bioreктору sa dinamičkom kompresijom spregnutom sa perfuzijom simulirane telesne tečnosti. Utvrđeno je da hidrodinamički uslovi nemaju presudan značaj za dinamiku otpuštanja, i da je u svim sistemima dominantni način prenosa mase difuzija.
- Rezultati ispitivanja citotoksičnosti i otpuštanja srebra su modelovani drugim Fikovim zakonom difuzije, u cilju predviđanja performansi i moguće dužine primene Ag/PVP nanokompozitnih hidrogelova u različitim sredinama. Naime, pokazano je da je optimalno vreme primene

Ag/PVP nanokompozitnog hidrogela dobijenog iz PVP hidrogela bubrenog u rastvoru 1 mM AgNO<sub>3</sub>, u vidu obloge za tretman rane 72 h (primena u statičkim uslovima). Sa druge strane, primenom drugog Fikovog zakona difuzije pokazano je da tokom vremena potrebnog za potpunu zamenu sinovijalne tečnosti u zglobu kolena (2 h) koncentracija otpuštenog srebra neće dostići vrednost za koju je pokazano da ima samo blago citotoksično dejstvo na PBMC (primena u dinamičkim uslovima, u obliku implantata mekog tkiva u sinovijalnom zglobu).

- Navedeni rezultati ukazuju da bi Ag/PVP nanokompozitni hidrogelovi mogli biti primenljivi i kao obloge za tretman rana, i kao implantati za hrskavicu, bez nepovoljnih efekata u odnosu na okolno tkivo. Kako se Ag/alginatne mikročestice mogu koristiti u inženjerstvu tkiva, rezultat ove doktorske disertacije predstavljaju obećavajući biokompatibilni materijali na bazi nanočestica srebra i polimera čiji potencijal primene treba istražiti i u *in vivo* uslovima.

## 7. LITERATURA

- [1] K. Vasilev, V.R. Sah, R.V. Goreham, C. Ndi, R.D. Short, H.J. Griesser, *Nanotechnology*, **21** (2010) 215102.
- [2] I. Freestone, N. Meeks, M. Sax, C. Higgitt, *Gold Bull.* **40** (2007) 270.
- [3] R.D. Glover, J.M. Miller, J.E. Hutchison, *ACS Nano*, **5** (2011) 8950.
- [4] R. Bhattacharya, P. Mukherjee, *Adv. Drug. Deliver. Rev.* **60** (2008) 1289.
- [5] Z.M. Xiu, Q.B. Zhang, H.L. Puppala, V.L. Colvin, P.J. Alvarez, *Nano Lett.* **12** (2012) 4271.
- [6] T. Silva, L.R. Pokhrel, B. Dubey, T.M. Tolaymat, K.J. Maier, X. Liud, *Sci. Total. Environ.* **468–469** (2014) 968.
- [7] Q.H. Tran, V.Q. Nguyen, A.-T. Le, *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* **4** (2013) 033001.
- [8] F. Furno, K.S. Morley, B. Wong, B.L. Sharp, P.L. Arnold, S.M. Howdle, R. Bayston, P.D. Brown, P.D. Winship, H.J. Reid, *J. Antimicrob. Chemoth.* **54** (2004) 1019.
- [9] M. Ip, S.L. Lui, V.K. Poon, I. Lung, A. Burd, *J. Med. Microbiol.* **55** (2006) 59.
- [10] D.J. Leaper, *Int. Wound J.* **3** (2006) 282.
- [11] Y. Li, P. Leung, L. Yao, Q.W. Song, E. Newton, *J. Hosp. Infect.* **62** (2006) 58.
- [12] Grupa autora, Antibiotic resistance threats in the United States, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2013.
- [13] T. Kirby, *Lancet Infect. Dis.* **15** (2015) 271.
- [14] L.L. Ling, T. Schneider, A.J. Peoples, A.L. Spoering, I. Engels, B.P. Conlon, A. Mueller, T.F. Schäberle, D.E. Hughes, S. Epstein, M. Jones, L. Lazarides, V.A. Steadman, D.R. Cohen, C.R. Felix, K.A. Fetterman, W.P. Millett, A.G. Nitti, A.M. Zullo, C. Chen, K. Lewis, *Nature*, **517** (2015) 455.
- [15] A.J. Huh, Y.J. Kwon, *J. Controll. Release*, **156** (2011) 128.
- [16] R.Y. Pelgrift, A.J. Friedman, *Adv. Drug. Deliver. Rev.* **65** (2013) 1803.
- [17] J.-Y. Maillard, P. Hartemann, *Crit. Rev. Microbiol.* **39** (2013) 373.
- [18] E.M. Hotze, T. Phenrat, G.V. Lowry, *J. Environ. Qual.* **39** (2010) 1909.
- [19] T. Phenrat, N. Saleh, K. Sirk, H. Kim, R.D. Tilton, G.V. Lowry, *J. Nanopart. Res.* **10** (2008) 795.

- [20] K. Šišková, O. Bečička, V. Mašek, K. Šafářová, R. Zbořil, *J. Raman. Spectrosc.* **43** (2012) 689.
- [21] C.-N. Lok, C.-M. Ho, R. Chen, Q.-Y. He, W.-Y. Yu, H. Sun, P. K.-H. Tam, J.-F. Chiu, C.-M. Che, *J. Biol. Inorg. Chem.* **12** (2007) 527.
- [22] V. Alt, T. Bechert, P. Steinrücke, M. Wagener, P. Seidel, E. Dingeldein, E. Domann, R. Schnettler, *Biomaterials*, **25** (2004) 4383.
- [23] C.A. Dos Santos, M. Martins Seckler, A.P. Ingle, I. Gupta, S. Galdiero, M. Galdiero, A. Gade, M. Rai, *J. Pharmacol. Sci.* **103** (2014) 1931.
- [24] C. Beer, R. Foldbjerg, Y. Hayashi, D.S. Sutherland, H. Autrup, *Toxicol. Lett.* **208** (2012) 286.
- [25] N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50** (2000) 27.
- [26] C. Georgea, S. Kuriakosea, S. Georgea, T. Mathew, *Supramol. Chem.* **23** (2011) 593.
- [27] G.A. Gaddy, A.S. Korchev, J.L. McLain, B.L. Slaten, E.S. Steigerwalt, G. Mills, *J. Phys. Chem. B*, **108** (2004) 14850.
- [28] B.S. Yin, H.Y. Ma, S.Y. Wang, S.H. Chen, *J. Phys. Chem. B*, **107** (2003) 8898.
- [29] L. Rodrigues-Sanchez, M.C. Blanco, M.A. Lopez-Quintela, *J. Phys. Chem. B*, **104** (2000) 9683.
- [30] L. Wei, J. Lu, H. Xu, A. Patel, Z.-S. Chen, G. Chen, *Drug Discov. Today*, **20** (2015) 595.
- [31] M. Naffakh, A.M. Díez-Pascual, C. Marco, G.J. Ellis, M.A. Gómez-Fatou, *Prog. Polym. Sci.* **38** (2013) 1163.
- [32] A. Okada, Y. Fukushima, M. Kawasumi, S. Inagaki, Usuki, S. Sugiyama, T. Kurauchi, O. Kamigatio, inventors, Toyota Motor Co. Japan, assignee. Composite Material and Process for Manufacturing Same. United States patent US4739007, 1988 Apr 19.
- [33] E.P. Giannelis, *Adv. Mater.* **8** (1996) 29.
- [34] M. Alexandre, P. Dubois, *Mater. Sci. Eng.* **28** (2000) 1.
- [35] C. Sanchez, B. Julián, P. Belleville, M. Popall, *J. Mater. Chem.* **15** (2005) 3559.
- [36] S. Pavlidou, C.D. Papaspyrides, *Prog. Polym. Sci.* **33** (2008) 1119.

- [37] M. Naffakh, A.M. Díez-Pascual, C. Marco, G.J. Ellis, M.A. Gómez-Fatou, *Prog. Polym. Sci.* **38** (2013) 1163.
- [38] B.A. Rozenberg, R. Tenne, *Prog. Polym. Sci.* **33** (2008) 40.
- [39] S. Guo, S. Dong, *J. Mater. Chem.* **21** (2011) 16704.
- [40] M.Y. Wei, R. Huang, L.H. Guo, *J. Electroanal. Chem.* **664** (2012) 156.
- [41] P. Pascariu, A. Airinei, M. Grigoras, L. Vacareanu, F. Iacomi, *Appl. Surf. Sci.* 2015, doi:10.1016/j.apsusc.2015.03.063.
- [42] A.A. Rogachev, M.A. Yarmolenko, X. Jiang, A.V. Rogachev, R. Shen, Z. Yingjie, *Prog. Org. Coat.* **81** (2015) 80.
- [43] R. Francis, D.K. Baby, Y. Gnanou, *J. Colloid Interf. Sci.* **438** (2015) 110.
- [44] D. Ghosh, N. Chattopadhyay, *J. Lumin.* **160** (2015) 223.
- [45] M.M. Dell'Anna, V.F. Capodiferro, M. Mali, D. Manno, P. Cotugno, A. Monopoli, P. Mastroilli, *Appl. Catal. A-Gen.* **481** (2014) 89.
- [46] M.K. Temgire, S.S. Joshi, *Radiat. Phys. Chem.* **71** (2004) 1039.
- [47] B. Karthikeyan, *Physica B*, **364** (2005) 328.
- [48] A. Henglein, *Langmuir*, **15** (1999) 6738.
- [49] P.K. Khanna, R. Gokhale, V.V.V.S. Subbarao, A.K. Vishwanath, B.K. Das, C.V.V. Satyanarayana, *Mater. Chem. Phys.* **92** (2005) 229.
- [50] S. Link, M. A. El-Sayed, *Int. Rev. Phys. Chem.* **19** (2000) 409.
- [51] L.M. Liz-Marzan, *Mater. Today*, **7** (2004) 26.
- [52] A. Arbouet, D. Christofilos, N. Del Fatti, F. Vallée, J. R. Huntzinger, L. Arnaud, P. Billaud, M. Broyer, *Phys. Rev. Lett.* **93** (2004) 127401.
- [53] S. Pourbeyram, S. Mohammadi, *J. Non-Cryst. Solids*, **402** (2014) 58.
- [54] P.S. da Silva, B.C. Gasparini, H.A. Magosso, A. Spinelli, *J. Hazard. Mater.* **273** (2014) 70.
- [55] Y. Sun, *Chem. Soc. Rev.* **42** (2013) 2497.
- [56] V.V. Yanilkin, G.R. Nasretdinova, Y.N. Osin, V.V. Salnikov, *Electrochim. Acta*, **168** (2015) 82.
- [57] A.T. Ezhil Vilian, M. Rajkumar, S.-M. Chen, *Colloid. Surface B*, **115** (2014) 295.
- [58] N.A. Khan, S.H. Jhung, *Coordin. Chem. Rev.* **285** (2015) 11.
- [59] Md. Abdul Matin, J.-H. Jang, Y.-U. Kwon, *Int. J. Hydrogen Energ.* **39** (2014) 3710.

- [60] A.S. Singh, U.B. Patil, J.M. Nagarkar, *Catal. Commun.* **35** (2013) 11.
- [61] Q. Yu, A. Fu, H. Li, H. Liu, R. Lv, J. Liu, P. Guo, X.S. Zhao, *Colloid. Surface A*, **457** (2014) 288.
- [62] D. Yingnan, Y. Xikun, L. Shanshan, B. Xiaoguo, T. Meiling, *Rare Metal Mat. Eng.* **43** (2014) 2985.
- [63] H.-H. Zhang, B. Liu, J. Wang, K. Feng, B. Chen, C.-H. Tung, L.-Z. Wu, *Tetrahedron*, **70** (2014) 6188.
- [64] F. Lu, S. Zhou, J.-J. Zhu, *Int. J. Hydrogen Energ.* **38** (2013) 13055.
- [65] X. Zhao, Y. Xia, Q. Li, X. Ma, F. Quan, C. Geng, Z. Han, *Colloid. Surface A*, **444** (2014) 180.
- [66] K.D.N. Vo, C. Kowandy, L. Dupont, X. Coqueret, N. Q. Hien, *Radiat. Phys. Chem.* **94** (2014) 84.
- [67] N. Hanžić, T. Jurkin, A. Maksimović, M. Gotić, *Radiat. Phys. Chem.* **106** (2015) 77.
- [68] Y.S. Soliman, *Radiat. Phys. Chem.* **102** (2014) 60.
- [69] M.N. Boroumand, M. Montazer, F. Simon, J. Liesiene, Z. Šaponjic, V. Dutschk, *Appl. Surf. Sci.* **346** (2015) 477.
- [70] T.S. Dhas, V.G. Kumar, V. Karthick, K. Govindaraju, T.S. Narayana, *Spectrochim. Acta A*, **133** (2014) 102.
- [71] S. Chairam, E. Somsook, *J. Magn. Magn. Mater.* **320** (2008) 2039.
- [72] C.C. Berry, S. Wells, S. Charles, A.S.G. Curtis, *Biomaterials*, **24** (2003) 4551.
- [73] J.H. Park, K.H. Im, S.H. Lee, D.H. Kim, D.Y. Lee, Y.K. Lee, K.M. Kim, K.N. Kim, *J. Magn. Magn. Mater.* **293** (2005) 328.
- [74] P. Stasica, J.M. Rosiak, M. Ciach, M. Radek, *Eng. Biomater.* **3** (2000) 9.
- [75] D. Darwis, P. Stasica, M.T. Razzak, J.M. Rosiak, *Radiat. Phys. Chem.* **63** (2002) 539.
- [76] V. Olivier, C. Rivière, M. Hindié, J.-L. Duval, G. Bomila-Koradjim, M.-D. Nagel, *Colloid. Surface B*, **33** (2004) 23.
- [77] H.-M. Han, G.J. Phillips, S.V. Mikhailovsky, A.W. Lloyd, *New Carbon Mater.* **23** (2008) 139.
- [78] H.J. Johnston, G. Hutchison, F.M. Christensen, S. Peters, S. Hankin, V. Stone, *Crit. Rev. Toxicol.* **40** (2010) 328.

- [79] M. Rycenga, C.M. Cobley, J. Zeng, W. Li, C.H. Moran, Q. Zhang, D. Qin, Y. Xia, *Chem. Rev.* **111** (2011) 3669.
- [80] A.R. Badireddy, I.T. Ryde, F.J. Seidler, T.A. Slotkin, *Environ. Health Persp.* **119** (2011) 37.
- [81] S. Kim, Ji.E. Choi, J. Choi, K.-H. Chung, K. Park, J. Yi, D.-Y. Ryu, *Toxicol. in Vitro*, **23** (2009) 1076.
- [82] V.K. Sharma, K.M. Siskova, R. Zboril, J.L. Gardea-Torresdey, *Adv. Colloid Interfac.* **204** (2014) 15.
- [83] H. Zhang, J.A. Smith, V. Oyanedel-Craver, *Water Res.* **46** (2012) 691.
- [84] H.H. Huang, X.P. Ni, G.L. Loy, C.H. Chew, K.L. Tan, F.C. Loh, J.F. Deng, G.Q. Xu, *Langmuir*, **12** (1996) 909.
- [85] S.K. Misra, A. Dybowska, D. Berhanu, S.N. Luoma, E. Valsami-Jones, *Sci. Total Environ.* **438** (2012) 225.
- [86] J. Dobias, R. Bernier-Latmani, *Environ. Sci. Technol.* **47** (2013) 4140.
- [87] M.T. Reetz, W. Helbig, *J. Am. Chem. Soc.* **116** (1994) 1401.
- [88] M. Starowicz, B. Stypuła, J. Banaś, *Electrochem. Commun.* **8** (2006) 227.
- [89] M.K. Rabinal, M.N. Kalasad, K. Praveenkumar, V.R. Bharadi, A.M. Bhikshavartimath, *J. Alloy. Compd.* **562** (2013) 43.
- [90] G.R. Nasretdinova, R.R. Fazleeva, R.K. Mukhitova, I.R. Nizameev, M.K. Kadirov, A.Y. Ziganshina, V.V. Yanilkin, *Electrochem. Commun.* **50** (2015) 69.
- [91] Y. Xiang, D. Chen, *Eur. Polym. J.* **43** (2007) 4178.
- [92] V. Thomas, M.M. Yallapu, B. Sreedhar, S.K. Bajpai, *J. Colloid Interf. Sci.* **315** (2007) 389.
- [93] J. Zhu, X. Liao, H.-Y. Chen, *Mater. Res. Bull.* **36** (2001) 1687.
- [94] H. Jiang, K. Moon, Z. Zhang, S. Pothukuchi, C.P. Wong, *J. Nanopart. Res.* **8** (2006) 117.
- [95] S. Mukherjee, D. Chowdhury, R. Kotcherlakota, S. Patra, B. Vinothkumar, M.P. Bhadra, B. Sreedhar, C.R. Patra, *Theranostics*, **4** (2014) 316.
- [96] V.L. Das, R. Thomas, R.T. Varghese, E.V. Soniya, J. Mathew, E.K. Radhakrishnan, *3 Biotech*, **4** (2014) 121.
- [97] S. Prakash, T. Chakrabarty, A.K. Singh, V.K. Shahi, *Biosens. Bioelectron.* **41** (2013) 43.



- [98] M. Cochet, W.K. Maser, A.M. Benito, M.A. Callejas, M.T. Martínez, J.-M. Benoit, J. Schreiber, O. Chauvet, *Chem. Commun.* **16** (2001) 1450.
- [99] A. Henglein, *J. Phys. Chem.* **97** (1993) 5457.
- [100] K. Esumi, A. Suzuki, N. Aihara, K. Usui, K. Torigoe, *Langmuir*, **14** (1998) 3157.
- [101] P.L. Kuo, W.F. Chen, *J. Phys. Chem. B*, **107** (2003) 11267.
- [102] H. Huang, X. Yang, *Carbohydr. Res.* **339** (2004) 2627.
- [103] M. Zhou, S. Chen, S. Zhao, H. Ma, *Physica E*, **33** (2006) 28.
- [104] H.H. Zhou, X.H. Ning, S.L. Li, J.H. Chen, Y. F. Kuang, *Thin Solid Films*, **510** (2006) 164.
- [105] N. Cioffi, L. Torsi, L. Sabbatini, P.G. Zambonin, T. Bleve-Zacheo, *J. Electroanal. Chem.* **488** (2000) 42.
- [106] M.T. Reetz, W. Helbig, S.A. Quaiser, U. Stimming, N. Breuer, R. Vogel, *Science*, **267** (1995) 367.
- [107] M.L. Rodríguez-Sánchez, M. J. Rodríguez, M. C. Blanco, J. Rivas, M. A. López-Quintela, *J. Phys. Chem. B*, **109** (2005) 1183.
- [108] H.L. Abd El-Mohdy, E.A. Hegazy, E.M. El-Nesr, M.A. El-Wahab, *J. Environ. Chem. Eng.* **1** (2013) 328.
- [109] A. Krklješ, J.M. Nedeljković, Z.M. Kačarević-Popović, *Polym. Bull.* **58** (2007) 271.
- [110] Z. Kačarević-Popović, S. Tomić, A. Krklješ, M. Mičić, E. Suljovrujić, *Radiat. Phys. Chem.* **76** (2007) 1333.
- [111] T.H. Kim, D.B. An, S.H. Oh, M.K. Kang, H.H. Song, J.H. Lee, *Biomaterials*, **40** (2015) 51.
- [112] M. Wong, u: A.P. Hollander, P.V. Hatton (Eds.), *Methods in molecular biology. Biopolymer methods in tissue engineering*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2004, p. 77-86.
- [113] J. Fidalgo, A.M. Mendes, F.D. Magalhães, *Eur. Polym. J.* **58** (2014) 173.
- [114] Y. Zhao, Y. Zhou, X. Wu, L. Wang, L. Xu, S. Wei, *Appl. Surf. Sci.* **258** (2012) 8867.
- [115] T.L. Yang, C.T. Pan, Y.C. Chen, L.W. Lin, I.C. Wu, K.H. Hung, Y.R. Lin, H.L. Huang, C.F. Liu, S.W. Mao, S.W. Kuo, *Opt. Mater.* **39** (2015) 118.

- [116] M.T. Reetz, M. Winter, R. Breinbauer, T. Thurn-Albrecht, W. Vogel, *Chem. Eur. J.* **7** (2000) 1084.
- [117] V.B. Mišković-Stanković, *Organske zaštitne prevlake*, SITZAMS, Beograd, 2001.
- [118] A. Biffis, N. Orlandi, B. Corain, *Adv. Mater.* **15** (2003) 1551.
- [119] H. Hezaveh, I.I. Muhamad, *Carbohydr. Polym.* **89** (2012) 138.
- [120] Y.M. Mohan, K. Lee, T. Premkumar, K.E. Geckeler, *Polymer*, **48** (2007) 158.
- [121] J. Zhang, S. Xu, E. Kumacheva, *Adv. Mater.* **17** (2005), p. 2336.
- [122] I. Sondi, B. Salopek-Sondi, *J. Colloid Interf. Sci.* **275** (2004) 177.
- [123] D. Wei, W. Sun, W. Qian, Y. Ye, X. Ma, *Carbohydr. Res.* **344** (2009) 2375.
- [124] M. Chen, Z. Yang, H. Wu, X. Pan, X. Xie, C. Wu, *Int. J. Nanomed.* **6** (2011) 2873.
- [125] K. Kalishwaralal, S. Barath-Manikanth, S.R. Pandian, V. Deepak, S. Gurunathan, *Colloid. Surface B*, **79** (2010) 340.
- [126] H.H. Lara, N.V. Ayala-Núñez, L.D.C. Ixtapan Turrent, C. Rodríguez Padilla, *World J. Microb. Biot.* **26** (2010) 615.
- [127] M.B. Gajbhiye, J.G. Kesharwani, A.P. Ingle, A.K. Gade, M.K. Rai, *Nanomed-Nanotechnol.* **5** (2009) 282.
- [128] S. Roy, T. Mukherjee, S. Chakraborty, T.K. Das, *Dig. J. Nanomat. Bios.* **8** (2013) 197.
- [129] M. Rajarathinam, P.T. Kalaichelvan, *Int. Res. J. Pharm.* **4** (2013) 68.
- [130] J.L. Elechiguerra, J.L. Burt, J.R. Morones, A. Camacho-Bragado, X. Gao, H.H. Lara, M.J. Yacaman, *J. Nanobiotechnol.* **3** (2005) 6.
- [131] L. Lu, R.W. Sun, R. Chen, C.K. Hui, C.M. Ho, J.M. Luk, G.K. Lau, C.M. Che, *Antivir. Ther.* **13** (2008) 253.
- [132] K. Blecher, A. Nasir, A. Friedman, *Virulence*, **2** (2011) 395.
- [133] M.L. Knetsch, L.H. Koole, *Polymers*, **3** (2011) 340.
- [134] C.A. Santos, A.F. Jozala, A. Pessoa Jr, M. Seckler, *J. Nanobiotechnol.* **10** (2012) 1.
- [135] C.A. Dos Santos, M.C. Knirsch, G. Borghesan, A. Pessoa Jr, T.C.V. Penna, *J. Pharm. Sci.* **100** (2011) 715.
- [136] S. Pal, Y.K. Tak, J.M. Song, *Appl. Environ. Microb.* **73** (2007) 1712.

- [137] S. Shrivastava, T. Bera, A. Roy, G. Singh, P. Ramchandrarao, D. Dash, *Nanotechnology*, **18** (2007) 225103.
- [138] J.S. Kim, E. Kuk, K.N. Yu, J.H. Kim, S.J. Park, H.J. Lee, S.H. Kim, Y.K. Park, Y.H. Park, C.Y. Hwang, Y.K. Kim, Y.S. Lee, D.H. Jeong, M.H. Cho, *Nanomedicine*, **3** (2007) 95.
- [139] K. Shameli, M.B. Ahmad, S.D. Jazayeri, P. Shabanzadeh, P. Sangpour, H. Jahangirian, Y. Gharayebi, *Chem. Cent. J.* **6** (2012) 73.
- [140] K.M. Hindi, A.J. Ditto, M.J. Panzner, D.A. Medvetz, D.S. Han, C.E. Hovis, J.K. Hilliard, J.B. Taylor, H.Y. Yang, C.L. Cannon, W.J. Youngs, *Biomaterials*, **30** (2009) 3771.
- [141] L. Huang, T. Dai, Y. Xuan, G.P. Tegos, M.R. Hamblin, *Antimicrob. Agents Ch.* **55** (2011) 3432.
- [142] S. Prabhu, E.K. Poulouse, *Int. Nano Lett.* **2** (2012) 32.
- [143] R. Foldbjerg, P. Olesen, M. Hougaard, D.A. Dang, H.J. Hoffmann, H. Autrup, *Toxicol. Lett.* **190** (2009) 156.
- [144] M.J. Piao, K.A. Kang, I.K. Lee, H.S. Kim, S. Kim, J.Y. Choi, J. Choi, J.W. Hyun, *Toxicol. Lett.* **201** (2011) 92.
- [145] A.D. Maynard, R.J. Aitken, T. Butz, V. Colvin, K. Donaldson, G. Oberdorster, M.A. Philbert, J. Ryan, A. Seaton, V. Stone, S.S. Tinkle, N.J. Walker, D.B. Warheit, *Nature*, **444** (2006) 267.
- [146] V. Castranova, *J. Occup. Environ. Med.* **53** (2011) 14.
- [147] A.M. Schrand, M.F. Rahman, S.M. Hussain, J.J. Schlager, D.A. Smith, A.F. Syed, *Wires. Nanomed. Nanobi.* **2** (2010) 544.
- [148] X. Chen, H.J. Schluesener, *Toxicol. Lett.* **176** (2008) 1.
- [149] International consensus. Appropriate use of silver dressings in wounds. An expert working group consensus. London: Wounds International, 2012.
- [150] EFSA Scientific Committee, Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain, *EFSA Journal*, **9** (2011) 2140.
- [151] S. Gurunathan, K.-J. Lee, K. Kalishwaralal, S. Sheikpranbabu, R. Vaidyanathan, S. H. Eom, *Biomaterials*, **30** (2009) 6341.
- [152] D. Guo, L. Zhu, Z. Huang, H. Zhou, Y. Ge, W. Ma, J. Wu, X. Zhang, X. Zhou, Y. Zhang, Y. Zhao, N. Gu, *Biomaterials*, **34** (2013) 7884.

- [153] D. Guo, Y. Zhao, Y. Zhang, Q. Wang, Z. Huang, Q. Ding, Z. Guo, X. Zhou, L. Zhu, N. Gu, *J. Biomed. Nanotechnol.* **10** (2014) 669.
- [154] M.A. Franco-Molina, E. Mendoza-Gamboa, C.A. Sierra-Rivera, R.A. Gómez-Flores, P. Zapata-Benavides, P. Castillo-Tello, J.M. Alcocer-González, D.F. Miranda-Hernández, R.S. Tamez-Guerra, C. Rodríguez-Padilla, *J. Exp. Clin. Canc. Res.* **29** (2010) 148.
- [155] S. Gurunathan, J.W. Han, V. Eppakayala, M. Jeyaraj, J.-H. Kim, *Biomed. Res. Int.* **2013** (2013) 535796.
- [156] S. Gurunathan, J. Raman, S.N. Abd Malek, P.A. John, S. Vikineswary, *Int. J. Nanomed.* **8** (2013) 4399.
- [157] S.C. Sahu, J. Zheng, L. Graham, L. Chen, J. Ihrle, J.J. Yourick, R.L. Sprando, *J. Appl. Toxicol.* **34** (2014) 1155.
- [158] R. Foldbjerg, D.A. Dang, H. Autrup, *Arch. Toxicol.* **85** (2011) 743.
- [159] S. Nazir, T. Hussain, M. Iqbal, K. Mazhar , A.G. Muazzam, M. Ismail, *J. BioSci. Technol.* **2** (2011) 425.
- [160] P. Chairuangkitti, S. Lawanprasert, S. Roytrakul, S. Aueviriyavit, D. Phummiratch, K. Kulthong, P. Chanvorachote, R. Maniratanachote, *Toxicol. in Vitro*, **27** (2013) 330.
- [161] D.L. Kaplan, *Biopolymers from Renewable Resources*. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin; 1998.
- [162] K. Vimala, K.S. Sivudu, Y.M. Mohan, B. Sreedhar, K. Raju, *Carbohydr. Polym.* **75** (2009) 463.
- [163] H. Kong, J. Jang, *Langmuir*, **24** (2008) 2051.
- [164] M.N. Nadagouda, R.S. Varma, *Biomacromolecules*, **8** (2007) 2762.
- [165] D. Klemm, B. Heublein, H. Fink, A. Bohn, *Angew. Chem. Int. Edit.* **44** (2005) 2.
- [166] P. Dallas, V.K. Sharma, R. Zboril, *Adv. Colloid Interfac.* **166** (2011) 119.
- [167] I. Donati, S. Stredanska, G. Silvestrini, A. Vetere, P. Marcon, E. Marsich, P. Mozetic, A. Gamini, S. Paoletti, F. Vittur, *Biomaterials*, **26** (2005) 987.
- [168] A. Travan, C. Pelillo, I. Donati, E. Marsich, M. Benincasa, T. Scarpa, S. Semeraro, G. Turco, R. Gennaro, S. Paoletti, *Biomacromolecules*, **10** (2009) 1429.

- [169] R.J.P. Pinto, P.A.A.P. Marques, C.P. Neto, T. Trindade, S. Daina, P. Sadocco, *Acta Biomater.* **5** (2009) 2279.
- [170] J.W. Kim, J.E. Lee, J.H. Ryu, J.S. Lee, S.J. Kim, S.H. Han, I.S. Chang, H.H. Kang, K.D. Suh, *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **42** (2004) 2551.
- [171] R.P. Chahal, S. Mahendia, A.K. Tomar, S. Kumar, *Appl. Surf. Sci.* **343** (2015) 160.
- [172] J. Krstić, J. Spasojević, A. Radosavljević, M. Šiljegović, Z. Kačarević-Popović, *Radiat. Phys. Chem.* **96** (2014) 158.
- [173] I.M. Martinez Paino, V. Zucolotto, *Environ. Toxicol. Pharm.* **39** (2015) 614.
- [174] D. Archana, B.K. Singh, J. Dutta, P.K. Dutta, *Int. J. Biol. Macromol.* **73** (2015) 49.
- [175] S. Benamer, M. Mahlous, A. Boukrif, B. Mansouri, S. Larbi Youcef, *Nucl. Instrum. Meth. B*, **248** (2006) 284.
- [176] J. Maitra, V.K. Shukla, *Am. J. Polym. Sci.* **4** (2014) 25.
- [177] K.R. Park, Y.Ch. Nho, *J. Appl. Polym. Sci.* **91** (2003) 1612.
- [178] M.T. Nickerson, A.T. Paulson, E. Wagar, R. Farnworth, S.M. Hodge, D. Rousseau, *Food Hydrocolloid.* **20** (2006) 1072.
- [179] V. Rattanaruengsrikul, N. Pimpha, P. Supaphol, *Macromol. Biosci.* **9** (2009) 1004.
- [180] Z.Q. Gu, J.M. Xiao, X.H. Zhang, *Biomed. Mater. Eng.* **8** (1998) 75.
- [181] V.R. Patel, M.M. Amiji, *Pharm. Res.* **13** (1996) 588.
- [182] V.R. Sinha, L. Khosla, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **24** (1998) 1129.
- [183] R. Babu, J. Zhang, E.J. Beckman, M. Virji, W.A. Pasculle, A. Wells, *Biomaterials*, **27** (2006) 4304.
- [184] M.T. Razzak, E. Zainuddin, S. Dewi, H. Lely, S. Taty, *Radiat. Phys. Chem.* **55** (1999) 153.
- [185] Z. Ajjji, I. Othman, J.M. Rosiak, *Nucl. Instrum. Meth. B*, **229** (2005) 375.
- [186] V. Zamora-Mora, D. Velasco, R. Hernández, C. Mijangos, E. Kumacheva, *Carbohydr. Polym.* **111** (2014) 348.
- [187] T. Still, K. Chen, A.M. Alsayed, K.B. Aptowicz, A.G. Yodh, *J. Colloid Interf. Sci.* **405** (2013) 96.
- [188] A. Saulis, T.A. Mustoe, *Ann. Surg.* **234** (2001) 857.

- [189] B. Boonkaew, M. Kempf, R. Kimble, P. Supaphol, L. Cuttle, *Burns*, **40** (2014) 89.
- [190] A. Das, A. Kumar, N.B. Patil, C. Viswanathan, D. Ghosh, *Carbohydr. Polym.* **130** (2015) 254.
- [191] G. Gainza, S. Villullas, J.L. Pedraz, R.M. Hernandez, M. Igartua, *Nanomed-Nanotechnol.* **11** (2015) 1551.
- [192] C.M. Robson, D.L. Steed, J.M. McPherson, B.M. Prat, *J. Appl. Res. Clin. Exp. Ther.* **2** (2010) 215.
- [193] S. Anandhakumar, V. Mahalakshmi, A.M. Raichur, *Mat. Sci. Eng. C-Bio. S.* **32** (2012) 2349.
- [194] M. Yadollahi, S. Farhoudian, H. Namazia, *Int. J. Biol. Macromol.* **79** (2015) 37.
- [195] M. Hamidi, A. Azadi, P. Rafiei, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **60** (2008) 1638.
- [196] C.M.A. Lopes, M.I. Felisberti, *Biomaterials*, **24** (2003) 1279.
- [197] J.M. Rosiak, J. Olejniczak, W. Pekala, *Radiat. Phys. Chem.* **36** (1990) 747.
- [198] J.M. Rosiak, J. Olejniczak, *Radiat. Phys. Chem.* **42** (1993) 903.
- [199] D. Darwis, N. Hilmy, L. Hardiningsih, T. Erlinda, *Radiat. Phys. Chem.* **42** (1993) 907.
- [200] T.P. Davis, M.B. Huglin, *Makromol. Chem.* **191** (1990) 331.
- [201] A. Joshi, G. Fussell, J. Thomas, A. Hsuan, A. Lowman, A. Karduna, E. Vresilovic, M. Marcolongo, *Biomaterials*, **27** (2006) 176.
- [202] Y. Wang, Y. Li, S. Yang, G. Zhang, D. An, CeWang, Q. Yang, X. Chen, X. Jing, Y. Wei, *Nanotechnology*, **17** (2006) 3304.
- [203] X. Wang, H. Itoh, K. Naka, Y. Chujo, *Langmuir*, **19** (2003) 6242.
- [204] M. Eid, M. B. El-Arnaouty, M. Salah, El-Sayed Soliman, El-Sayed A. Hegazy, *J. Polym. Res.* **19** (2012) 9835.
- [205] H. Yu, X. Xu, X. Chen, T. Lu, P. Zhang, X. Jing, *J. Appl. Polym. Sci.* **103** (2007) 125.
- [206] Y. Ding, J. Gao, X. Yang, J. He, Z. Zhou, Y. Hu, *Adv. Powder Technol.* **25** (2014) 244.
- [207] A.D. Baldwin, K.L. Kiick, *Pept. Sci.* **94** (2010) 128.
- [208] H.H. Tonnesen, J. Karlsen, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **28** (2002) 621.
- [209] O. Smidsrød, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **57** (1974) 263.

- [210] B. Thu, P. Bruheim, T. Espevik, O. Smidsrød, P. Soon-Shiong, G. Skjåk-Bræk, *Biomaterials*, **17** (1996) 1031.
- [211] A. Martinsen, G. Skjåk-Bræk, O. Smidsrød, *Biotechnol. Bioeng.* **33** (1989) 79.
- [212] J.L. Drury, D.J. Mooney, *Biomaterials*, **24** (2003) 4337.
- [213] F. Flores Céspedes, S. Pérez García, M. Villafranca Sánchez, M. Fernández Pérez, *Chemosphere*, **92** (2013) 918.
- [214] O. Gåserød, O. Smidsrød, G. Skjåk-Bræk, *Biomaterials*, **19** (1998) 1815.
- [215] J. Heller, R.F. Helwing, R.W. Baker, M.E. Tuttl, *Biomaterials*, **4** (1983) 262.
- [216] M.S. Shoichet, R.H. Li, M.L. White, S.R. Winn, *Biotechnol. Bioeng.* **50** (1996) 374.
- [217] H. Ramdi, C. Legay, M. Lièvreumont, *Exp. Cell Res.* **207** (1993) 449.
- [218] R. Mhanna, E. Öztürk, P. Schlink, M. Zenobi-Wong, *Osteoarthr. Cartilage*, **21** (2013) 1924.
- [219] O. Gryshkov, D. Pogozhykh, H. Zernetsch, N. Hofmann, T. Mueller, B. Glasmacher, *Mat. Sci. Eng. C-Bio. S.* **36** (2014) 77.
- [220] V.A. Nedović, B. Obradovic, C.I. Leskošek, O. Trifunović, R. Pešić, B. Bugarski, *Process Biochem.* **37** (2001) 17.
- [221] P. Velmurugan, M. Cho, S.-M. Lee, J.-H. Park, K.-J. Lee, H. Myung, B.-T. Oh, *Journal of Saudi Chemical Society*, 2014, doi:10.1016/j.jscs.2014.09.004.
- [222] L. Ai, J. Jiang, *Bioresource Technol.* **132** (2013) 374.
- [223] A.F. Martins, J.P. Monteiro, E.G. Bonafé, A.P. Gerola, C.T.P. Silva, E.M. Giroto, A.F. Rubira, E.C. Muniz, *Chinese Chemical Letters*, 2015, doi:10.1016/j.ccl.2015.04.032.
- [224] C. Wang, X. Huang, W. Deng, C. Chang, R. Hang, B. Tang, *Mat. Sci. Eng. C-Bio. S.* **41** (2014) 134.
- [225] A. Parveen, T. Ali, M. Wahid, S. Rao, *Mater. Lett.* **148** (2015) 86.
- [226] Ž. Jovanović, A.N. Radosavljević, N. Bibić, M. Šiljegović, Z.M. Kačarević-Popović, V.B. Mišković-Stanković, *Radiat. Phys. Chem.* **81** (2012) 1720.
- [227] Ž. Jovanović, A. Krklješ, J. Stojkowska, S. Tomić, B. Obradović, V. Mišković-Stanković, Z. Kačarević-Popović, *Radiat. Phys. Chem.* **80** (2011) 1208.

- [228] D. Poncelet, V.G. Babak, R.J. Neufeld, M.F.A. Goosen, B. Bugarski, *Adv. Colloid Interfac.* **79** (1999) 213.
- [229] B. Obradovic, D. Bugarski, M. Petakov, G. Jovčić, N. Stojanović, B. Bugarski, G. Vunjak-Novaković, *Mater. Sci. Forum*, **453–454** (2004) 549.
- [230] M. Petrović, D. Mitraković, B. Bugarski, D. Vonwil, I. Martin, B. Obradović, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* **15** (2009) 41.
- [231] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi and T. Yamamuro, *J. Biomed. Mater. Res.* **24** (1990) 721.
- [232] J. Stojkovska, B. Bugarski, B. Obradovic, *J. Mater. Sci.-Mater. M.* **21** (2010) 2869.
- [233] H. Eidi, O. Joubert, G. Attik, R.E. Duval, M.C. Bottin, A. Hamoui, P. Maincent and B.H. Rihn, *Int. J. Pharmaceut.* **396** (2010) 156.
- [234] G. Meriç, J.E. Dahl and I. Eystein Ruyter, *Dent. Mater.* **24** (2008) 1201.
- [235] J.Y. Zheng, A.P. Jadhav, G. Song, C.W. Kim, Y.S. Kang, *Thin Solid Films*, **524** (2012) 50.
- [236] X. Li, A. Xu, H. Xie, W. Yu, W. Xie, X. Ma, *Carbohydr. Polym.* **79** (2010) 660.
- [237] A.N. Krklješ, M.T. Marinović-Cincović, Z.M. Kačarević-Popović, J.M. Nedeljković, *Eur. Polym. J.* **43** (2007) 2171.
- [238] M.-G. Li, Y.-J. Shang, Y.-C. Gao, G.-F. Wang, B. Fang, *Anal. Biochem.* **341** (2005) 52.
- [239] V.N. Richards, N.P. Rath, W.E. Buhro, *Chem. Mater.* **22** (2010) 3556.
- [240] D.G. Angelescu, M. Vasilescu, R. Somoghi, V.S. Teodorescu, *Colloid. Surface. A*, **366** (2010) 155.
- [241] T. Ung, L.M. Liz-Marzán, P. Mulvaney, *J. Phys. Chem. B*, **105** (2001) 3441.
- [242] P. Mulvaney, *Langmuir*, **12** (1996) 788.
- [243] A. Slistan-Grijalva, R. Herrera-Urbina, J.F. Rivas-Silva, M. Ávalos Borja, F.F. Castellón-Barraza, A. Posada-Amarillas, *Physica E*, **27** (2005) 104.
- [244] J. Fang, X. Ma, H. Cai, X. Song, B. Ding, *Nanotechnology*, **17** (2006) 5841.
- [245] M.N. Nadagouda, R.S. Varma, *Aust. J. Chem.* **62** (2009) 260.
- [246] V. Sambhy, M.M. MacBride, B.R. Peterson, A. Sen, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 9798.
- [247] A. Slistan-Grijalva, R. Herrera-Urbina, J.F. Rivas-Silva, M. Ávalos-Borja, F.F. Castellón-Barraza, A. Posada-Amarillas, *Mater. Res. Bull.* **43** (2008) 90.



- [248] H. Wang, X. Qiao, J. Chen, X. Wang, S. Ding, *Mater. Chem. Phys.* **94** (2005) 449.
- [249] Z. Zhang, B. Zhao, L. Hu, *J. Solid State Chem.* **121** (1996) 105.
- [250] C. Kan, Ch. Wang, J. Zhu, H. Li, *J. Solid State Chem.* **183** (2010) 858.
- [251] P. Jiang, S. Li, S. Xie, Y. Gao, L. Song, *Chem.—Eur. J.* **10** (2004) 4817.
- [252] L. Fuks, D. Filipiuk, W. Lewandowski, *J. Mol. Struct.* **563–564** (2001) 587.
- [253] D. Filipiuk, L. Fuks, M. Majdan, *J. Mol. Struct.* **744–747** (2005) 705.
- [254] D. Leal, B. Matsuhira, M. Rossi, F. Caruso, *Carbohydr. Res.* **343** (2008) 308.
- [255] J.P. Chen, L. Hong, Sh Wu, L. Wang, *Langmuir*, **18** (2002) 9413.
- [256] P.Y. Lim, R.S. Liu, P.L. She, C.F. Hung, H.C. Shih, *Chem. Phys. Lett.* **420** (2006) 304.
- [257] S. Bouazza, V. Alonzo, D. Hauchard, *Synthetic Met.* **159** (2009) 1612.
- [258] M. Štofik, Z. Strýhal, J. Malý, *Biosens. Bioelectron.* **24** (2009) 1918.
- [259] W.-J. Jin, H.J. Jeon, J.H. Kim, J.H. Youk, *Synthetic Met.* **157** (2007) 454.
- [260] I.M. El-Sherbiny, H.D.C. Smyth, *Int. J. Pharmaceut.* **395** (2010) 132.
- [261] S. Link, M.A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B*, **103** (1999) 8410.
- [262] M. Giersig, I. Pastoriza-Santos, L.M. Liz-Marzán, *J. Mater. Chem.* **14** (2004) 607.
- [263] H. Hovel, S. Fritz, A. Hilger, V. Kreibig, M. Vollmer, *Phys. Rev. B*, **48** (1993) 18178.
- [264] A.J. Kora, R.B. Sashidhar, J. Arunachalam, *Carbohydr. Polym.* **82** (2010) 670.
- [265] A.J. Kora, R.B. Sashidhar, J. Arunachalam, *Process Biochem.* **47** (2012) 1516.
- [266] T.P. Davis, M.B. Huglin, D.C.F. Yip, *Polymer*, **29** (1988) 701.
- [267] J. Crank, *The Mathematics of Diffusion*, Clarendon Press, Oxford, 1970.
- [268] T.H. Kim, M. Kim, H.S. Park, U.S. Shin, M.S. Gong, H.W. Kim, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **100A** (2012) 1033.
- [269] S.K. Sohaebuddin, P.T. Thevenot, D. Baker, J.W. Eaton, L. Tang, *Part. Fibre Toxicol.* **7** (2010) 22.
- [270] E. Hidalgo, C. Domínguez, *Toxicol. Lett.* **98** (1998) 169.
- [271] P. Dewire, T.A. Einhorn, u: R.W. Moskowitz, D.S. Howell, R.D. Altman, J.A. Buckwalter, V.M. Goldberg (Eds.), *Osteoarthritis. Diagnosis and Medical /*

*Surgical Management*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2001, p. 49-68.

[272] R.M. Mason, J.R. Levick, P.J. Coleman, D. Scott, u: C.W. Archer, M. Benjamin, B. Caterson, J.R. Ralphs (Eds.), *Biology of the Synovial Joint*, Harwood Academic, Amsterdam, 1999, p. 253-264.

## 8. BIOGRAFIJA AUTORA

Željka (Jovanović) Đurđević, dipl. inž. tehnologije, rođena je 1981. godine. Završila je V beogradsku gimnaziju u Beogradu. Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu (TMF) upisala je 1999. godine. Diplomirala je 2007. godine na Katedri za fizičku hemiju i elektrohemiju, i iste godine upisala doktorske studije TMF.

Bila je stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj RS, od 2008. do decembra 2009. godine kada je zaposlena u Inovacionom centru TMF. Januara 2013. godine prelazi u KreativTeh, *spin off* kompaniju TMF, čiji je suosnivač. Od novembra 2014. zaposlena je u V IT Systems.

Oblast naučno-istraživačkog rada Željke Đurđević obuhvata elektrohemijsku sintezu i karakterizaciju nanočestica srebra u polimernim rastvorima, nanokompozita srebra i polimera (PVP, alginat, PVA), i prevlaka silana na aluminijumu.

Koautor je poglavlja u monografiji međunarodnog značaja (M14), 19 naučnih radova (14 radova M21-23, 3 rada M52, 2 rada u časopisima van SCI liste), 54 naučna saopštenja (34 rada M33-34, 20 radova M63-64) i jednog patenta (M92). Iz oblasti doktorske disertacije koautor je sledećih radova: 1 rad M14, 5 radova M21, 1 rad M23, 2 rada M33, 13 radova M34, 2 rada M63, 7 radova M64, i 1 rad M92.

Željka Đurđević je učestvovala u realizaciji 5 međunarodnih naučnih projekata, jednog projekta bilateralne saradnje RS i Republike Slovenije, i 2 nacionalna projekta. Volontirala je na izvođenju eksperimentalnih vežbi na Katedri za fizičku hemiju i elektrohemiju TMF iz predmeta: Nemetalne prevlake (na osnovnim i master studijama), Fizička hemija I i Fizička hemija II. Učestvovala je u rukovođenju izrade tri diplomska rada.

Junu 2010. predsedavala je Naučnim i Organizacionim odborom *ISE Satellite Student Regional Symposium on Electrochemistry*, održanog u okviru *2<sup>nd</sup> Regional Symposium on Electrochemistry of South-East Europe*, u Beogradu.

Maja 2012. godine bila je u studijskoj poseti Politehničkom Univerzitetu u Bukureštu, Rumunija (*Universităţii POLITEHNICA din Bucureşti*), tokom koje je radila na modifikaciji elektroda polimernim filmovima, i njihovoj karakterizaciji elektrohemijskim metodama.

Govori engleski jezik. Koristi se francuskim i nemačkim jezikom.

## Прилог 1.

### Изјава о ауторству

Потписана Жељка Ђурђевић

број индекса ДС - 2007/009

### Изјављујем

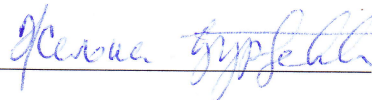
да је докторска дисертација под насловом

#### **Наноконтрозити сребро/поли(*N*-винил-2-пиролидон) и сребро/алгинат добитени електрохемијским поступцима**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

У Београду, 25. маја 2015. године

**Потпис докторанда**



## Прилог 2.

### Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Жељка Ђурђевић  
Број индекса ДС - 2007/009  
Студијски програм Хемија и хемијска технологија  
Наслов рада

#### **Нанокомпозици сребро/поли(*N*-винил-2-пиролидон) и сребро/алгинат добијени електрохемијским поступцима**

Ментор др Весна Мишковић-Станковић, редовни професор ТМФ

Потписана Жељка Ђурђевић

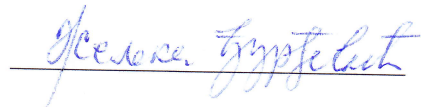
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 25. маја 2015. године



## Прилог 3.

### Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Нанокомпозити сребро/поли(*N*-винил-2-пиролидон) и сребро/алгинат  
добити електрохемијским поступцима**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

**3. Ауторство – некомерцијално – без прераде**

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

**Потпис докторанда**

У Београду, 25. маја 2015. године

