

Univerzitet u Beogradu  
Hemijski fakultet

Dragica R. Spasojević

MODIFIKACIJA ALGINATA, CELULOZE I  
KSILANA IZ ĆELIJSKOG ZIDA BILJAKA,  
FENOLNIM JEDINJENJIMA I AMINIMA, ZA  
DOBIJANJE HIDROGELOVA

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

University of Belgrade  
Faculty of Chemistry

Dragica R. Spasojević

MODIFICATION OF ALGINATE,  
CELLULOSE AND XYLAN FROM PLANT  
CELL WALL, WITH PHENOLIC  
COMPOUNDS AND AMINES, FOR  
OBTAINING HYDROGELS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

**Mentor:**

---

dr Radivoje Prodanović, vanredni profesor  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Članovi komisije:**

---

dr Vladimir Beškoski, vanredni profesor  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

dr Ksenija Radotić Hadži-Manić, naučni savetnik  
Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu

**Datum odbrane:**

*Ova disertacija urađena je na Institutu za multidisciplinarna istraživanja u Beogradu, na Odseku za nauku o živim sistemima.*

*Zahvaljujem se mentoru, prof dr Radivoju Prodanoviću na predloženoj temi i ukazanoj pomoći prilikom izrade i pisanje ove doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se dr Kseniji Radotić Hadži-Manić na korisnim savetima i nesebičnoj podršci u svim fazama nastajanja ovog rada.*

*Zahvaljujem se dr Vladimiru Beškoviću na poverenju i sugestijama koje su pomogle u oblikovanju ovog rada.*

*Deo doktorata vezan za antimikrobnu aktivnost urađen je u mikološkoj laboratoriji, odeljenja za fiziologiju biljaka Biološkog instituta Siniša Stanković, i stoga posebnu zahvalnost dugujem dr Jasmini Glamočiji i dr Marini Soković.*

*Zahvaljujem se svim kolegama iz kancelarije 95 na pomoći i prijateljstvu.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj porodici (mami, tati i bratu) na bezgraničnoj ljubavi, nesebičnom razumevanju, neprekidnoj motivaciji i podršci, i zbog toga im posvećujem ovaj rad.*

# **Modifikacija alginata, celuloze i ksilana iz ćelijskog zida biljaka, fenolnim jedinjenjima i aminima, za dobijanje hidrogelova**

## **IZVOD**

Polisaharidi biljnog ćelijskog zida nalaze se u prirodi u velikim količinama, relativno su jeftini i lako dostupni i stoga predstavljaju odličan polazni izvor za sintezu novih materijala i proizvodnju hidrogelova za imobilizaciju enzima i lekova.

U prvom delu ove teze upotrebljen je alginat za imobilizaciju peroksidaze (HRP) i dehidrogenatnih polimera (DHP) koniferil alkohola. Za enzimsku imobilizaciju testirane su različite kombinacije nativnog, oksidovanog i aminovanog alginata i enzima. Kao najbolja pokazala se aminovana HRP kovalentno vezana za oksidovani alginat, sa povećanom termostabilnošću i stabilnošću u organskim rastvaračima. DHP je sintetisan enzimskom polimerizacijom, zatim je mešan sa alginatom i sve je gelirano jonima  $\text{Ca}^{2+}$ . DHP-alginatni gel pokazao se kao efikasno antimikrobno sredstvo na različitim Gram (+) i Gram (-) bakterijama.

U drugom delu teze izolovan je ksilan iz čokova kukuruza, uvedene su mu karboksilne grupe dvostrukom karboksimetilacijom, a onda je dalja modifikacija nastavljena oksidacijom sa perjodatom (u različitim molskim odnosima) i reduktivnom aminacijom sa tiraminom. Dobijeni polimeri različitih stepena modifikacije (5–20%) korišteni su za dobijanje mikrokuglica hidrogela, polimerizacijom u emulziji. Kao model enzim imobilizovana je amiloglukozidaza i

na osnovu najviše specifične i vezane aktivnosti, kao najbolji nosač pokazao se 10% tiramin-ksilan.

U trećem delu teze sintetisana tiramin–celuloza upotrebljena je kao nosač za dostavljanje (drug delivery) ketoprofena. Otpuštanje ketoprofena na pH 1,5 iznosilo je 8–11%, a na pH 7,4 78–79% nakon 4 sata praćenja. Dostavljanjem ketoprofena na ovaj način omogućava potencijalno izbegavanje neželjenih efekata leka na sluznicu želuca i njegovo ciljano otpuštanje u crevima na višim pH vrednostima.

Ključne reči: alginat, celuloza, ksilan, perjodatna oksidacija, reduktivna aminacija, tiramin, hidrogel, imobilizacija

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

UDK: 577.114

# **Modification of alginate, cellulose and xylan from plant cell wall, with phenolic compounds and amines, for obtaining hydrogels**

## **ABSTRACT**

Polysaccharides from plant cell wall are found in nature in large quantities, they are relatively cheap and readily available, and therefore present an excellent source of starting material for the synthesis and production of new hydrogels for immobilization of enzymes and drugs.

In the first part of this thesis alginate has been used for immobilization of peroxidase (HRP) and dehydrogenated polymers (DHP) of coniferyl alcohol. Different combinations of native, oxidized and aminated alginate and HRP were tested for the enzyme immobilization. Aminated HRP covalently bound to the oxidized alginate proved to be the best combination, with increased thermal and stability in organic solvents. DHP was synthesized by enzymatic polymerization, and then mixed with alginate and  $\text{Ca}^{2+}$  ions to obtain gel. DHP–alginate gel showed effective antimicrobial activity against a variety of Gram (+) and Gram (-) bacteria.

In the second part, xylan from corn cobs was isolated by alkaline extraction, carboxymethylated twice, then further modified by oxidation with periodate (in different molar ratios) and coupling with tyramine. The resultant polymers varying in degrees of modification (5–20%) were used to obtain hydrogel microspheres, by the emulsion polymerization. Amyloglucosidase was used as a

model compound for enzyme immobilization and 10% modified tyramine-xylan has proved to be the best carrier.

In the third part, tyramine-cellulose was used as a carrier for drug delivery of Ketoprofen. After 4 hours of monitoring release of ketoprofen at pH 1,5 was 8-11 %, and at pH 7,4 was 78-79%. In this way, by controlled release of the drug at different pH values, it could be possible to avoid side effects of the drug on the stomach mucosa and its targeted release in the intestines, at higher pH.

Keywords: alginate, cellulose, xylan, periodate oxidation, reductive amination, tyramine, hydrogel, immobilization

Academic Expertise: Chemistry

Field of Academic Expertise: Biochemistry

UDK: 577.114



## Lista skraćenica

HRP - peroksidaza iz rena

M - manuronska kiselina

G - guluronska kiselina

EDTA - etilendiamin tetra sirćetna kiselina

CD - ciklodekstrin

CN - cijanogen

EDC - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid

Alg - alginat

DMAc - N, N-dimetilacetamid

NMMO - N-metilmorfolin-N-oksid monohidrat

DMSO - dimetilsulfoksid

DMF - dimetilformamid

TPP - tripolifosfat

PEG - polietilen glikol

PLLA - poli(L-mlečna kiselina)

PEO - polietilen oksid

PPO - polipropilen oksid

PAA - poliakrilna kiselina

PMA - polimetakrilna kiselina

PVA - polivinil alkohol

HEPES - 2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-etanesulfonska kiselina

DHP - dehidrogenatni polimer

MIC - minimalna inhibitorna koncentracija

MBC - minimalna baktericidna koncentracija

INT - 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2*H*-tetrazolijum hlorid

SMCA - Na-monohloroacetat

CMX - karboksimetilksilan

UV - ultraljubičasto

FT-IR - Furijeova transformacijska infracrvena

SEM - skenirajuća elektronska mikroskopija

Tris - tris(hidroksimetil)aminometan

Gox - glukoza oksidaza

DNS - 3,5-dinitrosalicilna kiselina

Tyr - Cel - tiramin-celuloza

Sp - specifična aktivnost

Tyr - Xyl - tiramin-ksilan

KP - ketoprofen

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. PREGLED LITERATURE</b> .....	3
2.1. Alginat .....	3
2.1.1. Modifikacije alginata.....	6
2.1.2. Upotreba alginata.....	10
2.2. Celuloza .....	11
2.2.1. Hemijske modifikacije celuloze.....	13
2.2.2. Upotreba celuloze i njenih modifikata .....	15
2.3. Ksilan.....	16
2.3.1. Modifikacije ksilana .....	17
2.3.2. Upotrebe ksilana.....	19
2.4. Hidrogel.....	20
2.4.1. Podela hidrogelova .....	20
2.4.2. Osobine hidrogela .....	21
2.4.3. Načini pravljenja hidrogela.....	22
2.4.4. Prednosti i mane hidrogela .....	26
2.4.5. Upotreba hidrogelova.....	27
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEO</b> .....	30
3.1. Imobilizacije u alginatnim hidrogelovima.....	30
3.1.1. Imobilizacija native peroksidaze u kuglicama nativnog alginata.....	30
3.1.2. Aktivacija alginata oksidacijom.....	31
3.1.3. Imobilizacija native peroksidaze u kuglicama oksidovanog alginata.....	32
3.1.4. Modifikacija peroksidaze etilendiaminom i njena imobilizacija .....	32
3.1.5. Aminacija perjodatno oksidovanog alginata.....	33
3.1.6. Enzimaska aktivnost .....	33
3.1.7. Sinteza dehidrogenatnih polimera (DHP) .....	34
3.1.8. Mešanje DHP sa alginatom i pravljenje gela .....	34

3.1.9.	Mikroorganizmi.....	34
3.1.10.	Antibakterijska aktivnost .....	35
3.2.	Imobilizacija amiloglukozidaze u tiramin-ksilanskim hidrogelovima.....	36
3.2.1.	Izolovanje ksilana alkalnom ekstrakcijom .....	36
3.2.2.	Karboksimetilacija ksilana .....	36
3.2.3.	Perjodatna oksidacija karboksimetilksilana .....	37
3.2.4.	Kuplovanje oksidovanih polisaharida sa tiraminom .....	37
3.2.5.	UV - spektri modifikovanih polimera i koncentracija fenolnih grupa.....	38
3.2.6.	Titracija jonizabilnih grupa .....	38
3.2.7.	FT-IR (Furijeova transformacijska infracrvena) spektroskopija .....	38
3.2.8.	Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM).....	39
3.2.9.	Pravljenje kuglica u emulziji.....	39
3.2.10.	Optička mikroskopija.....	40
3.2.11.	Merenje aktivnosti amiloglukozidaze .....	40
3.2.12.	Temperaturna stabilnost .....	40
3.2.13.	pH optimum.....	41
3.2.14.	Kinetičke konstante.....	41
3.2.15.	Operativna stabilnost.....	41
3.3.	Imobilizacija ketoprofena u tiramin-karboksimetil-celuloznom hidrogelu.....	41
3.3.1.	UV - spektroskopija i titracija modifikata Tyr - Cel .....	42
3.3.2.	Imobilizacija ketoprofena .....	43
3.3.3.	pH - zavisno otpuštanje ketoprofena.....	43
<b>4.</b>	<b>REZULTATI I DISKUSIJA .....</b>	<b>45</b>
4.1.	Imobilizacija peroksidaze u alginatu.....	45
4.1.1.	pH optimum.....	46
4.1.2.	Stabilnost u organskom rastvaraču.....	47
4.1.3.	Određivanje kinetičkih konstanti.....	48
4.1.4.	Kontinuirana upotreba u bač reaktoru.....	49
4.2.	Antibakterijska aktivnost DHP u alginatnom hidrogelu.....	50
4.3.	Imobilizacija amiloglukozidaze u tiramin-ksilanskim hidrogelovima.....	54

4.3.1.	UV spektri i koncentracija fenolnih grupa.....	55
4.3.7.	Enzimska aktivnost mikrokuglica.....	62
4.3.8.	Termostabilnost imobilizata amiloglukozidaze.....	65
4.3.9.	Uticaj pH vrednosti na aktivnost slobodnog i vezanog enzima.....	66
4.3.10.	Kinetičke konstante, $K_m$ i $V_{max}$ .....	67
4.3.11.	Operativna stabilnost.....	69
4.4.	Imobilizacija ketoprofena u tiramin-karboksimetil-celuloznom hidrogelu.....	70
4.4.1.	Hemijska modifikacija karboksimetil-celuloze .....	70
4.4.2.	pH - zavisno dostavljanje ketoprofena u Tyr-Cel hidrogelu.....	72
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>75</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>77</b>
<b>7.</b>	<b>BIOGRAFIJA.....</b>	<b>89</b>

## 1. UVOD

Poslednjih godina u naučnim krugovima, a posebno u oblasti nauke o materijalima, u žižu interesovanja dospeli su biopolimeri. Glavne karakteristike ovih materijala, koje su doprinele njihovoj povećanoj popularnosti, jesu jeftino dobijanje iz obnovljivih izvora i biorazgradivost. Polisaharidi su klasa biopolimera koji su široko zastupljeni u prirodi, posebno u ćelijskom zidu biljaka. Tri glavne organske komponente ćelijskog zida kopnenih biljaka su celuloza, hemiceluloza i lignin, dok se glavni morski polisaharid, kako često nazivaju alginat, nalazi u ćelijskom zidu mrkih algi [1].

Zahvaljujući postojanju brojnih funkcionalnih grupa, polisaharidi su pogodan polazni materijal za različite vrste hemijskih modifikacija, a pored toga jonizabilne grupe doprinose njihovoj hidrofилности i vezivanju suprotno naelektrisanih molekula i jona, što ih čini odličnim kandidatima za pravljenje hidrogela [2]. Imobilizacija u hidrogelovima omogućava blage uslove imobilizacije i zaštitu imobilisanog enzima ili leka od štetnih uticaja iz spoljašnje sredine [3]. Za enzime je prednost to što ostaju zarobljeni unutar pora gela i mogu da se koriste više puta u ponavljajućim ciklusima, dok je kod fiziološki aktivnih supstanci najveća prednost upotrebe hidrogela tzv. kontrolisano otpuštanje. "Pametni" hidrogelovi reaguju na spoljašnje stimulise, i omogućavaju otpuštanje supstanci u zavisnosti od pH, temperature, električnog ili magnetnog polja i sl. [4].

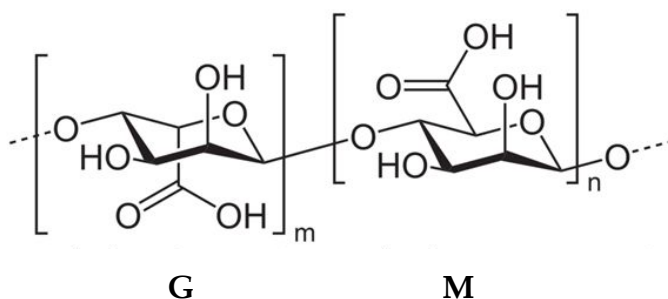
Cilj ovog doktorata bio je korišćenje jeftinih prirodnih polimera iz obnovljivih izvora kao nosača za imobilizaciju enzima koji bi se mogli koristiti u prehrambenoj, poljoprivrednoj i farmaceutskoj industriji, i lekovitih supstanci, koji

bi našli primenu u medicini i farmaciji. U tu svrhu su korišteni nativni i modifikovani alginat, izolovan je i modifikovan ksilan iz čokova kukuruza, modifikovana je komercijalna celuloza i pravljene su hidrogelove od ovih polimera. Kao model sistemi za imobilizaciju enzima upotrebljene su peroksidaza iz rena *Armoracia rusticana* (HRP) i amiloglukozidaza iz gljive *Aspergillus niger*, a za imobilizaciju lekovitih supstanci upotrebljen je ketoprofen i sintetisan je dehidrogenatni polimer koniferil alkohola. Optimizovani su uslovi imobilizacije, način i stepen modifikacije, količina imobilizovanih supstanci i ostali parametri, kako bi se dobile najbolje karakteristike željenih imobilizata.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Alginat

Alginat je prirodni polisaharid, zastupljen u ćelijskom zidu braon morskih algi (*Phaeophyceae*) i kapsulama zemljišnih bakterija (*Pseudomonas* i *Azotobacter*) [5-7]. Njegova biološka uloga u algama je strukturna, pružajući im istovremeno mehaničku čvrstinu i fleksibilnost. Kod bakterija biološka funkcija alginata je manje poznata. Zna se da je značajan za formiranje cisti kod vrste *Azotobacter vinelandii*, štiteći na taj način ćelije od isušivanja i mehaničkog stresa [8]. Iz braon algi na svetskom nivou proizvede se 38.000 tona alginata godišnje [9].



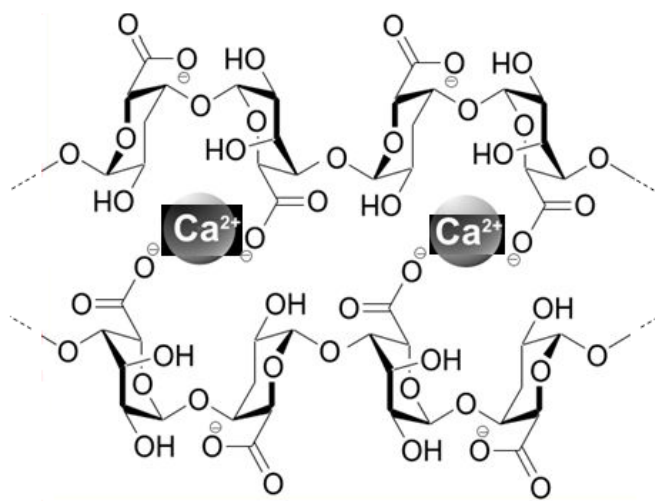
Slika 1. Deo polisaharidnog lanca alginata. G - guluronska kiselina, M - manuronska kiselina

Molekulska masa komercijalno dostupnih alginata varira u širokom opsegu od 32.000 - 400.000 g/mol. Viskozitet rastvora zavisn je od pH vrednosti i dostiže najvišu vrednost pri pH oko 3 - 3.5 [10]. Po strukturi alginati predstavljaju linearne nerazgranate dvokomponentne kopolimere uronskih kiselina. β-D-manuronska (M) i α-L-guluronska kiselina (G) povezane 1,4 glikozidnom vezom, organizovane su u blokove ponavljajućih sekvenci čisto manuronske (MMMM...) ili čisto



guluronske kiseline (GGGG...) ili nauzmenično povezane (MGMG...). Zastupljenost ovih blokova razlikuje se u zavisnosti od vrste alge iz koje je alginat izolovan i određuje njegove fizičke karakteristike [11-13].

Jedna od najznačajnijih osobina alginata jeste da u prisustvu multivalentnih katjona ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ...) prelazi iz tečnog stanja u stanje gela. Ovaj proces jonotropskog geliranja, pri kom dolazi do zamene  $\text{Na}^+$  jona iz alginata, sa nekim od dvovalentnih katjona, je nezavistan od temperature. Do umrežavanja dolazi interakcijom katjona sa karboksilnim grupama susednih polimernih lanaca [11, 13, 14]. Većina katjona, među kojima i  $\text{Ca}^{2+}$  joni, koji su najčešće korišteni za geliranje alginata, vezuju se preferencijalno za G ostatke lanca, dok joni  $\text{Cu}^{2+}$  imaju podjednak afinitet prema M i G ostacima. [15] Heliranjem  $\text{Ca}^{2+}$  sa G ostacima nastaje takozvana „egg-box“ struktura, nazvana tako zbog karakterističnog izgleda koji podseća na kutiju sa jajima (slika 2). [16]



Slika 2. Jonotropsko geliranje alginata sa jonima  $\text{Ca}^{2+}$

Sposobnost geliranja i osobine nastalog gela u velikoj meri zavise od broja i rasporeda G i M ostataka, molekulske mase i koncentracije polimera i prirode i koncentracije katjona. Tako na primer, alginati sa više G ostataka i većom molekulskom masom formiraju čvršće gelove. Što se tiče uticaja katjona, dodatak  $Ba^{2+}$  umesto  $Ca^{2+}$  daće čvršći gel, dok recimo  $Mg^{2+}$  uopšte ne dovodi do geliranja [17-19].

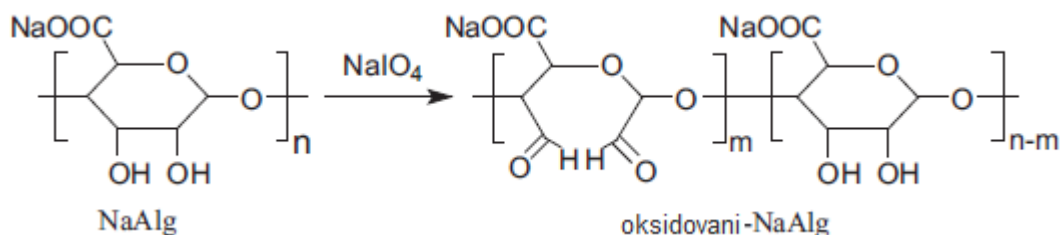
Dva su načina na koji se formiraju alginatni gelovi sa kalcijumom: spoljašnjim i unutrašnjim geliranjem. Spoljašnje (eksterno ili difuziono) geliranje odigrava se difuzijom  $Ca^{2+}$  jona u rastvor alginata. To se najčešće izvodi ukapavanjem rastvora alginata u rezervoar kalcijuma. Unutrašnje (interno ili *in situ*) geliranje se razlikuje po tome što se joni  $Ca^{2+}$  otpustaju kroz ceo sistem na kontrolisan način. U tu svrhu se najčešće koriste slabo rastvorne soli ( $CaSO_4$ ,  $CaCO_3$ ,  $CaHPO_4$ ) ili kompleksiranje (sa EDTA ili limunskom kiselinom), odakle se kalcijum oslobađa povećanjem kiselosti rastvora [8, 20].

Glavni nedostatak kalcijum - alginatnih gelova jeste njihova nestabilnost u pojedinim rastvorima koji poseduju suprotne jone ili supstance sposobne da heliraju dvovalentne katjone, menjajući poroznost gela i na kraju dovodeći do njegovog rastvaranja [21]. Osim toga, veličina pora alginatnih hidrogelova iznosi oko 5 nm, što dovodi do toga da mali molekuli slobodno i brzo difunduju iz gela [17]. Zbog toga se često rade hemijske modifikacije alginata ili imobilizovanih molekula koje će dovesti do jačih interakcija ili se primenjuje kovalentna imobilizacija.

### 2.1.1. Modifikacije alginata

Modifikacije alginata uglavnom podrazumevaju modifikacije hidroksilnih grupa alginata na C2 i C3 ugljenicima, u koje spadaju: oksidacija, reduktivna aminacija, sulfonovanje, kopolimerizacija i kuplovanje ciklodekstrinskih jedinica i modifikacije karboksilnih grupa na C6 atomu, koje uključuju: esterifikaciju, amidaciju i Ugi reakciju [22].

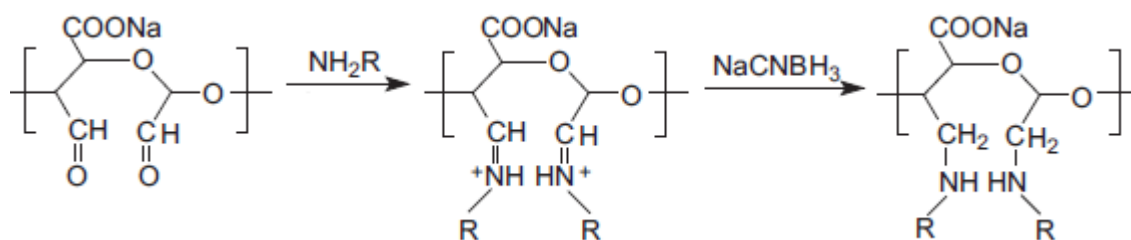
Oksidacijom alginata povećava se njegova reaktivnost prevođenjem 2 vicinalne alkoholne grupe u aldehidne i istovremenim raskidanje C - C veze, čime dolazi do veće rotacione slobode. Zato se oksidacija ovog polimera često izvodi, uglavnom pomoću Na - perjodata (slika 3) ili K - permanganata. Oksidaciju perjodatom bitno je izvoditi u mraku, kako bi se eliminisale sporedne reakcije, a stepen oksidacije moguće je varirati upotrebom različite koncentracije perjodata [23, 24].



Slika 3. Perjodatna oksidacija Na - alginata

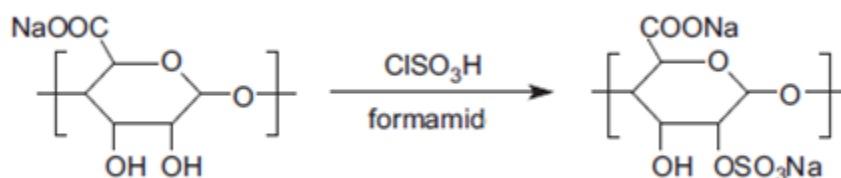
Perjodatnu oksidaciju alginata vrlo često prati reduktivna aminacija. Reduktivna aminacija izvodi se u 2 koraka: prvi je formiranje Šifove baze reakcijom aldehida i amina, a drugi njena redukcija u stabilni sekundarni amin. Kao reduktivno sredstvo najčešće se koristi Na - cijanoborhidrid (NaBH<sub>3</sub>CN), a mogu

se koristiti još i Na - borhidrid i 2 - metilpiridin boran [25]. Šema reakcije prikazana je na slici 4.



Slika 4. Reduktivna aminacija oksidovanog alginata

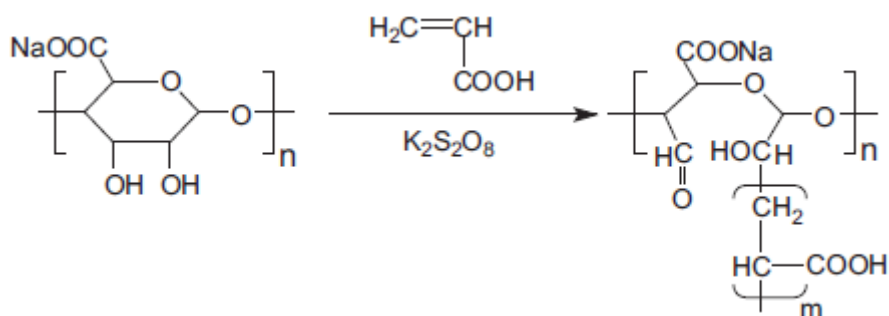
Sulfonovanje alginata može se izvesti sumpornom kiselinom uz dodatak karbodiimida (DCC) [26],  $\text{SO}_3/\text{piridin}$  kompleksom u dimetilformamidu [27], hlorsumpornom kiselinom u formamidu (slika 5) [24]. Značaj ove reakcije leži u tome što je sulfonovani alginat po strukturi sličan hondroitinu i može da ispolji sličnu bioaktivnost, kada se primeni kao antikoagulaciono sredstvo. Osim toga, hidrogelovi sulfonovanog alginata imaju potencijalnu primenu u enkapsulaciji ćelija za terapijsku primenu, pokazujući heparinu slične antiinflamatorne osobine. [28]



Slika 5. Sulfonovanje alginata hlorsumpornom kiselinom u formamidu

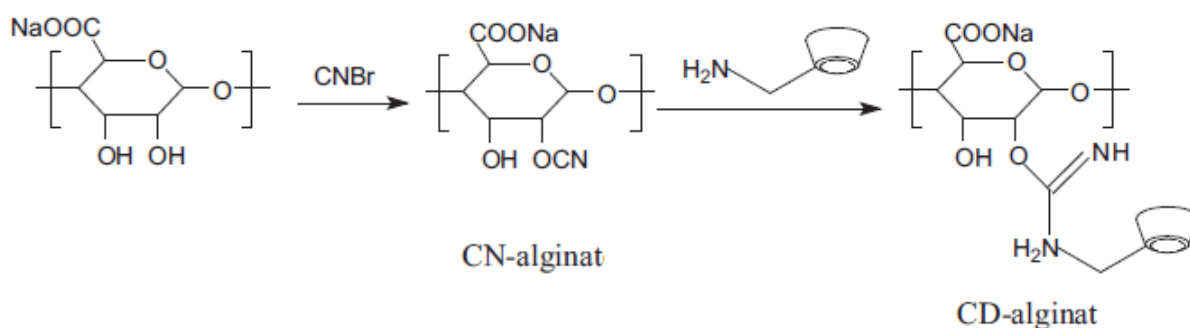
Kopolimerizacija alginata rađena je sa raznovrsnim supstratima i primenom različitih inicijatora polimerizacije: poliakrilamidom sa jonima cerijuma ili amonijum persulfatom kao inicijatorom, metil akrilatom i etil akrilatom sa

cerijumom, itakonskom kiselinom pomoću benzoil peroksida, N-izopropilakrilamidom uz  $\gamma$  - zračenje  $^{60}\text{Co}$ , vinilsulfonskom kiselinom pomoću peroksidifosfat/tiourea redoks sistema i mnogim drugim. Glavne prednosti kopolimera su veći procenat bubrenja i tzv. superapsorpcija, bolje vezivanje i zadržavanje jona metala, kontrolisanije otpuštanje lekova, smanjena biodegradabilnost i sl. [1, 29].



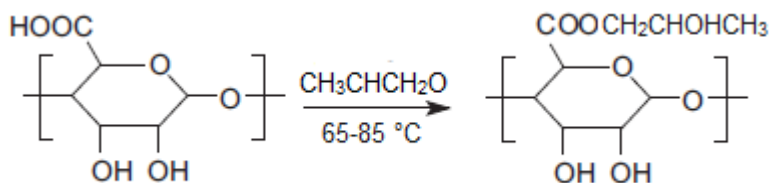
Slika 6. Primer kopolimerizacione reakcije alginata sa akrilatom

Kovalentnim vezivanjem  $\alpha$ -ciklodekstrina ( $\alpha$ -CD) za alginat dobijen je kopolimer sa izuzetnom inkluzionom sposobnošću, uz zadržanu sposobnost formiranja gela. Ovo je iskorišćeno na polju bioremedijacije i enkapsulacije bakterijskih ćelija. Reakcija se odvija uz dodatak cijanogen bromida, pri čemu nastaje CN - alginat, koji onda reaguje sa  $\alpha$ -ciklodekstrinom dajući CD - alginat (slika 7) [24].



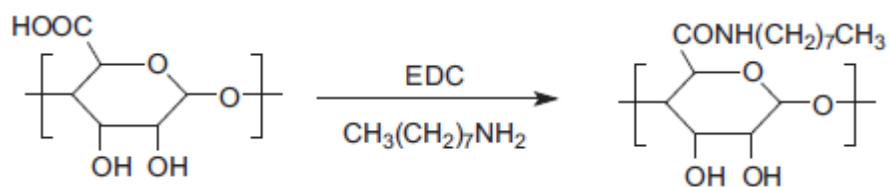
Slika 7. Sinteza ciklodekstrin – alginata

Esterifikacijom karboksilnih grupa alginata alkil grupama, povećava se njegova hidrofobnost i dobija se polimer amfifilne prirode. Komercijalno najznačajniji estar alginata, propilen glikolni estar, koji se koristi u industriji hrane, dobijen je esterifikacionom reakcijom alginata sa propilenoksidom, u reaktoru pod pritiskom i na temperaturi iznad 65 °C (slika 8). Reakcijama odgovarajućih haloalkana sa alginatom dobijeni su delimično ili potpuno esterifikovani estri etil, metil, butil ili benzil alginata [30, 31].



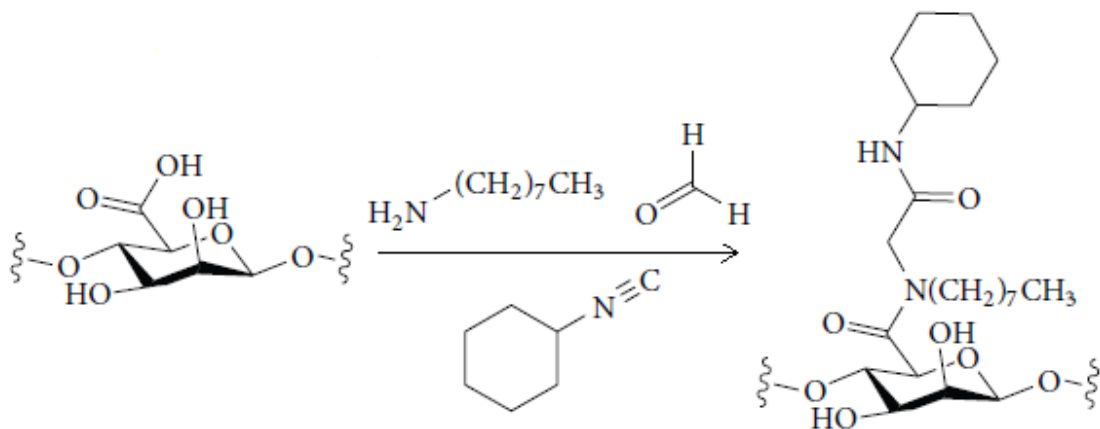
Slika 8. Esterifikacija alginata propilenoksidom

Amidacione reakcije sa alginatom zahtevaju kuplujući reagens: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidrohlorid (EDC-HCl) ili 2-hloro-1-metilpiridinium jodid (CMPI). Nakon reakcije sa kuplujućim reagensom, alginat reaguje sa alkilaminom (oktilaminom, dodecilaminom i sl.), ili cisteinom, N-(3-aminopropil) pirolom i drugim aminima [24, 32].



Slika 9. Amidacija alginata 1-oktilaminom uz kuplovanje sa EDC -om

Ugijeva četvorokomponentna reakcija odigrava se u prisustvu aldehidne ili keto grupe, amina, karboksilne kiseline i izocijanida, uz formiranje bis-amida. Kao rezultat ove kondenzacione reakcije nastaje hidrofobno modifikovani alginat, Ugi - Alg, a jedan primer modifikacije dat je na slici 9 [24].



Slika 9. Ugijeva reakcija alginata sa cikloheksil izocijanidom, formamidom i n-oktilaminom

### 2.1.2. Upotreba alginata

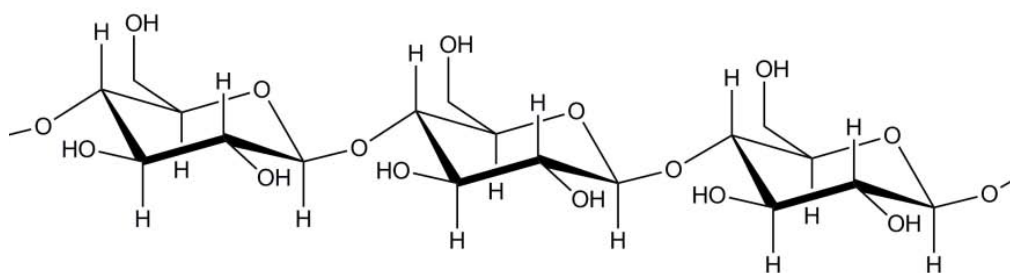
Komercijalna upotreba alginata, zasnovana pre svega na njegovoj sposobnosti geliranja, je veoma široka. Što se tiče tehnološke primene alginat se

koristi u prehrambenoj industriji u proizvodnji marmelada, kremova, sladoleda, voćnih sokova kao sredstvo za zgušnjavanje i kao stabilizator (u formi soli sa  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  i propilenglikol alginata), u papirnoj industriji za impregnaciju papira, u tekstilnoj industriji za štampanje na materijalu, u proizvodnji elektroda za zavarivanje, u mašinama za zaptivanje konzervi i kesa i u mnogim drugim aspektima [7, 33]. U farmaceutskoj industriji i medicini alginat je našao svoje mesto u proizvodnji brojnih preparata, a i mnogobrojna su istraživanja koja se vrše u cilju njegove dalje potencijalne primene. Alginat u formi sunđer, vlakana i hidrogela sa  $\text{Ca}^{2+}$  uz dodatak hitozana i čestica srebra (za antibakterijsku aktivnost), ili želatina i boraksa uz oksidovanu formu alginata, koristi se u proizvodnji kompresa za rane. Formulacije za sprečavanje želučnog refluksa i gorušice takođe se prave na bazi alginata, kao i masa za uzimanje dentalnih otisaka u stomatologiji. Potencijalna primena alginata zasnovana na njegovoj sposobnosti imobilizacije živih ćelija leži u transplataciji ćelija za lečenje nekih bolesti kao što su dijabetes ili Parkinsonova bolest. Alginatni hidrogel koristi se u tkivnom inženjeringu za reparaciju hrskavice, regeneraciju kostiju, za enkapsulaciju lekova, bioaktivnih jedinjenja i proteina [13, 34].

## 2.2. Celuloza

Celuloza predstavlja najzastupljeniji organski obnovljivi polimer na svetu [35]. Glavni je konstituent ćelijskog zida viših biljaka, a takođe se nalazi kod bakterija, ameba, algi, gljiva, pa čak i morskih životinja [36]. Biološka funkcija joj je zaštita ćelija, definisanje njihovog oblika i pozicije [35]. Količina celuloze u ćelijskom zidu biljaka varira uglavnom od 35 do 50%, dok kod pamuka njen udeo doseže čak i do 97%. Količina celuloze koja nastaje na godišnjem nivou iznosi nekoliko milijardi tona, što dovoljno govori o njenom ekonomskom značaju [37].





Slika 10. Molekulska struktura celuloznog lanca

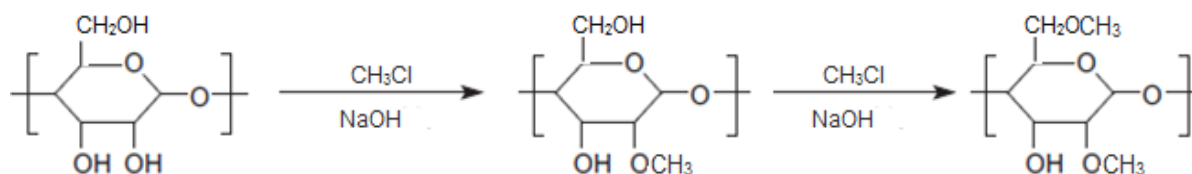
Celuloza se sastoji od glukoznih jedinica povezanih  $\beta$  - 1, 4 glikozidnom vezom (slika 10), a njihov broj varira u zavisnosti da se celuloza nalazi u primarnom (oko 8.000) ili sekundarnom ćelijskom zidu (oko 15.000 glukoznih jedinica). Ove jedinice formiraju nerastvoran polimer rigidne linearne strukture. U prirodi se celuloza nalazi u dve kristalne forme, označene kao celuloza I i II. Kod celuloze I (koja je najzastupljeniji prirodni oblik) linearni lanci postavljaju se paralelno jedni drugima, formiraju intra- i inter-lančane vodonične veze i obrazuju kristalne mikrofibrile. Kod celuloze II (koja se dosta ređe zastupljena i sreće se samo kod nekih algi i bakterija) lanci su orijentisani antiparalelno, omogućujući formiranje dodatne vodonične veze po glukozom ostatku. Svaki mikrofibril celuloze sadrži u proseku 36 polimernih lanaca [38, 39]. Mikrofibrili se dalje organizuju u fibrile i ovakva struktura celulozu čini čvršćom od čelične žice iste debljine [37].

Zbog toga što je celuloza nerastvorna ili vrlo malo rastvorna u vodi [40], gelovi nativne celuloze se ređe prave, jer zahtevaju specifične rastvarače kao što su LiCl/DMAc (litijumhlorid/N,N-dimetilacetamid), NMMO/H<sub>2</sub>O system (N-metilmorfolin-N-oksida monohidrat), NaOH/(tio)urea vodeni system, dvokomponentni rastvarači koji sadrže DMSO (npr. DMSO/formaldehid) ili jonske tečnosti (organske soli amonijuma, imidazolijuma, piridijuma, sa niskom

tačkom topljenja) [41-43]. Svojstva celuloze menjaju se njenom hemijskom modifikacijom. Uglavnom se izvode reakcije esterifikacije i eterifikacije na hidroksilnim grupama glukoznih jedinica, dajuću derivate (celulozo – acetat, celulozo – nitrat, karboksimetil celulozu, etil celulozu i sl.) povećane rastvorljivosti, koji onda mogu dati gelove hemijskim ili fizičkim umrežavanjem [37, 42].

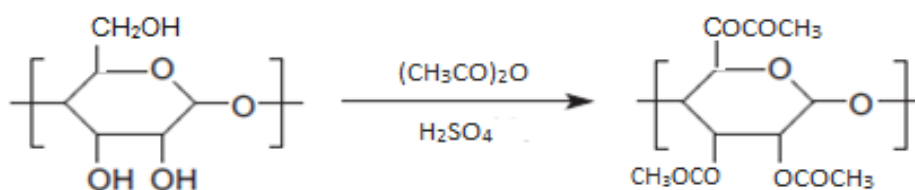
### 2.2.1. Hemijske modifikacije celuloze

Prilikom eterifikacije nativna celuloza dobijena izolovanjem i prečišćavanjem iz biljnog materijala se prvo prevodi u “alkalocelulozu” u prisustvu NaOH ili KOH, koja zatim reaguje sa alkil grupom. Kako postoje 3 moguća mesta eterifikacije (2 sekundarne hidroksilne grupe na ugljenicima C2 i C3 i jedna primarna na C6), moguće je dobiti proizvode različitog stepena supstitucije (DS) i moguće je ponavljati reakciju modifikacije, kako bi se dobio veći stepen supstitucije. Najčešći etri celuloze su: karboksimetilceluloza (koja nastaje eterifikacijom sa hlorsirćetnom kiselinom), metil i etilceluloza (koja nastaje dodatkom metilen ili etilen hlorida), hidroksietil i hidroksipropil celuloza (dodatkom etilen ili propilen oksida). Moguće je sintetisati i mešovite etre celuloze, kao npr. etilhidroksietilcelulozu, reakcijom sa etilhloridom i etilenoksidom, dodatim jedan za drugim ili istovremeno u smeši [44].



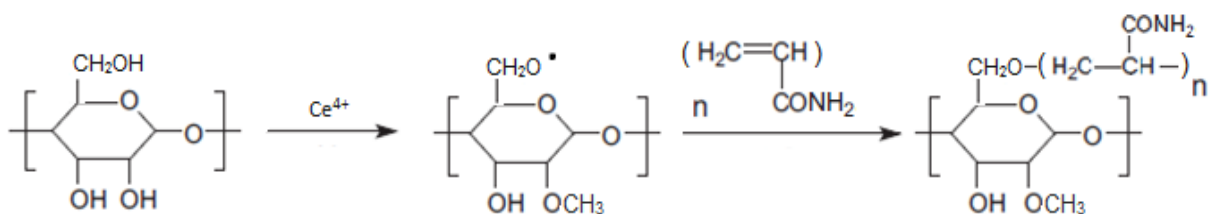
Slika 11. Reakcija metilacije celuloze

Acetatni estar celuloze jedan je od prvih sintetisanih polimera na bio bazi. Pojavljuje se u literaturi još 1865. godine, kada je dobijen zagrevanjem celuloze i anhidrida sirćetne kiseline u staklenoj tubi na 180 °C [45]. Od tada do danas to je postao komercijalno najznačajniji estar celuloze, s' tim da se sada uglavnom sintetise upotrebom sumporne ili perhlorne kiseline kao katalizatora ili rastvaranjem u jonskim tečnostima (slika 12) [46, 47]. Od organskih estara celuloze proizvode se još i celulozo–propionat, celulozo–butirat, celulozo–ksantat, kao i mešoviti estri organskih kiselina (npr. acetato–ftalatni estar celuloze). Komercijalno najznačajniji neorganski estar celuloze je celulozo–nitrat, a pored njega sintetisu se još i celulozo–sulfat, celulozo–sulfonat i celulozo–fosfat [48, 49].



Slika 12. Acetilacija celuloze

Još jedna značajna klasa modifikata celuloze jesu njeni kalemljeni (graft) kopolimeri, nastali kovalentnim vezivanjem bočnih lanaca po površini celuloznog lanca. Graft kopolimerizacija se izvodi na 2 načina: kalemljenje na (grafting to) – reakcijom celuloze preko hidrokسيدne grupe ili njenog acetata sa preaktiviranim polimerom, ili kalemljenjem od (grafting from) – generisanjem aktivne vrste (slobodnog radikala ili jona) na celuloznom lancu, koji ce započeti polimerizaciju monomer [50]. U zavisnosti od toga šta se želi postići modifikacijom, na celulozu se kaleme različite grupe: ako je cilj povećati apsorptivitet, kaleme se hidrofilne grupe, kao što su akrilna kiselina ili akrilamid, ako je cilj adhezija hidrofobnih molekula, kaleme se metakrilat, acetonitril, stiren i sl. [51].



Slika 13. Kalemljenje akrilamida na celulozu, slobodnoradikalском reakcijom iniciranom  $Ce^{4+}$  jonima

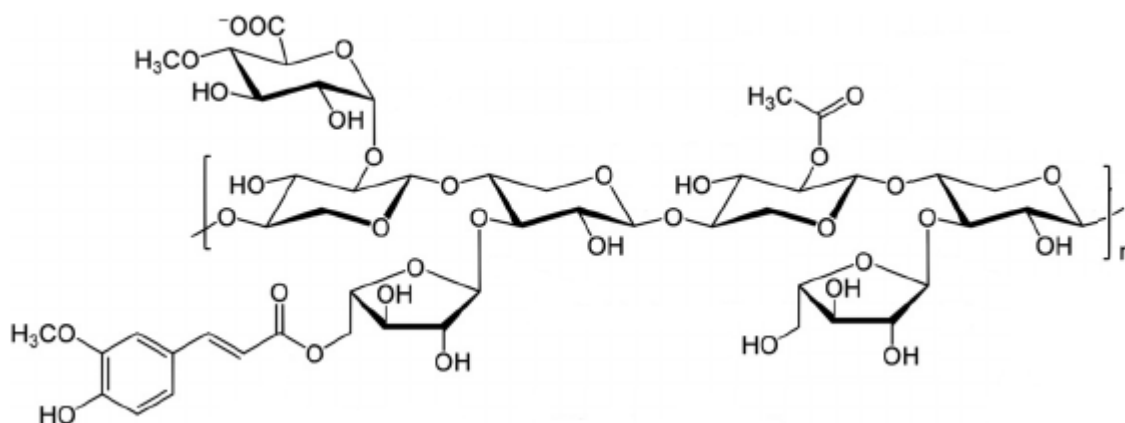
### 2.2.2. Upotreba celuloze i njenih modifikata

Što se tiče upotrebe celuloze, intaktna celuloza se vekovima koristi u građevinarstvu kao osnovni građevinski materijal, u tekstilnoj industriji u formi pamuka i lana, kao i u industriji papira i kartona. Regenerisana celulozna vlakna koriste se za proizvodnju viskoze, hidrolizom celuloze proizvodi se bioetanol, od nanofibrila i mikrokristalne celuloze proizvode se aerogelovi koji se koriste i u NASI [35, 43]. Sa druge strane, celulozni derivati su našli svoje mesto u skoro svim granama industrije i u domaćinstvima. Tako se na primer celulozni superapsorbenti (kao što su derivati karboksimetilceluloze, hidroksietilceluloze, zatim graft modifikati sa akrilnom kiselinom) koriste kao sredstava za ličnu higijenu žena, pelene za bebe, ili kao rezervoari vode u poljoprivredi. U farmaceutskoj industriji modifikati celuloze se koriste kao stabilizatori, komprese za rane, za enkapsulaciju ćelija, a posebno se koriste etri celuloze (metilceluloza, etilceluloza, hidroksipropilceluloza) u proizvodnji tableta, kapsula, kao stabilizatori emulzija, losiona i masti i sl. Estri celuloze (acetat, hidrosipropilmetil ftalat) se koriste kao membrane za prečišćavanje vode, za separaciju gasova, kao fotografski filmovi, različiti kompoziti i sl. [43, 52].

### 2.3. Ksilan

Ksilan (zajedno sa ksiloglukanima, mananima i  $\beta$  - glukanima) pripada klasi polisaharida ćelijskog zida biljaka nazvanih hemiceluloze, koje predstavljaju drugi najzastupljeniji biopolimer u prirodi [53, 54]. Sačinjava do 30% biomase drvenastih i zeljastih biljaka i do 50% biomase trava i žitarica. Njegov udeo u ukupnim obnovljivim izvorima ugljenika na zemlji je 1/3 [55].

Glavni lanac, odnosno kičma polimera izgrađena od  $\beta$  - (1 $\rightarrow$ 4) povezanih ksilopiranoznih jedinica. Ovakav linearni homopolimer nađen je samo u malom broju slučajeva (kod jedne vrste trava, stabljike duvana i semena guar gume) [56-58]. Kod najvećeg broja kopnenih biljaka ksilan se javlja u obliku heteropolimera, kod koga su glavni lanci supstituisani na C2 i C3 atomima ksiloze (slika 14). Najčešći supstituenti su acetil grupa, arabinoza, glukuronska kiselina i njen 4-O-metilestar, a ređe i ferulična i kumarinska kiselina [59-61]. Kod drvenastih biljaka dominantan oblik ksilana je metilglukuronoksilan (O-acetil-4-O-metilglukuronoksilan), a kod trava arabinoglukuronoksilan (arabino-4-O-metilglukuronoksilan) [55, 62].



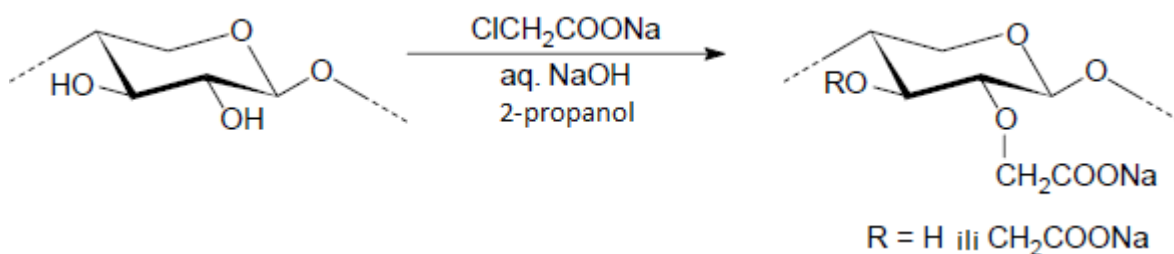
Slika 14. Struktura molekula ksilana sa različitim supstytutentima

U ćelijskom zidu ksilan interaguje sa drugim komponentama koje ulaze u sastav zida. Za lignin se vezuje kovalentno, estarskim i aril - estarskim vezama, pomoću feruličnih i glukuronskih supstituenata ili preko ksilozil i arabinozil jedinica. Kovalentne veze gradi i sa pektinom i proteinima ćelijskog zida, ali se tačna priroda ovih veza još uvek sa sigurnošću ne zna [54, 60]. Sa celulozom, ksilan interaguje velikim brojem vodoničnih veza (za koje su značajni acetilni ostaci) i hidrofilnim i hidrofobnim interakcijama, koje ostvaruje uvijajući se kao dvostruki heliks oko celuloznih vlakana. Pretpostavlja se da ksilan služi kao fleksibilni most između komponenta ćelijskog zida i da kao omotač obavija celulozna vlakna [63, 64].

### 2.3.1. Modifikacije ksilana

Kao i celuloza i alginat, i ksilan je podložan brojnim hemijskim modifikacijama, kako bi dobio odgovarajuća svojstva u zavisnosti od željene primene. Ove modifikacije zasnivaju se uglavnom na reaktivnosti hidroksilnih grupa i zbog toga su to uglavnom reakcije eterifikacije i esterifikacije [65].

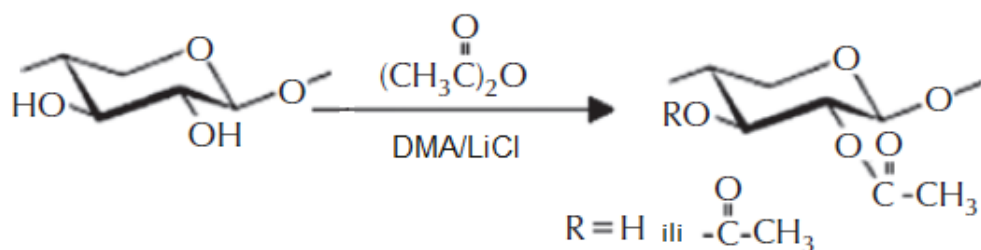
Eterifikacija hemiceluloza izvodi se radi povećanja rastvorljivosti, smanjenja viskoznosti, povećane otpornosti prema dejstvu mikroorganizama i poboljšanja sposobnosti formiranja filmova. Najčešće se izvode reakcije karboksimetilacije, metilacije, benzilacije i sulfoalkilacije. Kao reaktanti se uglavnom upotrebljavaju halogeni ili epoksidi [66]. Karboksimetilacija ksilana radi se u homogenim uslovima (u vodi), ili u gustoj suspenziji (u izopropanolu ili etanol/toluen smeši) uz dodatak baze (NaOH) i monohlorosirćetne kiseline ili njene natrijumove soli (slika 15) [67]. Stepem modifikacije moguće je povećati ponavljanjem reakcija karboksimetilacije [68].



Slika 15. Reakcija karboksimetilacije ksilana

Esterifikacija hemiceluloza se u poslednje vreme posebno često izvodi, jer se na taj način dobijaju termoplastične mase. Esterifikacijom ksilana povećava se njegova hidrofobnost. Osim toga estri ksilana imaju povećanu biorazgradivost i ostale osobine bitne za principe zelene hemije. Najčešće se reakcije esterifikacije rade sa karboksilnom kiselinom i njenim derivatima. Razlikuju se homogeni i heterogeni uslovi reakcije. Homogeni uslovi podrazumevaju rastvaranje ksilana bilo u organskim ili alkalnim rastvaračima, dok u heterogenim uslovima nije neophodno prethodno rastvaranje ksilana [67, 69].

Acetilacija ksilana rađena je u homogenim uslovima sa DMF/LiCl sistemom rastvarača, i heterogenim uslovima bez organskih rastvarača, suspendovanjem ksilana u anhidridu sirćetne kiseline i sa metansulfonskom kiselinom kao katalizatorom. Na isti način mogu se dobiti i estri ksilana i propionske ili buterne kiseline [67, 70]. Kao katalizatori koriste se sumporna kiselina, piridin, 4-dimetilaminopiridin, N-bromosukcinimid i sl. [66]. Reakcija lauroil-hlorida sa ksilanom u jonskim tečnostima, aktivirana je mikrotalasima u mikrotalasnoj pećnici [71]. Sulfacija, tozilacija, nitracija i ksantacija ksilana takođe su moguće, ali još uvek nisu toliko ispitivane [66].



Slika 16. Acetilacija ksilana u jonskim tečnostima

### 2.3.2. Upotrebe ksilana

Dobar, a jeftin izvor ksilana, predstavljaju ostaci iz poljoprivredne proizvodnje, drvne i papirne industrije (slama, stabljike i čokovi kukuruza, šećerna trska, ljuspe pri proizvodnji skroba, piljevina drveta i dr.) [72]. Kako se u Srbiji proizvodi, u proseku, preko 6 miliona tona kukuruza godišnje, a u svetu skoro 800 miliona tona, jasno je da su ostaci kukuruza lako dostupan materijal za izolovanje velike količine ksilana [73]. Ksilan je u čokovima kukuruza zastupljen u dva strukturna tipa: prvi je u vodi rastvoran, gusto razgranati heteroksilan, a drugi arabinoglukuronoksilan, koji ima manje bočnih lanaca i nerastvoran je u vodi [74, 75]. Arabinoglukuronoksilan se izoluje alkalnom ekstrakcijom i sadrži arabinofuranozil i acetatne ostatke zakačene na ksilanoznu kičmu. Ova vrsta ksilana posebno je značajna kao polazna sirovina za proizvodnju biogoriva [76].

Hidrolizom ksilana, osim dobijanja bioetanola, koji se koristi kao biogorivo, dobija se i ksilitol, koji se koristi u žvakaćim gumama, pastama za zube i sličnim proizvodima, kao niskokalorični zaslađivač, koji sprečava nastanak karijesa. Ksilooligosaharidi koriste se kao prebiotici, a pokazano je da imaju i imunostimulatorno i antioksidativno dejstvo. Modifikati ksilana, uvođenjem sulfonatnih i 2-hidroksi sulfonatnih grupa, upotrebljavaju se za proizvodnju



filmova za pakovanje hrane, a sulfonati ksilana koriste se i kao antikoagulansi zbog sličnosti sa heparinom. N-alkil i n-alkanoil ksilani i ksilooligosaharidi koriste se kao surfaktanti, dok se karboksimetilksilan i drugi katjonski derivati upotrebljavaju u papirnoj industriji. Hidrogelovi ksilana, modifikovani (karboksimetilovani, oktadecilovani, sukcinovani...) i kroslinkovani ili mešani sa drugim polimerima (poli(2-hidroksietilmetakrilatom), celulozom, karaginanom...), imaju potencijalnu primenu u kozmetičkoj industriji, tkivnom inženjeringu, dostavljanju lekova, izolaciji i skladištenju gasova [64].

## 2.4. Hidrogel

Gel se može definisati kao meka struktura sastavljena od dve ili više komponenti, od kojih je jedna uvek tečna i ona se nalazi u višku [77]. Hidrogel predstavlja trodimenzionalnu mrežu polimernih lanaca između kojih je voda [78]. Nastaje fizičkim, jonskim ili kovalentnim interakcijama između polimera u rastvoru i odlikuje se visokom sposobnošću apsorpcije [79].

Čovečanstvo se prvi put susrelo sa hidrogelom 1955. godine, kada su češki profesori (Lim i Wichterle) sintetisali poli-2-hidroksietil metakrilat, koji je ubrzo potom upotrebljen u proizvodnji kontaktnih sočiva. Međutim, tek 80-ih godina hidrogelovi su počeli da se modifikuju i za druge primene [80].

### 2.4.1. Podela hidrogelova

Podelu hidrogelova moguće je izvršiti na osnovu različitih kriterijuma. Dalje su navedene samo neke od njih koje se najčešće pominju u literaturi. Po načinu na koji su umreženi dele se na fizičke ili reverzibilne i hemijske ili trajne hidrogelove. Kod fizički umreženih hidrogelova bočni lanci su povezani vodoničnim vezama,

jonskim ili hidrofobnim interakcijama, a kod hemijski umreženih – kovalentnim vezama [81]. Druga podela je na osnovu porekla polimera, na prirodne i sintetske. Od prirodnih izvora za hidrogelove najčešće se koriste polisaharidi (kao što su agarozna ili alginat) i proteini (želatin, kolagen). Od sintetskih hidrogelova najzastupljeniji su poliakrilati, poliakrilamidi, polietilen–glikoli i sl. [78, 82]. Na osnovu naelektrisanja bočnih ostataka razlukujemo: neutralne, jonske (anjonske ili katjonske), cviterjonske (sa pozitivnim i negativnim naelektrisanjima) i amfolitne (sa kiselim i baznim ostacima) [83]. Na osnovu toga da li hidrogelovi prilikom bubrenja pokazuju promene u zavisnosti od faktora sredine, imamo podelu na konvencionalne (kod kojih ne dolazi do promena) i hidrogelove koji odgovaraju na spoljašnje faktore (kao što su temperatura, pH, jonska sila) [84].

#### 2.4.2. Osobine hidrogela

Voda, koja se zadržava između polimernih lanaca, zahvaljujući hidrofilnim funkcionalnim grupama koje poseduju, omogućava slobodnu difuziju rastvornih supstanci unutar hidrogela [85]. Na taj način, ne samo da je omogućeno punjenje hidrogelova različitim aktivnim supstancama i otpuštanje tih supstanci, nego je i olakšano ispiranje od ostataka hemikalija i nusproizvoda u procesu same sinteze hidrogela [86, 87].

Kada dođu u kontakt sa hidrodinamički kompatibilnim rastvorom, hidrogelovi pokazuju sposobnost bubrenja. Sam proces bubrenja nije kontinualan proces. Kada se uspostavi ravnoteža između sila elasticiteta (koje omogućavaju rastezanje hidrogela) i osmotskih sila (koje dovode do prodiranje molekula rastvora unutar strukture gela) bubrenje se zaustavlja [88]. Nabubrela hidrogelovi imaju meku i elastičnu strukturu nalik biološkom tkivu, na čemu se zasniva još jedna značajna osobina hidrogela, a to je biološka kompatibilnost [89].

Biokompatibilnost podrazumeva da hidrogel treba da bude netoksičan, nekancerogen, nemutagen, da ne izaziva alergije i ne utice na plodnost [90]. Ove osobine omogućile su upotrebu hidrogelova u medicini i farmaciji. U suštini, biokompatibilnost je determinisana kontaktom hidrogela sa ćelijama i tkivom domaćina [91]. Prvi korak u određivanje biokompatibilnosti jeste test citotoksičnosti *in vitro*, koji se radi na ćelijama u kulturi, a nakon toga mogu da se rade animalna testiranja *in vivo* i kliničke studije [90, 92].

#### 2.4.3. Načini pravljenja hidrogela

Za dobijanje hidrogelova koriste se metode fizičke i hemijska polimerizacije, a moguće su i kombinacije ovih metoda [93, 94].

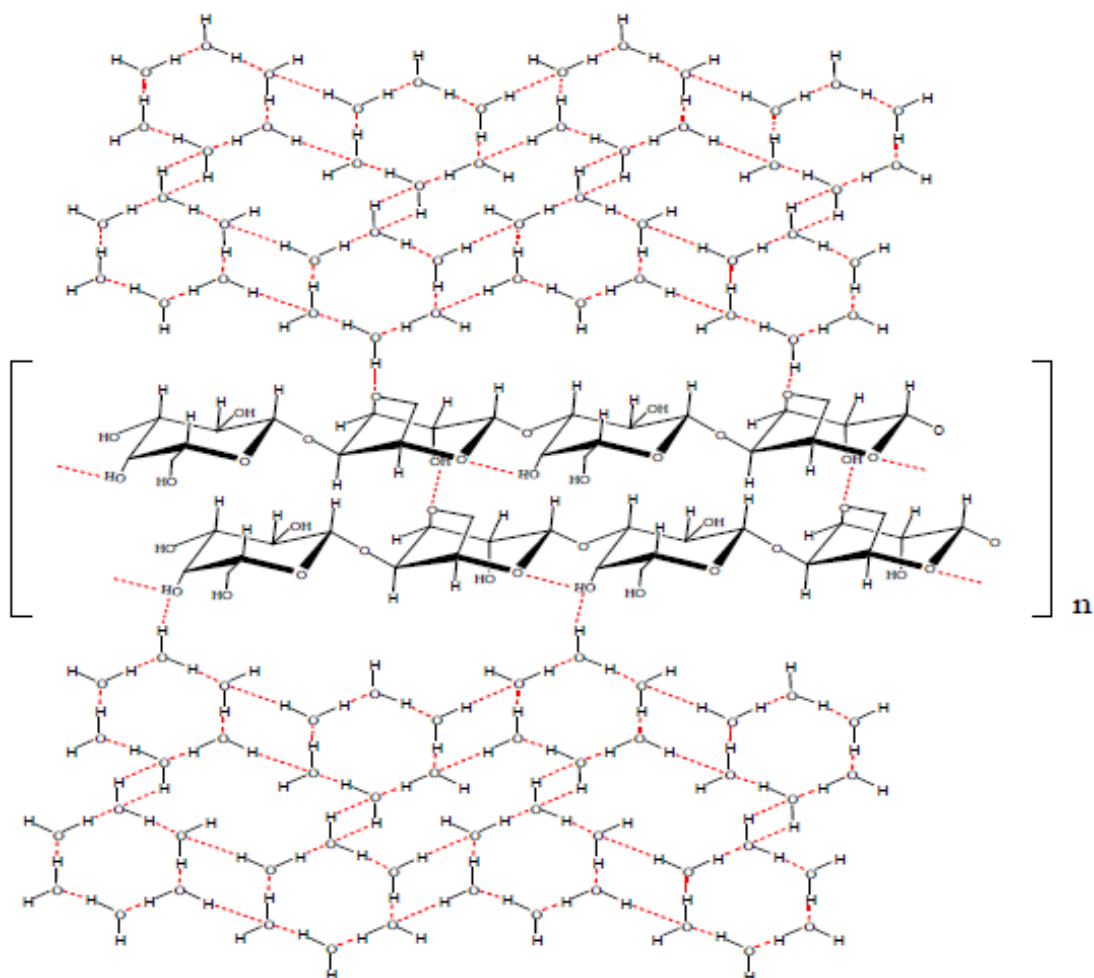
Fizička polimerizacija:

Glavna prednost fizičke u odnosu na hemijsku polimerizaciju je u tome što nema potrebe za dodavanjem umreživača, već do polimerizacije dolazi jonskim i hidrofobnim interakcijama, vodoničnim vezama, kristalizacijom, formiranjem stereokompleksa ili interakcijom sa supramolekulima [82, 94].

Najpoznatiji primer jonske polimerizacije je geliranje alginata jonima  $\text{Ca}^{2+}$ . Ovo se postiže u blagim uslovima, na sobnoj temperaturi i fiziološkom pH. Osim alginata i neki drugi polimeri, kao što su akrilni polimeri, pektin, karboksimetil celuloza ili gelan guma, mogu formirati gelove u prisustvu multivalentnih katjona ( $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ) [95, 96]. U primere jonske polimerizacije spada i geliranje hitozana pomoću tripolifosfata (TPP) [97, 98].

Amfifilni polimeri u vodenom rastvoru sa povećanjem temperature formiraju hidrogel zahvaljujući hidrofobnim interakcijama. Na nižim temperaturama ovi polimeri su rastvorni u vodi. Sa povećanjem temperature dolazi do agregacije hidrofobnih delova (gelatora), kako bi se minimizovala hidrofobna površina u dodiru sa vodom i prelaska u stanje gela [99]. Polisaharidi koji mogu formirati hidrogel ovim putem su hitozan, dekstran i pululan, a od sintetskih polimera koriste se kopolimeri PEG i poli(L-mlečne kiseline) (PLLA), polietilen oksida (PEO) i polipropilen oksida (PPO) i slični [94, 99].

Agarozni gelovi, koji se masovno koriste za elektroforeze, nastaju intra- i intermolekulskim formiranjem vodoničnih veza molekula agaroze u vodenom rastvoru (slika 17) [100].



Slika 17. Model nastanka agaroznog gela u rastvoru. Vodonične veze su predstavljene crvenim tačkicama (Tako at all. 2014.)

Karboksilne grupe poliakrilne (PAA) i polimetakrilne kiseline (PMA) formiraju vodonične veze sa kiseonicima na polietilen glikolu (PEG), što dovodi do bubrenja na nižim pH vrednostima i prelaska u gel [94].

Primer umrežavanja kristalizacijom su polimeri polivinil alkohola (PVA), koji u procesu zamrzavanja i odmrzavanja daju jake i elastične gelove. Homopolimeri L- i D- enantiomera mlečne kiseline formiraju hidrogel procesom

stereokompleksacije, dok se proteini dobijeni genetičkim inženjeringom (sa ponavljajućim blokovima nalik elastinu i svili ili leucin-ziper motivima) i antitelo-antigen interakcije najčešće koriste u supramolekulskoj polimerizaciji [101].

Hemijska polimerizacija:

Hidrogelovi nastali hemijskom polimerizacijom, odnosno povezivanjem kovalentnim vezama, su mehanički stabilni i to je njihova glavna prednost [82]. U ovu metodu spadaju hidrogelovi nastali: radikalskom polimerizacijom, hemijskim reakcijama komplementarnih grupa, zračenjem visoke energije i enzimskom polimerizacijom [101].

Radikalska polimerizacija podrazumeva prisustvo bifunkcionalnog agensa koji služi za umrežavanje polimera ili monomera, takozvanog kroslinkera. Postoji veliki broj kroslinkera koji se koriste u ovu svrhu, a najčešći su: metilen bisakrilamid (akrilamidni gelovi), etilen glikol dimetakrilat (metakrilatni gelovi) dialdehid ili formaldehid (želatinski i albuminski gelovi) [49, 102].

Hidrofilni polimeri mogu formirati hidrogelove hemijskim reakcijama komplementarnih grupa. Hidroksil, karboksil i amino grupe učestvuju u reakcijama formiranja amidne veze, Šifove baze ili poliuree i poliuretana [103].

Hidrogelovi mogu nastati radijacionim zračenjem visoke energije, kao što je zračenje snopom elektrona,  $\gamma$ -zracima ili x-zracima [81, 104]. Na taj način direktno nastaju slobodni radikali polimernih lanaca u rastvoru, koji se onda međusobno umrežavaju, ili pak dolazi do radiolize vode i nastanka hidroksil radikala, pa preko njega indirektno nastaju makroradikali na lancima [83, 105]. Glavna prednost ovog načina je što se dobijaju čisti hidrogelovi, jer se ne dodaju nikakve

supstance kao inicijatori i to što su gelovi ujedno i sterilisani zračenjem, što je od posebnog značaja za direktnu biomedicinsku primenu [104]. Najčešće se koristi za pravljenje hidrogelova polivinil alkohola, polietilen glikola i poliakrilne kiseline [83].

Upotreba enzima u sintezi hidrogela omogućila je da se predvidi i kontroliše kinetika geliranja, da se poveća stepen umrežavanja u zavisnosti od količine dodatog enzima i da se izbegnu neželjene sekundarne reakcije polimerizacije, zahvaljujući njihovoj visokoj specifičnosti. Tipični primeri enzima koji se najčešće koriste u reakcijama umrežavanja polimera su transglutaminaza i peroksidaza iz rena (HRP) [106].

#### 2.4.4. Prednosti i mane hidrogela

Glavne prednosti hidrogela su:

- Biokompatibilnost
- Biorazgradivost i apsorptivnost
- Lako se modifikuju
- Imaju dobre transportne osobine
- Vremensko oslobađanje supstanci (*time release*)

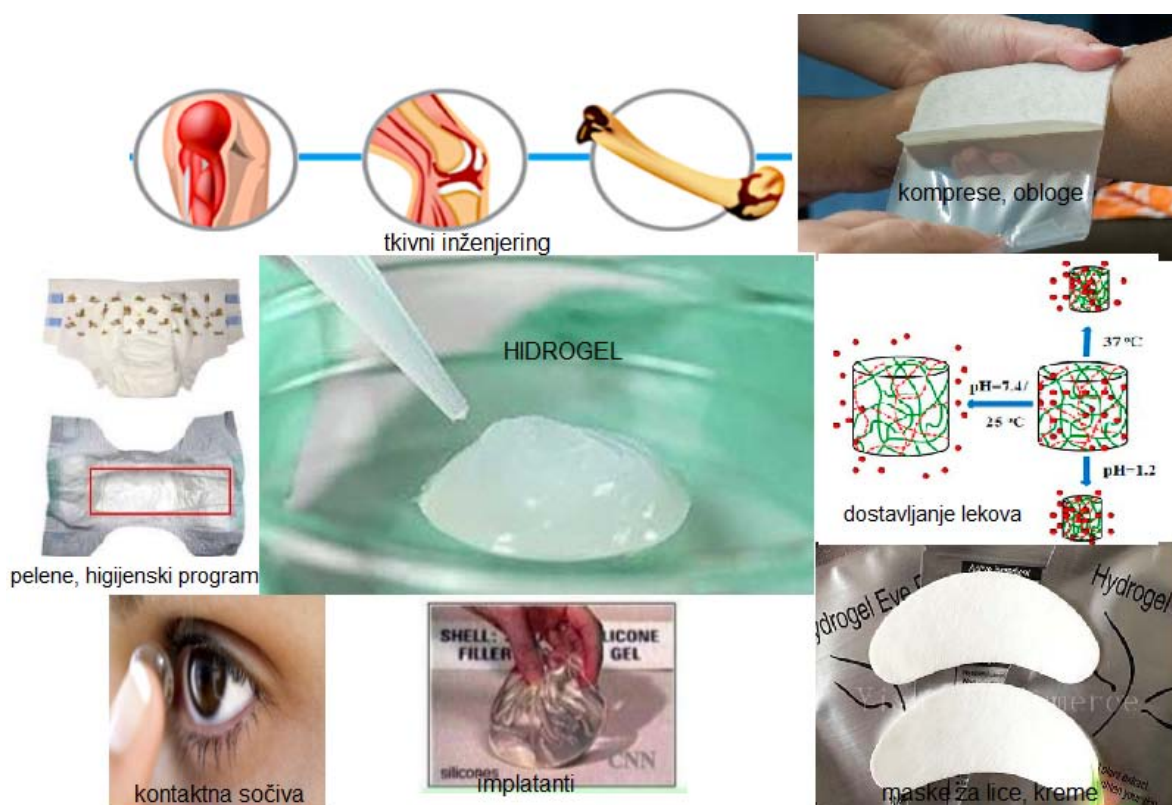
Nedostaci:

- Visoka cena
- Slabe mehaničke osobine
- Mogu biti nezgodni za rukovanje i oblikovanje
- Neadherentnost

- Neki od njih mogu biti nezgodni za punjenje i sterilizaciju [107]

#### 2.4.5. Upotreba hidrogelova

Hidrogelovi su svoju primenu najviše našli u farmaceutskoj industriji i biomedicini, kao i u poljoprivredi i zaštiti životne sredine, ali i u gotovo svim poljima svakodnevnog života (slika 18) [81].



Slika 18. Neke od brojnih upotreba hidrogela

Kontaktne sočive, koje se prave od hidrogelova, mogu biti tvrde, meke i gasno propusne. Tvrde se izrađuju od poli(metakril metakrilata), meke od 2-hidroksietil metakrilata, polidimetilsiloksana ili silikona, a gasno propusne od



kopolimera akrilata, silikon akrilata i fluorsilikon akrilata. Tkivni ekspanderi, koji se koriste u rekonstruktivnoj hirurgiji, prave se na bazi silikonskih guma, dok u plastičnoj hirurgiji silikonske gelove sve češće zamenjuju oni na bazi hijaluronske kiseline. Brojne maske za lice, koje se prodaju u kozmetičkoj industriji, napravljene su na bazi hidrogelova kolagena, hijaluronske kiseline i polivinilpirolidona. Neorganski silikonski hidrogelovi i organski od želatina, poliakrilata ili polivinil alkohola koriste se kao matriksi u elektronici [96, 108]. U industriji hrane, materijali za pakovanje, boje, punila, lubrikanti se prave od celuloze, ksilana, skroba, polilaktične kiseline, prirodne gume i sl. [109]. Pelene, sanitarni peškiri i maramice prave se na bazi gelova poliakrilamida, polivinil alkohola, modifikata celuloze ili alginata. Najsavremenija sredstva za tretman rana bazirana su upravo na hidrogelovima. Njihova prednost je što apsorbuju višak ekshudata, ali omogućuju da rana ostaje vlažna, da postoji protok gasova, održavaju ranu sterilnom, zadržavaju neprijatne mirise i bakterije, koje mogu i uništiti dodatkom antimikrobnih supstanci kao što su srebro ili jod. Najčešće su napravljeni od alginata, karboksimetil celuloze, želatina, pektina, poliuretana, polietilen i polipropilen glikola [110].

Uklanjanje jona teških metala i boja može da se obavlja pomoću savremenih hidrogelova. Gelovi polisaharida sa ili bez magnetnih osobina mogu se koristiti za prečišćavanje voda. Tako se, na primer, gelovi hitozana mogu koristiti za uklanjanje jona  $Zn^{2+}$ , sa dodatkom akrilne kiseline, metilen-bisakrilamida i magnetnih čestica za uklanjanje  $Cd^{2+}$  i  $Pb^{2+}$ , joni se iz vodenih rastvora mogu ukloniti kompozitnim hidrogelom na bazi polietilen, poliakrilnog hidrogela skroba i sl. Katjonske boje mogu se adsorbovati na hidrogelove guar gume sa akrilnom kiselinom, graft gelove celuloze sa metakrilnom kiselinom ili hitozana sa akrilnom. Hidrogelovi se mogu koristiti kao matriks i držač za mikroorganizme koju prečišćavaju vodu, pre svega algi roda *Chlorella* i *Spirulina*. Ovi mikroorganizmi

inkapsuliraju se unutar hidrogelova alginata, agra ili karaginana i uklanjaju zagađivače iz vode. Što se tiče upotrebe u poljoprivredi, hidrogelovi poliakrilamida, polivinil alkohola, alginata, karboksimetilceluloze i pektina se najviše koriste za oslobađanje đubriva i pesticida (kojima se prethodno impregniraju) u zemljište [108, 109].

Uloga hidrogela u tkivnom inženjeringu može biti trostruka: kao materijal za popunjavanje prostora tzv. biološki lepak, kao sredstvo za dostavljanje bioaktivnih supstanci i kao trodimenzionalna struktura koja organizuje ćelije i prenosi stimuluse omogućujući razvitak tkiva. Alginat, agaroz, kolagen, fibrin, želatin, hitozan, hijaluronska kiselina su biomaterijali koji se koriste u ovoj važnoj oblasti. Alginat se na primer, koristi za regeneraciju i proizvodnju kostiju i hrskavica. Porozna struktura hidrogela omogućava da oni budu napunjeni lekovima, koje će zatim otpustiti na kontinuiran i kontrolisan način. Mnogi od njih mogu menjati svoje osobine i odgovor na spoljašnji stimulus, i zato se nazivaju pametni hidrogelovi. [82] Dostavljanje lekova može biti oralno, transdermalno, nazalno i okularnim putem, a hidrogelovi koje se koriste u ove svrhe su alginatni (modifikovan ili kompleksiran sa drugim polimerima, npr. želatinom), hijaluronska kiselina (i njeni derivati sa povećanim brojem karboksilnih grupa), hitozan (i njegovi karboksimetil i tiol derivati, ili u kompleksu sa alginatom), celuloza (hidroksietil i hidroksipropil) [111, 112].

### 3. EKSPERIMENTALNI DEO

#### 3.1. Imobilizacije u alginatnim hidrogelovima

##### 3.1.1. Imobilizacija native peroksidaze u kuglicama nativnog alginata

Napravljen je 2% (w/v) rastvora alginata (Na - alginat, niskog viskoziteta, Sigma) u destilovanoj vodi, i u njega dodat rastvor peroksidaze iz rena (HRP tip II) (1 mg/ml) do finalne koncentracije od 0,01 mg/ml. Ovaj rastvor je nasut u medicinski špric sa iglom, koji je pričvršćen iznad vodenog rastvora  $\text{CaCl}_2$  (5.5 %) u čaši. Kuglice nastaju tako što alginat iz šprica kaplje u rastvor  $\text{CaCl}_2$ , koji se konstantnom brzinom meša na magnetnoj mešalici. Nakon sat vremena mešanja (da kuglice očvrstnu), kuglice se procede i isperu, a zatim čuvaju u HEPES puferu (10 mM, pH 7,0) sa 5 mM  $\text{CaCl}_2$  na temperaturi od 4 °C.



Slika 19. Izgled aparature za pravljenje kuglica

### 3.1.2. Aktivacija alginata oksidacijom

1 g Na–alginata je sipan u 100 ml 50 mM rastvora Na–perjodata i ostavljen na mračno i hladno (4 °C) mesto preko noći. Nakon 24 sata reakcija se stopira dodatkom ekvimolarne količine glicerola. Zatim se rastvor precipitira trostrukom zapreminom etanola, uz dodatak NaCl (2 g), kako bi se poboljšalo taloženje. Precipitat se rastvori u 10 ml destilovane vode i dijalizuje 24 h, radi potpunog uklanjanja perjodata i ostataka hemikalija. Nakon toga, polimer je ponovo precipitiran etanolom (apsolutnim) i ispran njime tri puta. Na kraju, polimer se osuši ispiranjem acetonom i sušenjem na vazduhu na sobnoj temperaturi.

### 3.1.3. Imobilizacija nativne peroksidaze u kuglicama oksidovanog alginata

U 0,2 M bikarbonatnom puferu pH 8,0 rastvori se, mešajući, oksidovani alginat do koncentracije od 2% (w/v). U njega se doda HRP (tip II, 181 U/mg) do finalne koncentracije 0,01 mg/ml i ostavi 24 h na 4 °C. Na kraju se dodaje, kap po kap, 50 mM Tris pufer (pH 7,0) da bi se neutralisale eventualno zaostale nekuplovane karbonilne grupe (do ¼ finalne zapremine). Ovaj rastvor se meša sa nativnim alginatom (2% w/v) u odnosu 1:1, kako bi mu se poboljšala mehanička svojstva. Dalje se kuglice prave na isti način kao što je opisano za nativni alginat.

### 3.1.4. Modifikacija peroksidaze etilendiaminom i njena imobilizacija

1 mg HRP se rastvori u 2 ml 50 mM bikarbonatnog pufera (pH 8,0) i u to se doda 200 µL 50 mM Na-perjodata. Rastvor se ostavi na tamno i hladno (4 °C) mesto, uz povremeno mešanje tokom 6 sati. Nakon toga, doda se 10 µl glicerola i nastavi sa mešanjem jos pola sata. Na kraju, rastvor se dijalizuje naspram destilovane vode.

Perjodatom oksidovana HRP se dalje meša sa etilendiaminom (finalne koncentracije 50 mM, na pH 8,0) i nakon 2 sata dodaje se NaBH<sub>4</sub> (do finalne koncentracije 1 mg/ml) u 0,1 M rastvoru NaOH. Posle sat vremena stajanja u frižideru (na 4 °C), neizreagovani etilendiamin se uklanja dijalizom najpre naspram 0,1 M fosfatnog pufera pH 7,0, pa naspram destilovane vode. Modifikovana peroksidaza čuva se u zamrzivaču na -20 °C.

Imobilizacija aminovane peroksidaze u kuglicama oksidovanog alginata izvodi se po istom postupku opisanom za nativni enzim.

### 3.1.5. Aminacija perjodatno oksidovanog alginata

0,4 g oksidovanog alginata se rastvori u 10 ml bikarbonatnog pufera (pH 8,0) i pomeša sa 10 ml 0,1 M etilendiamina. Smeša se ostavi na tamnom pola sata, a potom se doda 0,05 g  $\text{NaBH}_3(\text{CN})$  i ostavi preko noći u kapeli. Nakon toga rastvor se dijalizuje naspram destilovane vode i koncentruje na vakuum uparivaču.

Modifikovan enzim se imobilizuje u aminovanom alginatu po već navedenoj proceduri.

### 3.1.6. Enzimska aktivnost

Za određivanje aktivnosti peroksidaze, pripremljen je rastvor pirogalola (13 mM) u 10 mM HEPES puferu, pH 7,0. U 3 ml ovog rastvora dodaju se kuglice sa imobilizovanim enzimom (50–80 mg) i 30  $\mu\text{l}$  0,97 M  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Smeša se konstantno meša na magnetnoj mešalici, a alikvoti se uzimaju na 0, 5, 10 i 15 minuta i meri im se apsorbanca na spektrofotometru na 420 nm. Jedna jedinica enzimske aktivnosti HRP (U) je definisana kao ona količina enzima koja nagradi 1 mg purpurogalina od pirogalola u 20 sekundi na pH 7,0 i 20 °C.

Nevezana aktivnost je merena u rastvoru  $\text{CaCl}_2$  u koji su ukapavane kuglice. Curenje enzima je mereno u puferu u kom su čuvane kuglice (HEPES pufer sa 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,0) nakon dan, dva i pet dana, a zadržana aktivnost u kuglicama je merena posle pet dana.

Specifična aktivnost imobilizata je mera njegove aktivnosti i predstavlja broj mikromolova supstrata koje će jedinica mase imobilizovanog enzima sa nosačem

transformisati u jednom minutu. Prinos imobilizacije predstavlja odnos specifične aktivnosti imobilizata i količine vezanih enzimskih jedinica po jedinici mase nosača.

### 3.1.7. Sinteza dehidrogenatnih polimera (DHP)

DHP je sintetisan iz koniferil–alkohola enzimskom polimerizacijom pomoću peroksidaze iz rena. U 50 mM fosfatni pufer pH 7,3 dodato je 5 mM koniferil-alkohola, 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 25 pM HRP, i mešano 48 h na temperaturi od 25 °C. Dobijena suspenzija je centrifugirana na 5000 rpm, a talog je ispran 2 puta puferom i 2 puta dejonizovanom vodom. Dobijeni polimer je osušen na vazduhu i čuvan na sobnoj temperaturi.

### 3.1.8. Mešanje DHP sa alginatom i pravljenje gela

Napravljen je rastvor alginata, rastvaranjem 0,2 g Na-alginata u 9,5 ml destilovane vode i rastvor DHP u dimetilsulfoksidu, rastvaranjem 10 mg DHP u 0,5 ml DMSO. Rastvori se pomešaju, dajući mlečnu suspenziju koncentracije 1% (w/v) DHP i 2% (w/v) alginata. Ovaj rastvor je korišten kao štok rastvor, od kog su razblaživanjem pravljene različite koncentracije, pri čemu je za dobijanje hidrogela dodavan rastvor CaCl<sub>2</sub> u finalnoj koncentraciji 0,5 % (w/v).

### 3.1.9. Mikroorganizmi

Gram negativni (*Enterobacter cloacae* humani izolat, *Escherichia coli* ATCC 35210, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 i *Salmonella enterica* serovar

*Typhimurium* ATCC 13311) i Gram pozitivni bakterijski sojevi (*Bacillus cereus* klinički izolat, *Listeria monocytogenes* NCTC 7973, *Micrococcus flavus* ATCC 10240 i *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) su dobijeni u Laboratoriji za mikologiju, Odeljenja za fiziologiju biljaka, Instituta za Biološka istraživanja Siniša Stanković, Beograd. Sve bakterije su kultivisane na Mueller - Hinton agaru, na 37 °C, 24 h.

### 3.1.10. Antibakterijska aktivnost

Antibakterijski testovi rađeni su mikrodilucionom metodom u mikrotitar pločicama [113, 114], sa koncentracijom bakterija od  $1,0 \times 10^5$  ćelija/ml. Najpre je testirana dozna zavisnost DHP u 5% rastvoru DMSO, a potom štok rastvor DHP u alginatu, uz dodatak  $Ca^{2+}$ . Eksperiment je rađen dodavanjem odgovarajuće zapremine rastvora u Tryptic Soy broth (TSB) medijum (100  $\mu$ l) sa bakterijskim inokulumom. Mikropločice se inkubiraju na rotacionom šejkeru (160 rpm) 24 sata na 37 °C.

Najmanja koncentracija DHP koja dovodi do toga da nema vidljivog rasta bakterija (posmatrano na binokularnom mikroskopu), se definiše kao koncentracija koja potpuno inhibira rast bakterija (minimalna inhibitorna koncentracija – MIC). MIC su takođe potvrđene i kolorimetrijskim testom vijabilnosti zasnovanim na redukciji INT (2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolijum hlorid) boje u poređenju sa pozitivnom kontrolom za svaki soj [113, 114]. Minimalna baktericidna koncentracija (MBC) definisana je kao najmanja koncentracija koja ubija 99,5% početnog inokuluma, i određuje se serijom subkultivacija 2 početnog inokuluma u 100 $\mu$ L medijuma, i inkubacije od 24 sata. Optička gustina suspenzije u bunarićima na 655 nm praćena je pomoću uređaja Microplate ManagerR 4.0 (Bio-Rad Laboratories). Antibiotici streptomycin (Sigma P 7794) i



ampicilin (Panfarma, Beograd) u sterilnom fiziološkom rastvoru bili su pozitivna kontrola.

Svi eksperimentu su rađeni u duplikatu, a rezultati analizirani pomoću jednostepene analize varijanse (ANOVA) i Tukijevog (Tukey) HSD testa (sa  $\alpha = 0,05$ ) i izraženi su kao srednja vrednost i standardna greška.

### 3.2. Imobilizacija amiloglukozidaze u tiramin-ksilanskim hidrogelovima

#### 3.2.1. Izolovanje ksilana alkalnom ekstrakcijom

U 400 ml 1,8 M rastvora NaOH, doda se 20 g osušenih i samlevenih čokova i sve se stavi da se meša na magnetnu mešalicu na 60 °C 2 sata. Rastvor se procedi, pa neutrališe hlorovodoničnim kiselinom. Zatim se doda trostruka zapremina etanola (96-99%) i ostavi u frižider preko noći (na 4°C). Talog se procedi, sakupi i ispere 3 puta etanolom. Na kraju se ispere acetonom i osuši na vazduhu.

#### 3.2.2. Karboksimetilacija ksilana

5 g ksilana se rastvori u 25 ml 25% rastvora NaOH. Doda se 35 ml 2-propanola i meša na magnetnoj mešalici pola sata. Zatim se doda 4.39 g SMCA (Na-monohloroacetat) i nastavi mešanje još 70 minuta na temperaturi od 65 °C. Rastvor se neutrališe razblaženom sirćetnom kiselinom i precipitira etanolom. Precipitat (CMX - karboksimetilksilan) se ispere prvo 65% etanolom, a onda još 3 puta apsolutnim etanolom i osuši na vazduhu.

Za drugu karboksimetilaciju ovaj postupak se ponavlja sa molarnim odnosom CMX: SMCA: NaOH = 1: 4: 4,1.

### 3.2.3. Perjodatna oksidacija karboksimetilksilana

0,14 g polisaharida se rastvori u 10 ml destilovane vode i doda se 2,5 ml rastvora Na-perjodata, tako da odnosi perjodata i polisaharida budu: 5% (3 mM), 10% (6 mM), 15% (9 mM) i 20% (12 mM). Sve se ostavi na tamno preko noći u frižider na 4 °C. Reakcija se prekida dodatkom 0,7 ml glicerola i meša pola sata, a zatim se doda 0,07 g NaCl da se pospeši taloženje etanolom. Taloženje se izvodi dodatkom 20 ml 96% etanola i talog se odvoji centrifugiranjem. Talog se rastvori u 10 ml destilovane vode, zatim se ponovo doda 0,02 g NaCl i 20 ml etanola i talog centrifugira. Postupak rastvaranja i taloženja se ponovi još jednom (uz dodatak 0,01 g NaCl), zatim se talog ispere apsolutnim etanolom i osuši na vazduhu.

### 3.2.4. Kuplovanje oksidovanih polisaharida sa tiraminom

Oksidovani polisaharidi se rastvore u 10 ml fosfatnog pufera pH 6,0 uz dodatak 0,15 g tiramin - HCl. Rastvori se mešaju pola sata, a zatim im se doda 0,05 g NaBH<sub>3</sub>CN i ostave u kapeli preko noći. Ujutru se u rastvore doda NaCl do koncentracije od 1 M i 20 ml etanola. Talog se odvoji centrifugiranjem, zatim rastvori u vodi i ponovo staloži uz dodatak NaCl i etanola. Na kraju se talog ispere etanolom i osuši na vazduhu. Osušeni modifikovani polimeri se čuvaju u zamrzivaču na -20 °C.

### 3.2.5. UV – spektri modifikovanih polimera i koncentracija fenolnih grupa

Pripreme se 0,1% rastvori modifikovanih polimera različitih stepena oksidacije i nemodifikovani polimeri u destilovanoj vodi. Svim rastvorima se snimi spektar u UV oblasti od 200-380 nm na UV-Vis spektrofotometru (Shimadzu Corporation UV-2501PC, Japan). Rastvoru 0,01 % tiramina u vodi se takođe snimi spektar i na osnovu apsorbance za tiramin izračuna se koncentracija fenolnih grupa u svakom polimeru, kao i njihov broj po jedinicama glukoznih monomera.

### 3.2.6. Titracija jonizabilnih grupa

Napravljeni su 1% rastvori polisaharida u 50 mM rastvoru KCl. Svim rastvorima se pomoću HCl podesi početno pH na vrednost oko 2, a zatim se rastvori titruju 0,5 M NaOH do pH 10, i utrošene zapremine zabeleže. Zapremina NaOH utrošena za titraciju rastvora KCl se oduzme od dobijenih vrednosti, i ubacuje u formulu:

$$C_{\text{titranta}} \times V_{\text{titranta}} = C_{\text{analita}} \times V_{\text{analita}}$$

gde iz koncentracije i zapremine titranta (rastvora NaOH) i zapremine analita, određujemo njegovu koncentraciju, odnosno koncentraciju jonizabilnih grupa.

### 3.2.7. FT-IR (Furijeova transformacijska infracrvena) spektroskopija

Za FT-IR analizu korišćen je uređaj Nicolet 6700 Thermoscientific spektrometar sa ATR (prigušenom totalnom refleksijom) metodom. Snimljeni su spektri nativnog, karboksimetilovanog i tiramin – modifikovanog ksilana u oblasti od 400 do 4000  $\text{cm}^{-1}$ , na 25 °C i sa 4  $\text{cm}^{-1}$  rezolucije.

### 3.2.8. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Osušeni praškasti karboksimetilksilan i modifikovani ksilan koji je 20% oksidovan, su prekriveni zlatnom prašinom pomoću uređaja za raspršivanje, model LEICA SCD005. Nakon toga su posmatrani i snimljeni na skenirajućem elektronskom mikroskopu model JEOL JSM-6610LV.

### 3.2.9. Pravljenje kuglica u emulziji

60 mg modifikovanog polimera se rastvori u 150  $\mu$ l 50 mM Tris pufera pH 7,0. Po rastvaranju dodaju se 0,5 U HRP i 1 U glukoza oksidaze (GOx) i različite koncentracije amiloglukozidaze. Na kraju se dodaje glukoza (finalne koncentracije 0,133 M) tako da ukupna zapremina smeše iznosi 0,3 ml, sve se brzo promeša i sipa u 3% rastvor Span-a 80 u lakom mineralnom ulju (Light Mineral Oil). Kuglice se dobijaju mešanjem 15 minuta na magnetnoj mešalici, a zatim se reakcija prekida dodatkom 1 ml 0,5% rastvora Triton X-100 u 5% CaCl<sub>2</sub>. Kuglice se mešaju još 5 minuta, a zatim se odvoje centrifugiranjem i ispiraju dok ispirak ne postane bistar (3 puta sa po 1 ml 0,5% rastvora Triton X-100 u 5% CaCl<sub>2</sub>, pa 3 puta sa po 1 ml 5% CaCl<sub>2</sub> u destilovanoj vodi).

Rastvori za ispiranje se prikupe za određivanje količine enzima koja se nije vezala, a zapremine rastvora i zapremina kuglica se zabeleže. Isprane kuglice čuvaju se u 0,1 M acetatnom puferu pH 4,75 u frižideru (na 4 °C).

### 3.2.10. Optička mikroskopija

Napravljene kuglice modifikovanih polimera posmatrane su pod optičkim mikroskopom Carl Zeiss Axio Observer.Z1. Kuglice su slikane pri uveličanju od 50 puta i određena je prosečna veličina kuglica u jednom vidnom polju (na uzorku od oko 50 kuglica).

### 3.2.11. Merenje aktivnosti amiloglukozidaze

0,25 ml uzoraka (ispiraka ili kuglica u suspenziji (gde je koncentracija kuglica 40-60%)) se dodaje u 1 ml 0,5% škroba u acetatnom puferu, uz mešanje. Nakon 20 i 40 minuta uzima se 0,5 ml reakcione smeše i sipa u 0,5 ml stop reagensa (DNS - 3,5-dinitrosalicilna kiselina) i kuva u ključalom vodenom kupatilu 5 minuta. Nastali redukujući šećeri kvantifikuju se Bernfeld-ovom metodom (spektrofotometrijski na 540 nm) [115].

1 U amiloglukozidaze se definiše kao ona količina enzima koja iz rastvornog škroba za 1 minut na pH 4,75 i temperaturi od 25 °C oslobodi redukujuće šećere ekvivalentne 1  $\mu$ mol glukoze.

### 3.2.12. Temperaturna stabilnost

Termostabilnost za slobodan (rastvoran) i imobilizovan enzim je određivana inkubiranjem rastvornog enzima i imobilizata u acetatnom puferu (pH 4,75) na temperaturi od 60 °C (u termobloku model Grant QBD21). Nakon određenih vremenskih intervala uzimani su alikvoti, preinkubirani na 25 °C, a zatim im je merena rezidualna aktivnost.

### 3.2.13. pH optimum

pH optimum za slobodnu i imobilizovanu amiloglukozidazu određen je merenjem enzimske aktivnosti u 0,5% rastvoru skroba u 50 mM citratno - fosfatnom puferu pH opsega 3–7.

### 3.2.14. Kinetičke konstante

Rastvori skroba u koncentracijama 0,28–11 mmol/l korišteni su za određivanje kinetičkih konstanti  $K_m$  i  $V_{max}$ , slobodne i imobilizovane amiloglukozidaze. Konstante su određene pomoću *Michaelis - Menten*-ovog kinetičkog modela, primenom nelinearne regresione analize u Origin softveru.

### 3.2.15. Operativna stabilnost

Operativna stabilnost imobilizata testirana je repetitivnom upotrebom u bač reaktoru sa mešanjem. U 1 ml acetatnog pufera (pH 4,75) i 1 ml 0,5% skroba se doda 0,5 ml kuglica. Najpre na svakih 15 minuta, a potom na pola sata, uzima se alikvot od po 0,05 ml, razblaži 10 puta puferom i sipa u 0,5 ml DNS reagensa. Apsorbanca se meri na 540 nm. Svaki ciklus je trajao 3 sata, nakon čega su kuglice ispirane puferom i ponovo korištene.

## 3.3. Imobilizacija ketoprofena u tiramin-karboksimetil-celuloznom hidrogelu

Karboksimetil-celuloza (proizvođača Sigma - Aldrich) modifikovana je perjodatom i tiraminom po istom protokolu kao karboksimetilksilan. 0,14 g CMC

se rastvori u 10 ml destilovane vode i doda se 2,5 ml rastvora Na-perjodata, tako da odnosi perjodata i CMC budu: 5% (3 mM), 10% (6 mM), 15% (9 mM) i 20% (12 mM). Reakcija se odvija preko noći na tamnom u frižider na 4 °C. Nakon toga se prekida dodatkom 0,7 ml glicerola i meša 30 minuta, a zatim se doda 0,07 g NaCl i 20 ml 96% etanola i talog se odvoji centrifugiranjem. Talog se rastvori u 10 ml destilovane vode, zatim se ponovo doda 0,02 g NaCl i 20 ml etanola i talog centrifugira. Postupak rastvaranja i taloženja se ponovi još jednom (uz dodatak 0,01 g NaCl). Oksidovani polimeri se isperu apsolutnim etanolom i osuše na vazduhu.

Oksidovani polisaharidi rastvore se u 10 ml fosfatnog pufera pH 6,0, pa se doda 0,15 g tiramin - HCl. Rastvori se mešaju pola sata, a zatim se sipa 0,05 g NaBH<sub>3</sub>CN i ostavi u kapeli preko noći. Ujutru se u rastvore doda NaCl do koncentracije od 1 M i 20 ml etanola. Talog se odvoji centrifugiranjem, zatim rastvori u vodi i ponovo staloži uz dodatak NaCl i etanola. Na kraju se talog ispere etanolom i osuši na vazduhu. Osušeni modifikovani polimeri se čuvaju u zamrzivaču na -20 °C.

### 3.3.1. UV – spektroskopija i titracija modifikata Tyr – Cel

0,1 % (w/v) vodenim rastvorima CMC i dobijenih modifikata Tyr – Cel (koji su perjodatno oksidovani 5, 10, 15 i 20%) snimljeni su spektri u UV oblasti. Poređenjem sa spektrom tiramina određene su koncentracije uvedenih fenolnih grupa za svaki stepen modifikacije. 1% rastvori CMC i modifikata u 50 mM KCl-u, titrovani su 0,5 M rastvorom NaOH i na osnovu utrošenih titracionih zapremina određena im je koncentracija jonizabilnih grupa.

### 3.3.2. Imobilizacija ketoprofena

Isprobana su dva načina imobilizacije ketoprofena u celulozni hidrogel, prvi u kome je ketoprofen dodat prilikom pravljenja gela i drugi u kome je gel prvo napravljen, a onda potopljen u rastvor ketoprofena, kako bi se njime napunio. U oba slučaja napravi se 7% rastvor modifikata Tyr-Cel (20% oksidovanog) u fosfatnom puferu pH 7,0 i njemu se dodaju enzimi i glukoza do finalnih koncentracija: 0,5 U HRP, 4,5 U GOx i 0,133 M glukoza.

U prvom slučaju se pre dodatka glukoze, u rastvor polimera doda 0,6 mg ketoprofena. Po dodatku glukoze, rastvor se izlije u kalupe u kojima se ostavi nekoliko sati da se gel formira i stegne. Nakon toga gel se iseče na komade približne veličine 2 x 2 mm i debljine oko 1 mm.

U drugom slučaju, ketoprofen se ne dodaje prilikom pravljenja gela, nego se iseckan gel stavi u 10 ml rastvora ketoprofena u fosfatnom puferu (0,03 mg/ml) i ostavi preko noći, uz mešanje na šejkeru. Rastvoru ketoprofena se izmeri apsorbanca na 258 nm pre stavljanja hidrogela i nakon punjenja, posle njegovog vadjenja, i iz razlike u apsorbanca i zapremini rastvora izračuna se količina apsorbovanog leka u gel.

### 3.3.3. pH - zavisno otpuštanje ketoprofena

pH vrednost unutar želuca kod ljudi se kreće u opsegu 1 – 2,5, dok u tankom crevu pH vrednost raste i u njegovom srednjem i završnom delu iznosi 7,4 – 7,5 i zato se vrednosti od 1,5 i 7,4, najčešće uzimaju za simulaciju pH vrednosti želučnog i intestinalnog lumena [116].



Formirani komadići gela sa lekom (mase oko 1 g) stave se u 20 ml HCl - KCl pufera pH 1,5 i 20 ml fosfatnog pufera pH 7,4 pri temperaturi od 37 °C i konstantnom šejkovanju na 150 rpm. Pri istim uslovima postavi se i gel bez leka u oba pufera, koji će služiti kao kontrola. U odgovarajućim vremenskim intervalima uzima se po 1 ml rastvora, kome se izmeri apsorbancu na 258 nm i koji se zatim vrati u rastvor za otpuštanje, kako bi se zadržala konstantna zapremina. Procenat oslobađanje ketoprofena računa se po sledećoj formuli:

$$\text{Oslobađanje (\%)} = (R_k / I_k) \times 100\%$$

pri čemu je  $R_k$  oslobođena količina ketoprofena u datom vremenu, a  $I_k$  početna količina ketoprofena u gelu.

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1. Imobilizacija peroksidaze u alginatu

U cilju pronalaženja najefikasnijeg načina za imobilizaciju HRP unutar alginatnih kuglica, isprobani su različiti metodi imobilizacije. Korištena su tri tipa alginata i tri tipa enzima (nativni i dva modifikovana) i napravljene četiri kombinacije imobilizata (nativni enzim imobilisan na nativni alginat, zatim na oksidovani alginat, oksidovani enzim na aminovani alginat i aminovani enzim na oksidovani alginat). Koncentracija enzima bila je u svim eksperimentima 0,01 mg, a alginata 2% (w/v) (s' tim što je modifikovani alginat mešan sa nativnim u odnosu 1:1, tako da je 2% ukupna koncentracija alginata). Jonotropnim geliranjem u rastvoru  $\text{CaCl}_2$  dobijene su kuglice reda veličine 1,5 mm (slika 20).



Slika 20. Izgled alginatnih kuglica sa imobilizovanim enzimom

Parametri imobilizacije dati su u tabeli 1. Može se videti da svi modifikovani imobilizati imaju veću vezanu aktivnost i veći procenat zadržane specifične aktivnosti (Sp) nakon 5 dana u odnosu na kombinaciju nemodifikovanog alginata i enzima. Imobilizat aminovane peroksidaze na oksidovanom alginatu ima najveću specifičnu aktivnost (0,43 U/g), najveći procenat vezivanja (81%) i najviše zadržane aktivnosti (96%). Ovaj procenat ukazuje na to da je enzim kovalentno povezan sa alginatom preko aldehidnih grupa uvedenih oksidacijom, a ne samo fizički zarobljen u njemu. Pošto je pokazao najveću aktivnost ovaj imobilizat je izabran za dalju karakterizaciju (određivanje pH optimuma, kinetičkih konstanti i stabilnost u organskom rastvaraču).

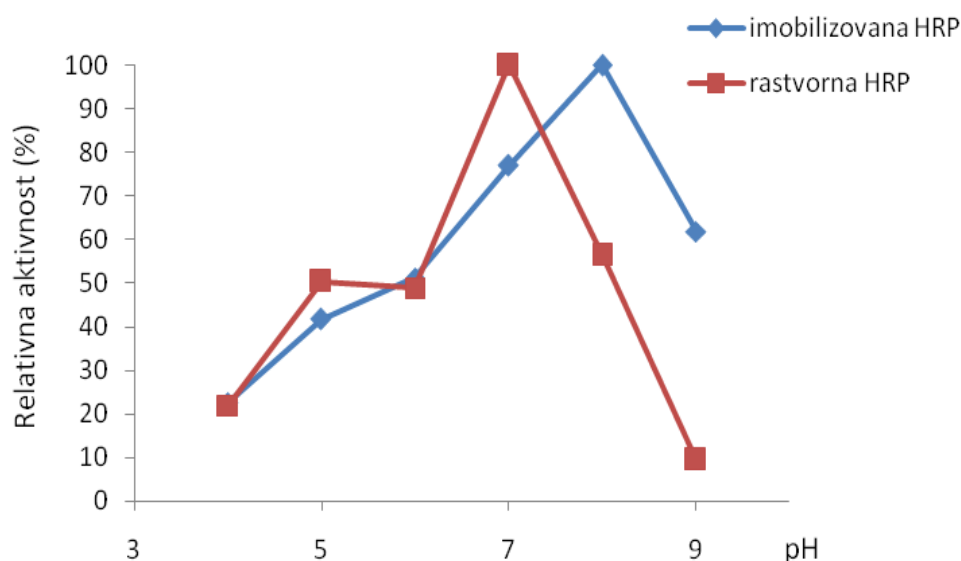
Tabela 1. Specifična i vezana aktivnost, procenat vezivanja i prinos imobilizacije.

Imobilizat:	Sp (U/g)	vezana aktivnost (U/g)	% vezivanja	prinos imobilizacije %	Sp posle 5 dana (U/g)	% zadržane Sp
alginat+HRP	0,15	0,80	9,69	18,43	0,06	42,6
oks.alginat+HRP	0,13	1,11	9,69	11,73	0,08	62,3
am.alginat+oks.HRP	0,15	1,73	14,10	8,92	0,07	48,0
oks.alginat+am.HRP	0,43	5,76	81,38	7,43	0,41	95,6

#### 4.1.1. pH optimum

Za određivanje pH optimuma korišćeni su acetatni, HEPES i glicinski pufer u opsegu od 4 do 9 pH jedinica. U odnosu na nativni enzim, imobilizat ima pH

optimum pomeren ka višim pH vrednostima (slika 21). U poređenju sa literaturnim podacima peroksidaze imobilizovane na nemodifikovani alginat, gde ne dolazi do promene pH optimuma [117], u ovom slučaju promene u pH optimumu su najverovatnije rezultat uvođenja naelektrisanih grupa modifikacijom alginata. Širi pH optimum i veća aktivnost na baznijim pH vrednostima, čini ovaj imobilizat vrlo pogodnim za industrijsku promenu, obzirom da je manje osetljiv na promene u pH vrednostima.



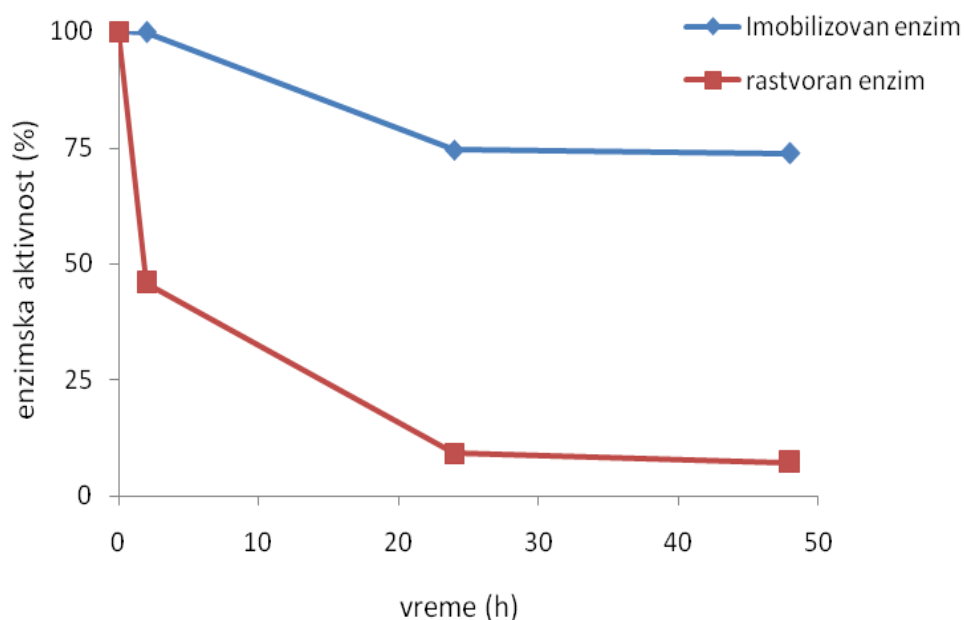
Slika 21. pH optimum rastvornog i imobilizovanog enzima

#### 4.1.2. Stabilnost u organskom rastvaraču

Kako se peroksidaza često koristi za sintezu polimera u organskim rastvaračima, stabilnost u nevodenoj sredini je od velikoj značaja za njenu primenu u ove svrhe. Stabilnost rastvornog i imobilizovanog enzima merena je u 80% dioksanu (v/v) na sobnoj temperaturi (25 °C). Nakon inkubacije u rastvaraču, u

vremenu od 2, 24 i 48 sati, imobilizat se ispere i rezidualna aktivnost odredi u vodenom rastvoru.

U poređenju sa nativnim, stabilnost imobilizovanog enzima je značajno povećana (slika 22). Dok nativni enzim izgubi 90% aktivnosti nakon 24 sata, aktivnost imobilizata nakon 2 dana iznosi oko 75%.

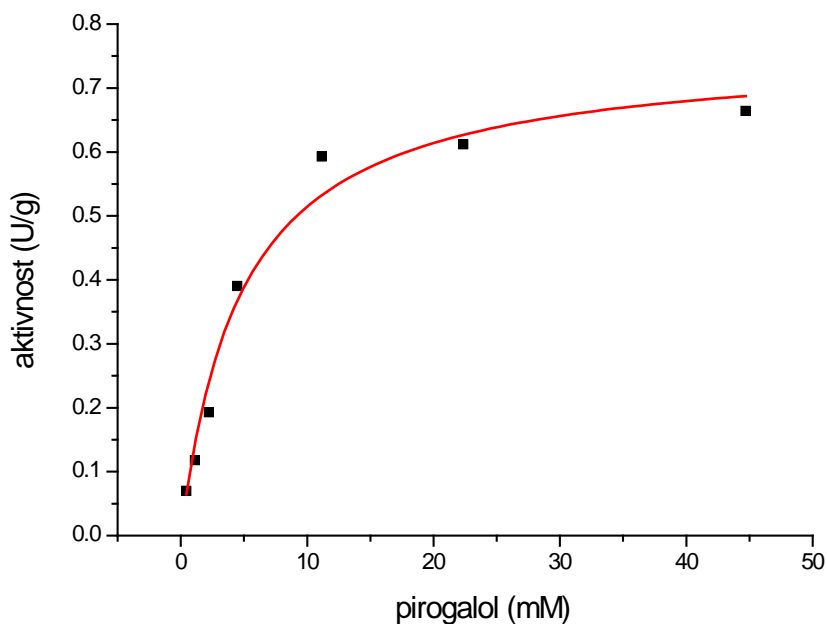


Slika 22. Uticaj vremena inkubacije u 80% dioksanu na aktivnost slobodnog (HRP) i imobilizovanog enzima (IME)

#### 4.1.3. Određivanje kinetičkih konstanti

Km vrednost sa pirogalolom kao supstratom i zasićujućom koncentracijom  $H_2O_2$ , određena je koristeći *Michaelis - Menten*-ov kinetički model. Km za imobilizat iznosi 4,86 mM (slika 23), dok je za rastvoran enzim 2,24 mM. Ovaj

rezultat je u saglasnosti sa literaturnim podacima za enzim imobilisan u gelu [118, 119] i posledica je difuzionih ograničenja do kojih dolazi prilikom imobilizacije.



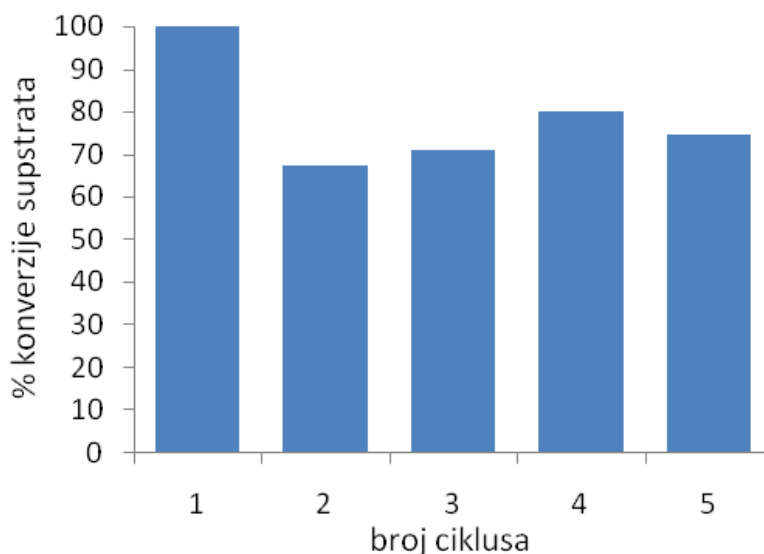
Slika 23. *Michaelis – Menten*-ova kriva za imobilizovan enzim

#### 4.1.4. Kontinuirana upotreba u bač reaktoru

Nakon karakterizacije, imobilizat je testiran u bač reaktoru za kontinuiranu upotrebu tokom oksidacije pirogalola. Svaki ciklus je trajao 6 sati, tokom kojih je koncentracija oksidovanog pirogalola određivana spektrofotometrijski, i nakon svakog ciklusa kuglice su isprane i ponovo korištene.

Posle prvog ciklusa aktivnost imobilizovanog enzima je nešto smanjena, ali nakon toga ostaje nepromenjena tokom ostalih ciklusa, i nakon 5 ciklusa iznosi oko 70%, kao što je prikazano na slici 24. Ovaj rezultat je bolji nego ranije opisani

rezultat za enzim imobilisan na nativnom alginatu, gde aktivnost nakon 5 ciklusa padne ispod 40% početne vrednosti [120]. To čini ovako imobilizovanu aminovanu peroksidazu na oksidovanom alginatu pogodnim kandidatom za upotrebu u industriji, gde je operativna stabilnost jedan od glavnih kriterijuma koje imobilizat treba da zadovolji.



Slika 24. Aktivnost imobilizovane peroksidaze tokom ponovljenih ciklusa u bač reaktoru

#### 4.2. Antibakterijska aktivnost DHP u alginatnom hidrogelu

Kako rezistencija na bakterijske sojeve postaje sve veći problem, ispitivanje novih supstanci koje poseduju antibakterijsku aktivnost je veoma aktuelno. Prvo je testirano nekoliko koncentracija rastvora DHP polimera u 5% vodenom rastvoru DMSO na različitim bakterijskim sojevima, kako bi se pronašla delotvorna doza (tabela 2). Na osnovu ovih rezultata izabrana je koncentracija od 10 mg/ml DHP

(tabela 3.) kao početna štok koncentracija i ona je stavljena u 2% alginat, za dalja testiranja.

Tabela 2. Dozna zavisnost rastvora DHP u 5% DMSO izražena kao  $\mu$ l rastvora po bunariću mikrotitar pločice

Bakterija	DHP (mg/mL)			
	10 MIC/MBC	1 MIC/MBC	0.1 MIC/MBC	0.02 MIC/MBC
<i>Bacillus cereus</i>	50/90	12/25	50/-	50/-
<i>Micrococcus flavus</i>	50/90	50/-	-/-	-/-
<i>Staphylococcus aureus</i>	50/90	25/50	50/-	50/-
<i>Listeria monocytogenes</i>	25/50	50/-	-/-	-/-
<i>Escherichia coli</i>	45/90	50/-	-/-	-/-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12/25	25/50	-/-	50/-
<i>Enterobacter cloacae</i>	12/25	50/-	50/-	50/-
<i>Salmonella Typhimurium</i>	12/50	50/-	50/-	50/-



Tabela 3. Antibakterijska aktivnost DHP-a

Bakterija	DHP (mg/mL) MIC/MBC
<i>Bacillus cereus</i>	0,50/0,90
<i>Micrococcus flavus</i>	0,50/0,90
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,50/0,90
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,25/0,50
<i>Escherichia coli</i>	0,45/0,90
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,12/0,25
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,12/0,25
<i>Salmonella Typhimurium</i>	0,12/0,50

Hidrogel alginata sa DHP-om (dobijen dodatkom  $\text{Ca}^{2+}$  jona u mikrotitar binariće), pokazao se efikasnim protiv svih testiranih bakterijskih sojeva, sa minimalnim inhibitornim koncentracijama u opsegu 0,002–0,7 mg/mL i minimalnim baktericidnim od 0,004–0,9 mg/mL. DHP je u kombinaciji sa alginatom pokazao bolju efikasnost nego sam (tabela 3). Ovo se može pripisati činjenici da alginat stvara trodimenzionalnu mrežu koja najverovatnije zarobljava bakterije, dovodeći ih na taj način u bliski kontakt sa supstancom koja ispoljava baktericidan efekat.

*L. monocytogenes* je najosetljiviji testirani soj, sa MBC od samo 0,004 mg/mL, dok su *E. coli* i *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 bili najrezistentniji sa MBC od 0,90 mg/mL. DHP–Alg je pokazao efikasnije antibiotsko dejstvo od antibiotika streptomicina i ampicilina na bakterije *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* i *S. typhimurium*. Za streptomycin, MIC su se kretale u opsegu 0,05–0,25 mg/mL, a MBC od 0,1–0,50 mg/mL, a za ampicillin vrednosti su iznosile 0,1–0,3 mg/mL za

MIC i 0,15–0,50 mg/mL za MBC. Rezultati antibakterijske aktivnosti prikazani su u tabeli 4.

Tabela 4. Antibakterijska aktivnost DHP–Alg hidrogela. MIC i MBC su izražene u odnosu na koncentraciju (mg/ml) DHP u alginatu.

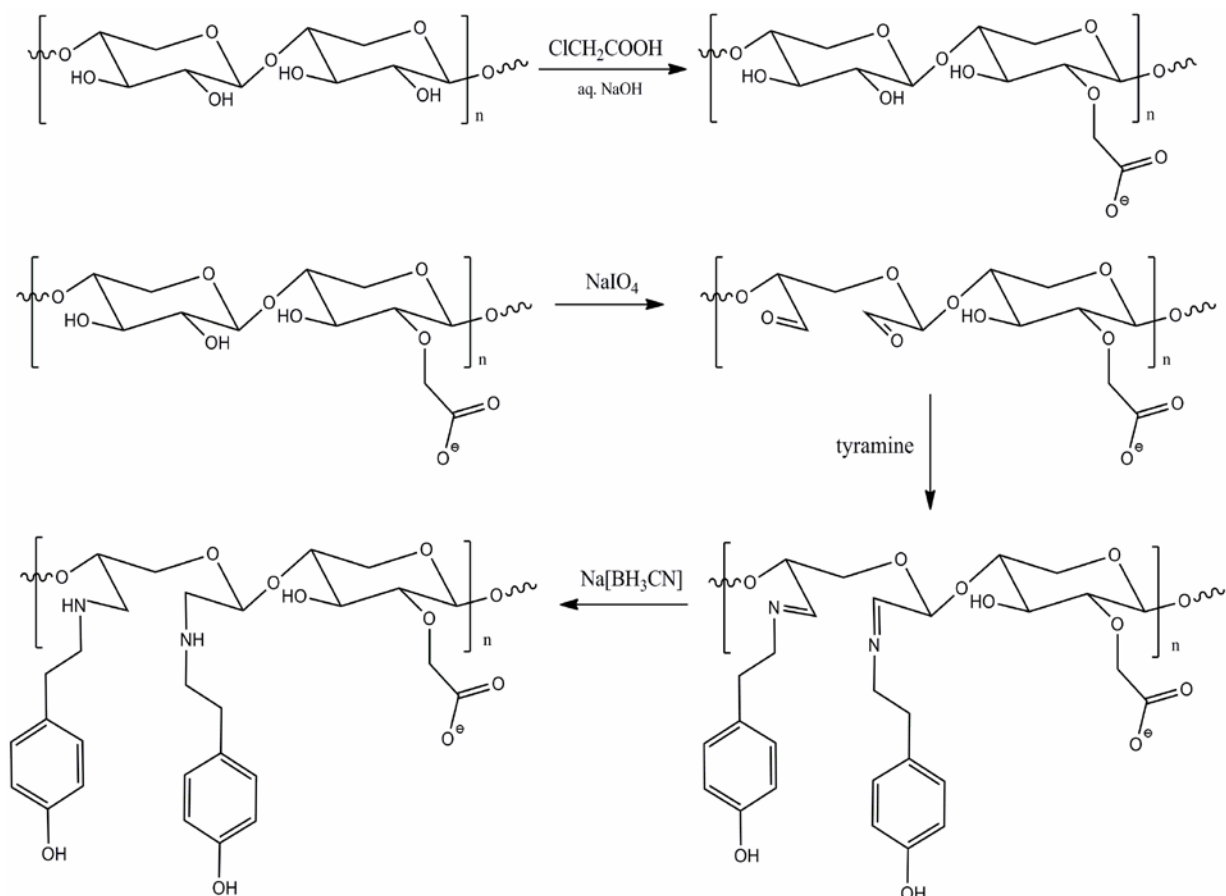
Bakterija	MIC/MBC (mg/mL)		
	DHP–Alg	Streptomycin	Ampicillin
<i>B. cereus</i>	0,23±0,00 <sup>a</sup>	0,05±0,003 <sup>a</sup>	0,10±0,02 <sup>b</sup>
	0,45±0,00 <sup>e</sup>	0,1±0,00 <sup>a</sup>	0,15±0,01 <sup>b</sup>
<i>M. flavus</i>	0,45±0,01 <sup>d</sup>	0,13±0,01 <sup>a</sup>	0,10±0,00 <sup>a</sup>
	0,90±0,01 <sup>f</sup>	0,25±0,01 <sup>c</sup>	0,15±0,01 <sup>a</sup>
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	0,45±0,02 <sup>d</sup>	0,25±0,00 <sup>a</sup>	0,10±0,02 <sup>b</sup>
	0,90±0,006 <sup>b</sup>	0,50±0,07 <sup>c</sup>	0,15±0,01 <sup>a</sup>
<i>L. monocytogenes</i>	0,002±0,00 <sup>a</sup>	0,15±0,007 <sup>a</sup>	0,15±0,007 <sup>b</sup>
	0,004±0,00 <sup>a</sup>	0,30±0,00 <sup>a</sup>	0,30±0,01 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>	0,70±0,02 <sup>a</sup>	0,10±0,01 <sup>a</sup>	0,30±0,01 <sup>a</sup>
	0,90±0,01 <sup>f</sup>	0,50±0,01 <sup>a</sup>	0,50±0,02 <sup>a</sup>
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,02±0,00 <sup>a</sup>	0,05±0,01 <sup>a</sup>	0,10±0,03 <sup>b</sup>
	0,03±0,00 <sup>a,b</sup>	0,10±0,01 <sup>a</sup>	0,20±0,09 <sup>c</sup>
<i>E. cloacae</i>	0,13±0,002 <sup>b</sup>	0,05±0,02 <sup>a</sup>	0,15±0,01 <sup>a</sup>
	0,25±0,01 <sup>c</sup>	0,10±0,00 <sup>a</sup>	0,20±0,02 <sup>a</sup>
<i>S. Typhimurium</i>	0,03±0,00 <sup>a</sup>	0,05±0,007 <sup>a</sup>	0,15±0,00 <sup>b</sup>
	0,06±0,00 <sup>b</sup>	0,10±0,007 <sup>a</sup>	0,20±0,01 <sup>a</sup>

\*različita slova u kolonama, označavaju značajnu razliku među uzorcima (P < 0,05)

Kako su testirani bakterijski sojevi vrlo često prisutni kod pacijenata koji imaju hronične rane i dekubituse, gel DHP–Alg mogao bi naći praktičnu primenu u farmaciji i tretmanu takvih tipova pacijenata.

#### 4.3. Imobilizacija amiloglukozidaze u tiramin-ksilanskim hidrogelovima

Ksilanu izolovanom iz čokova uvedene su funkcionalne grupe najpre dvostrukom karboksimetilacijom, a potom oksidacijom prstena Na-perjodatom i kačenjem tiraminskih ostataka (slika 25). Stepen modifikacije određen je upotrebom UV-VIS spektroskopije, FTIR spektara i kiselo baznom titracijom.



Slika 25. Šematski prikaz reakcija uvođenja funkcionalnih grupa na ksilanu iz čokova. Reakcije karboksimetilacije, perjodatne oksidacije i reduktivne aminacije

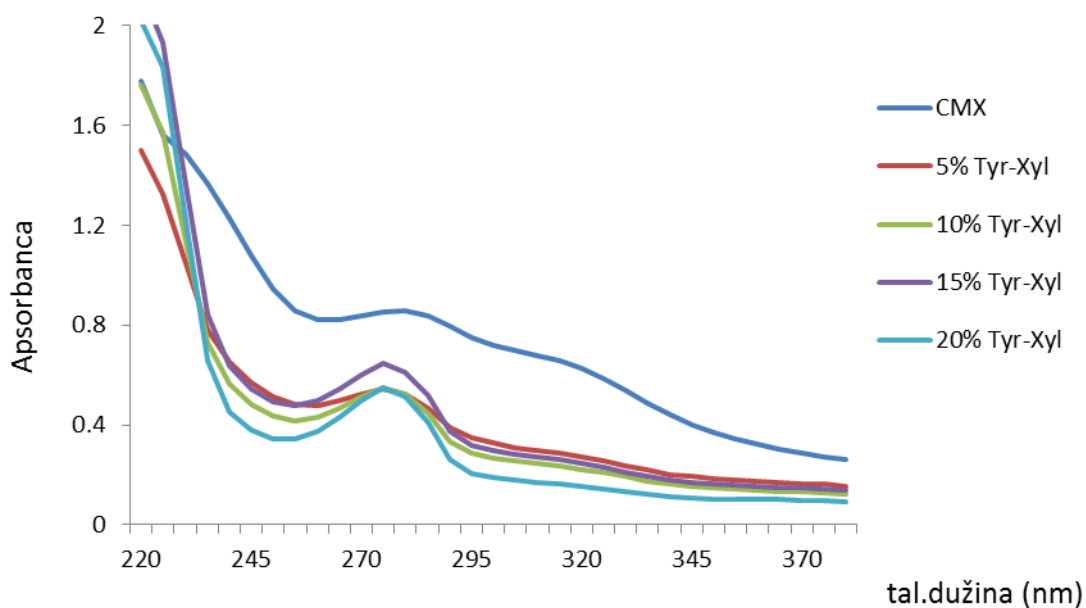
#### 4.3.1. UV spektri i koncentracija fenolnih grupa

Tiramin ima apsorpcioni maksimum na 274 nm [22], i taj maksimum može da se uoči i kod modifikovanih polimera kod kojih su uvedene tiraminske grupe (slika 26). Vrednost apsorbanca na 274 nm raste sa porastom stepena oksidacije i na osnovu njenih vrednosti na toj talasnoj dužini izračunata je koncentracija tiraminskih grupa na ksilanu u odnosu na koncentraciju glikozidnih jedinica. Odnos je prikazan u tabeli 5, u kojoj se vidi da se broj glikozidnih jedinica između

2 tiraminske grupe smanjuje sa povećanjem stepena modifikacije, odnosno povećava se broj uvedenih tiraminskih grupa.

Tabela 5. Gustina modifikacije tiraminom, izražena kao prosečan broj glikozidnih jedinica ksilanskog lanca između 2 novouvedene tiraminske grupe

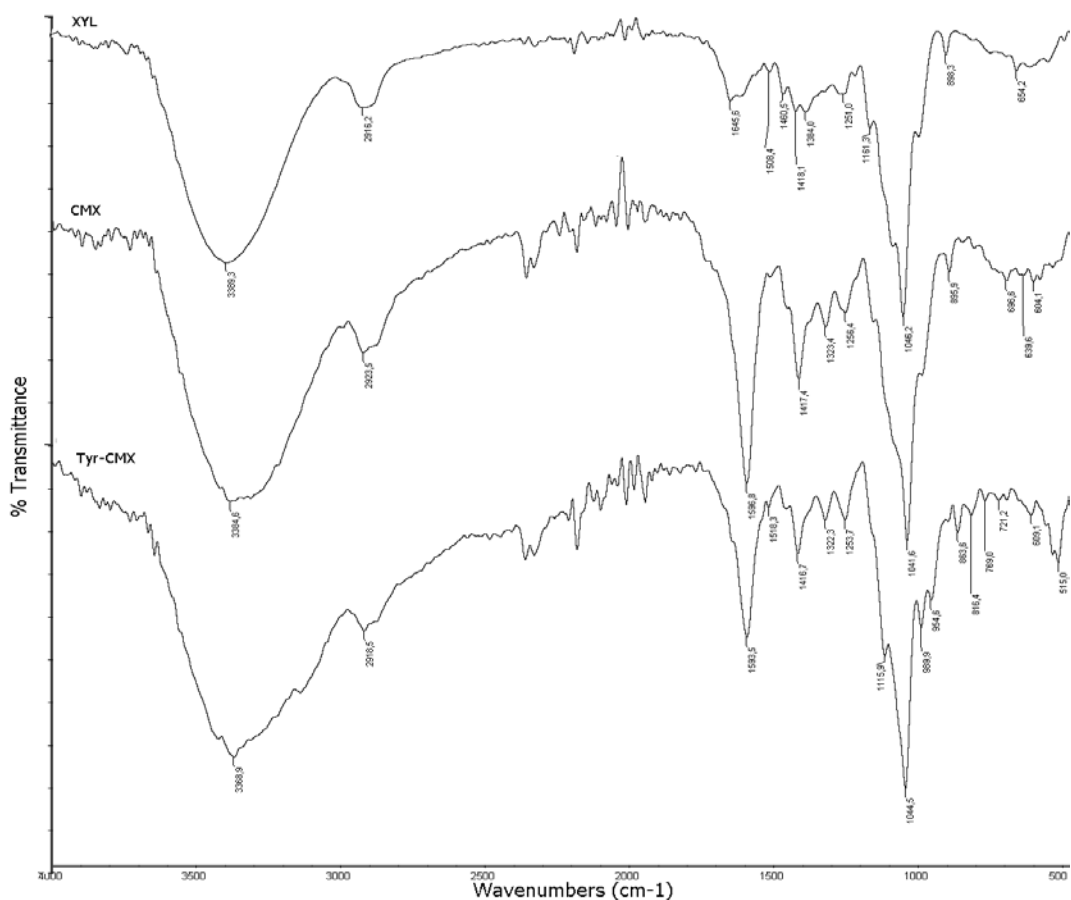
Molarni odnos perjodata (%)	0%	5%	10%	15%	20%
Br. gl. jedinica između 2 tiramina	56	35	27	22	21



Slika 26. UV spektri karboksimetilksilana (CMX) i tiramin modifikovanih ksilana različitih stepena modifikacije (5% do 20% Tyr-Xyl)

### 4.3.2. FTIR spektri

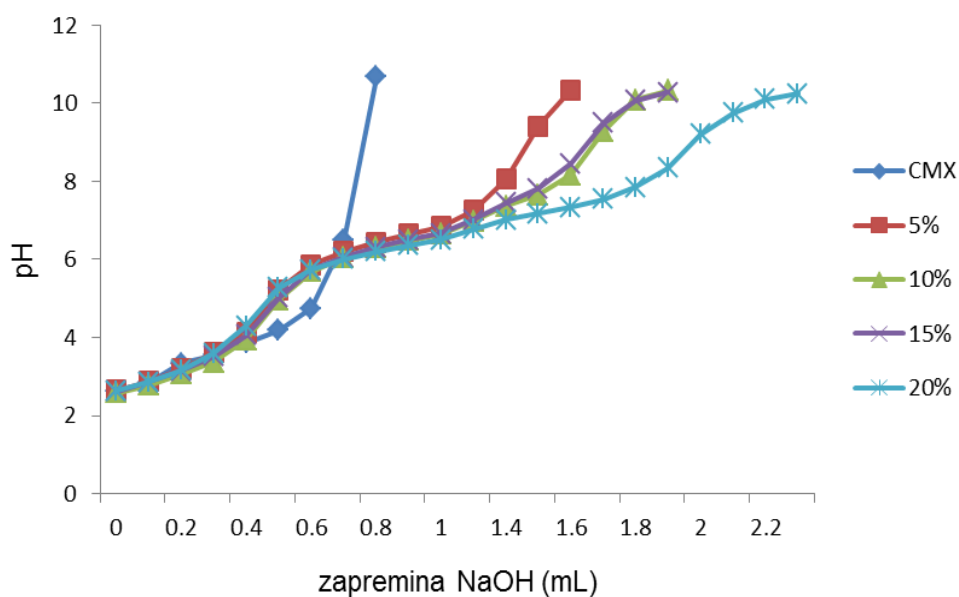
FTIR spektri, prikazani na slici 27, pokazuju da se nakon karboksimetilacije ksilana, pojavljuje jaka traka na  $1596,8\text{ cm}^{-1}$ , koja odgovara karbonilnoj C=O strećing vibraciji, kao i povećanje intenziteta O-H trake na  $1417,4\text{ cm}^{-1}$ . Prisustvo tiraminskog prstena uvedenog modifikacijom polimera, potvrđeno je pikom na  $1518,3\text{ cm}^{-1}$ , (nastalim od strećing C-C vibracije u aromatičnom prstenu) koji se uočava na spektru Tyr-CM<sub>2</sub>X [121].



Slika 27. FTIR spektri nativnog (XYL), karboksimetilovanog (CMX) i tiramin – modifikovanog ksilana (Tyr-CMX)

### 4.3.3. Titracija jonizabilnih grupa

Standardni rastvor NaOH je korišćen za titraciju polimera i izračunavanje koncentracije jonizabilnih grupa. Na grafiku titracionih krivih (slika 28) može se primetiti da karboksimetilksilan ima samo jedan plato na pH oko 3 (koji potiče od karboksilnih grupa), dok tiramin modifikovani ksilani imaju još jedan plato na pH oko 7, što ukazuje na postojanje još jedne jonizabilne grupe i potvrđuje modifikaciju. Ovi platoi produžavaju se sa povećanjem stepena modifikacije, što odgovara većem broju uvedenih baznijih grupa. U tabeli 6 date su koncentracije jonizabilnih grupa u mmol/g polimera za svaki stepen oksidacije.



Slika 28. Titracione krive karboksimetilksilana (CMX) i tiramin modifikovanih ksilana različitih stepena modifikacije (5% do 20% Tyr-Xyl)

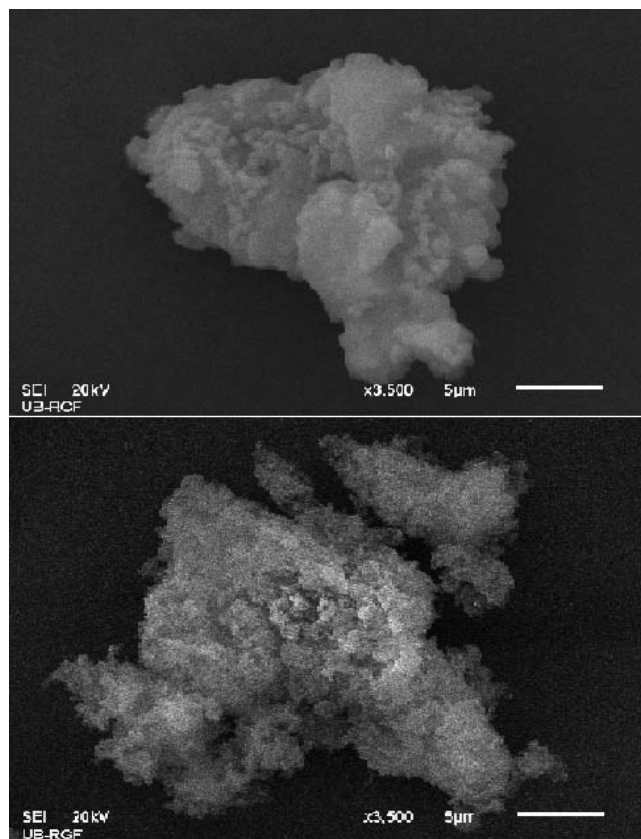
Tabela 6. Koncentracija jonizabilnih grupa po gramu suvog polimera. CMX je označen kao 0% molski odnos perjodata

Molarni odnos perjodata (%)	0%	5%	10%	15%	20%
Jonizabilne grupe (mmol/g)	1,5	3,5	4,0	4,2	5,4

#### 4.3.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Karboksimetilksilan i 20% oksidovan tiramin–ksilan posmatrani su skenirajućim elektronskim mikroskopom pri uveličanju od 3.500 puta. Na mikrografijama (slika 29) se vidi razlika u spoljašnjoj morfologiji polimera.





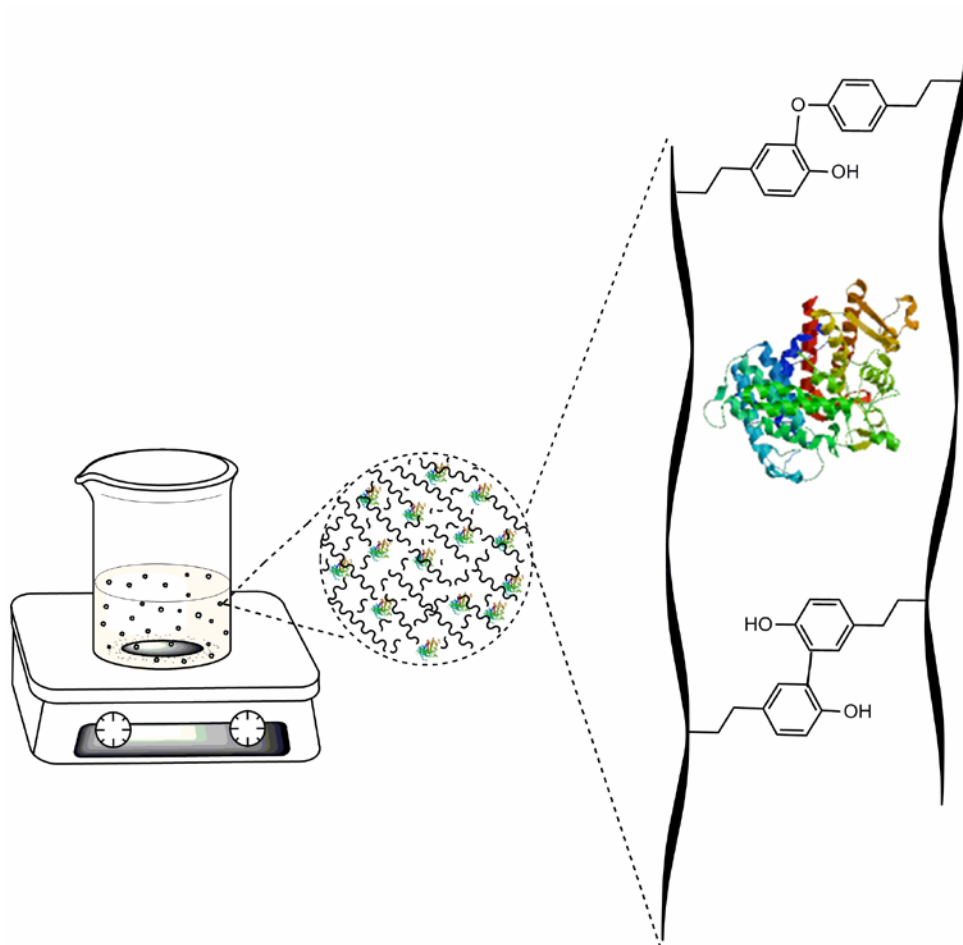
Slika 29. SEM fotografije CMX (gore) i Tyr-Xyl (dole) pri uveličanju 3500x

Modifikovani ksilan (donja slika) pokazuje rastresitiju površinu u odnosu na nemodifikovan (gornja slika), što može biti posledica hemijskih modifikacija koje su uvedene.

#### 4.3.5. Pravljenje mikrokuglica tiramin-ksilana

Mikrokuglice hidrogela ksilana modifikovanih tiraminom dobijene su polimerizacijom u emulziji (voda u ulju), kuplovanom enzimskom reakcijom peroksidaze i glukoza oksidaze. Reakcijom GOx sa glukozom nastaje  $H_2O_2$ , koji dalje služi kao supstrat za HRP u reakciji polimerizacije. Na taj način postiže se

kontinuiran izvor niskih količina  $H_2O_2$  i sprečava inhibicija peroksidaze supstratom. Kao model jedinjenje za imobilizaciju upotrebljena je amiloglukozidaza. Polimeri sva 4 stepena oksidacije (5%, 10%, 15% i 20%) pokazali su sposobnost formiranja hidrogelova.

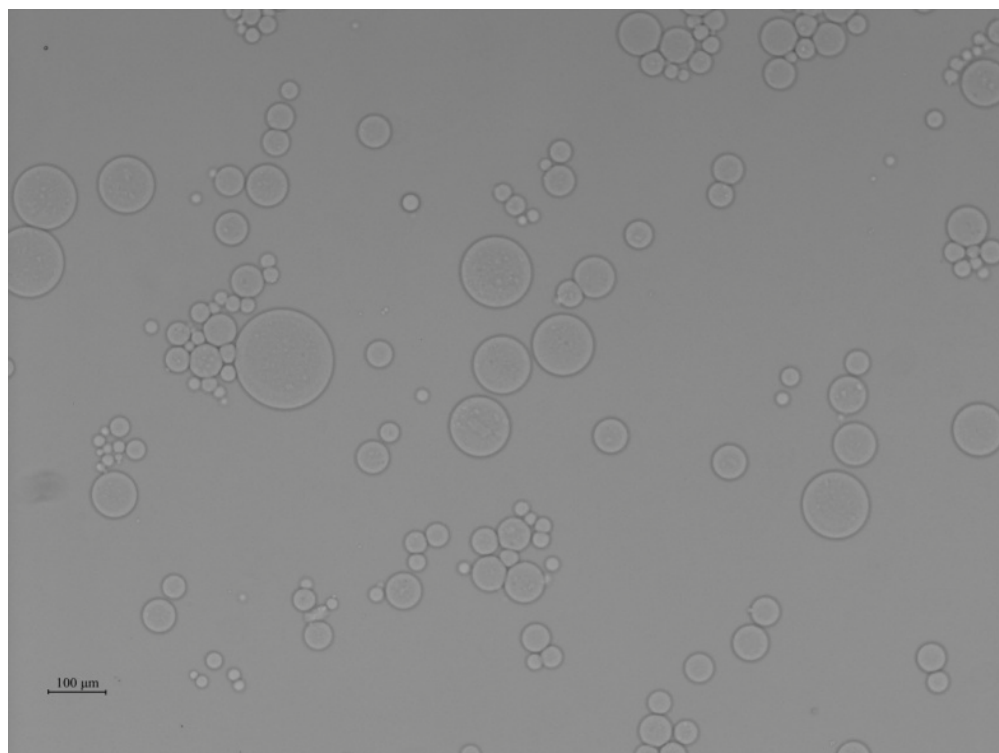


Slika 30. Amiloglukozidaza imobilizovana u mikrokuglicama tiramin–ksilana dobijenim emulzionom polimerizacijom

#### 4.3.6. Optička mikroskopija

Napravljene kuglice hidrogela tiramin–ksilana posmatrane su i fotografisane pod optičkim mikroskopom. Na mikrografiji (slika 31.) se uočavaju

providne kuglice pravilnog sferičnog oblika. Prosečna veličina kuglica iznosi  $52 \pm 25 \mu\text{m}$ .



Slika 31. Mikrografija kuglica pri uveličanju od 50 puta. Veličina skale  $100 \mu\text{m}$

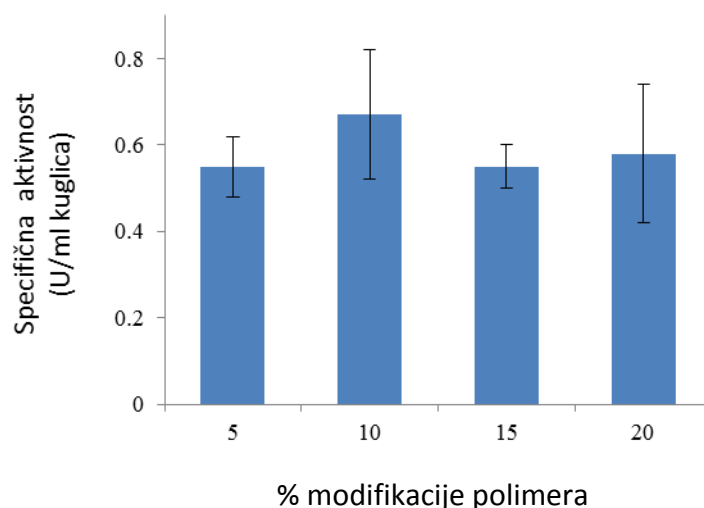
#### 4.3.7. Enzimska aktivnost mikrokuglica

Za svaki stepen oksidacije gela (5%, 10%, 15% i 20%), napravljene su kuglice sa imobilizovanom amiloglukozidazom i merena je enzimska aktivnost, kako u kuglicama tako i u supernatantima. Preračunate su specifična i vezana aktivnost, prinos imobilizacije i rezidualna aktivnost, i te vrednosti su prikazane u tabeli 7.

Tabela 7. Parametri imobilizacije za svaki stepen modifikacije polimera izraženi kao srednja vrednost i standardna devijacija (M±SD)

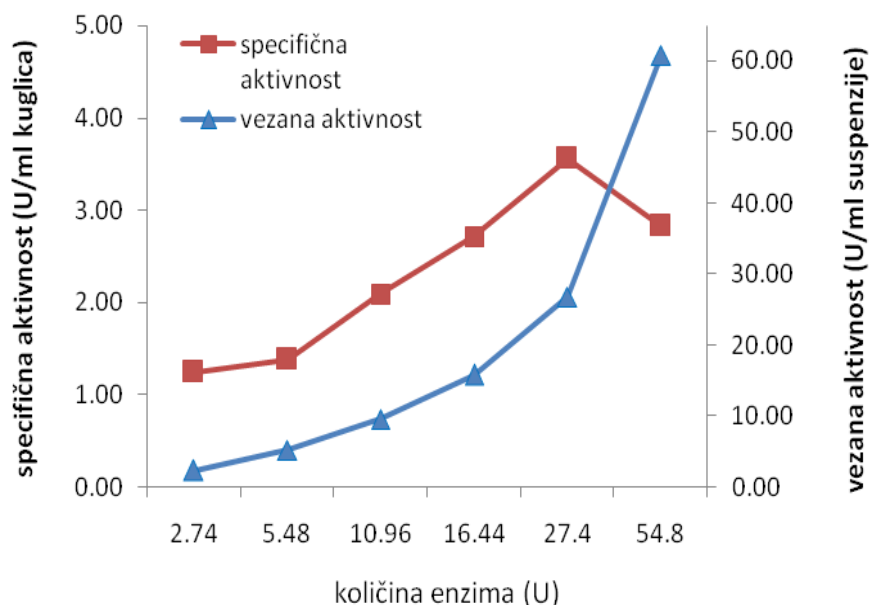
Procenat oksidacije	5%	10%	15%	20%
Sp kuglica (U/ml)	0,55±0,07	0,7±0,2	0,55±0,05	0,6±0,2
Nevez. jedinice (U)	0,9±0,4	0,5±0,2	1,2±0,8	0,7±0,2
Vez. jedinice (U)	1,9±0,4	2,3±0,2	1,6±0,8	2,0±0,2
Procenat vezivanja(%)	69±13	83±9	58±27	75±7
Vez. aktiv. (U/ml)	2,1±0,5	2,9±0,5	1,9±0,9	2,6±0,1
Prinos imobilizacije (%)	28±9	24±8	35±20	23±7
Sp posle 24h (U/ml)	0,3±0,1	0,54±0,07	0,4±0,2	0,47±0,02
Procenat zadrž. Sp (%)	50±20	82±13	69±29	80±19

Najbolje vrednosti parametara imobilizacije dobijene su za tiraminski ksilan oksidovan 10% (specifična aktivnost od 0,7 U/ml i 83% procenat vezivanja), tako da je on selektovan za dalja ispitivanja. Specifična aktivnost imobilizata u zavisnosti od stepena modifikacije polimera prikazana je na slici 32.



Slika 32. Zavisnost specifične aktivnosti od procenta modifikacije Tyr-Xyl

Uticaj količine dodatog enzima na vrednosti imobilizacije je sledeće što je ispitivano. Dodavane su 2, 4, 6, 10 i 20 puta veće količine enzima u odnosu na početnu i sa tim povećanjem linearno se povećava vezana aktivnost, a opada prinos imobilizacije. Smanjenje prinosa je u skladu sa studijama u kojima je pokazano da usled difuzionih ograničenja dolazi do smanjenje dostupnosti supstrata molekulima enzima imobilizovanim u unutrašnjosti kuglica [119]. Kako bi prinos imobilizacije bio zadržan iznad 20%, kao optimalna količina enzima uzeta je ona od 10,96 U. Specifična i vezana aktivnost za ovu količinu enzima iznose 2,1 U/ ml gela i 7,5 U, datim redom (slika 33).



Slika 33. Zavisnost specifične i vezane aktivnosti od količine dodatog enzima

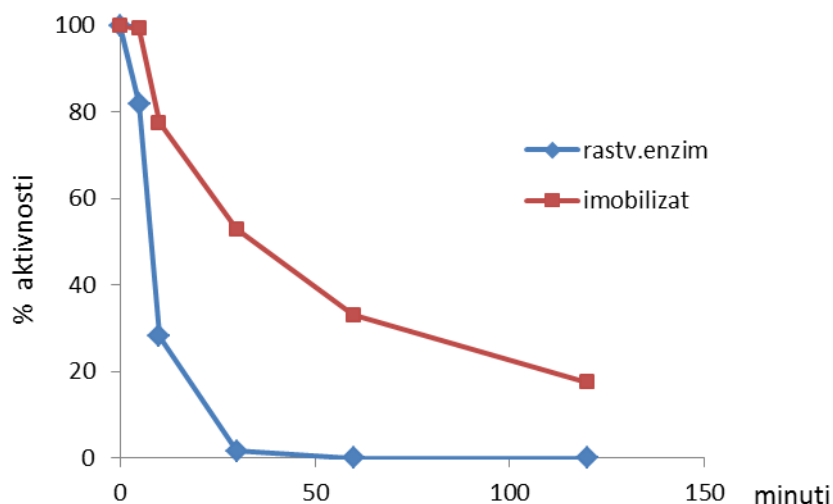
Za ispitivanje uticaja koncentracije polimera na imobilizaciju, ispitane su koncentracije tiramin–ksilana od 5%, 10%, 15%, 20% i 25% (w/v). Kako nisu uočene nikakve posebne regularnosti u parametrima imobilizacije u zavisnosti od količine polimera, uzeta je koncentracija od 5% (w/v), kao najekonomičnija.

Na osnovu prethodnih eksperimenata, kao optimalan izabran je imobilizat sa 10,96 U amiloglukozidaze u kuglicama 5% tiramin–ksilana, koji je bio oksidovan 10% molskim odnosom perjodata u odnosu na glikozidne jedinice, i on je dalje karakterisan.

#### 4.3.8. Termostabilnost imobilizata amiloglukozidaze

Temperaturna stabilnost imobilizovanog enzima je višestruko povećana u odnosu na rastvorni. Nakon pola sata na temperaturi od 60 °C rastvorna

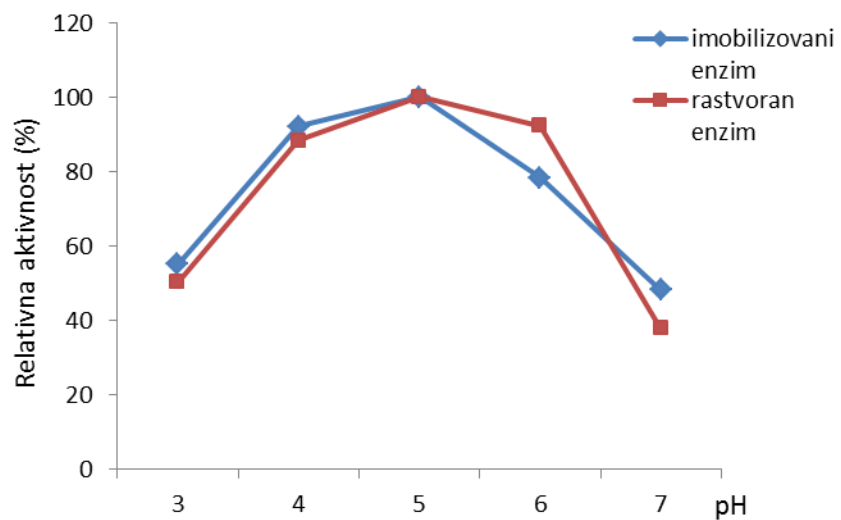
amiloglukozidaza je izgubila preko 98% polazne aktivnosti, dok je imobilizovani enzim zadržao više od 50% aktivnosti (slika 34.) Vreme poluživota na temperaturi od 60 °C je 10 puta duže za imobilizovan nego za rastvoran enzim ( $t_{1/2}$  iznosi 49,5 minuta za imobilizat, a 4,8 minuta za slobodan enzim).



Slika 34. Procenat zadržane aktivnosti imobilizovanog i slobodnog enzima u zavisnosti od vremena inkubiranja na 60 °C

#### 4.3.9. Uticaj pH vrednosti na aktivnost slobodnog i vezanog enzima

Uticaj pH vrednosti na aktivnost slobodnog i vezanog enzima praćena je u opsegu vrednosti 3 – 7 i prikazana je na slici 35. U oba slućaja optimalna vrednost pH je 5, što implicira da nije došlo do većih konformacionih promena enzima tokom procesa imobilizacije.

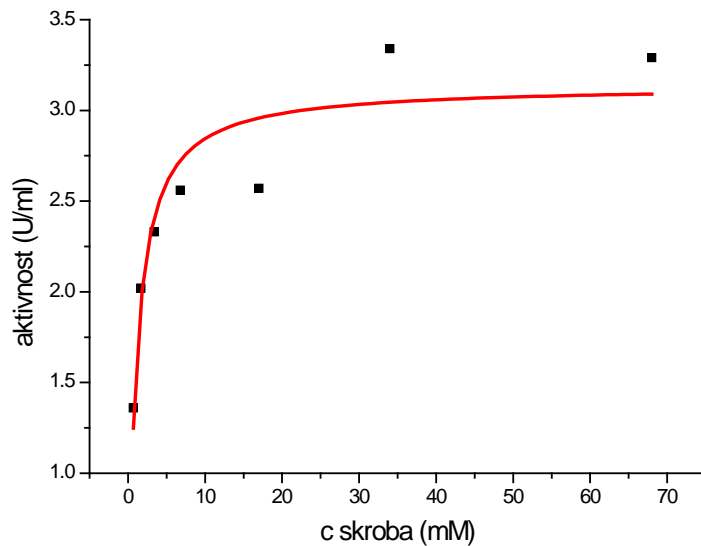
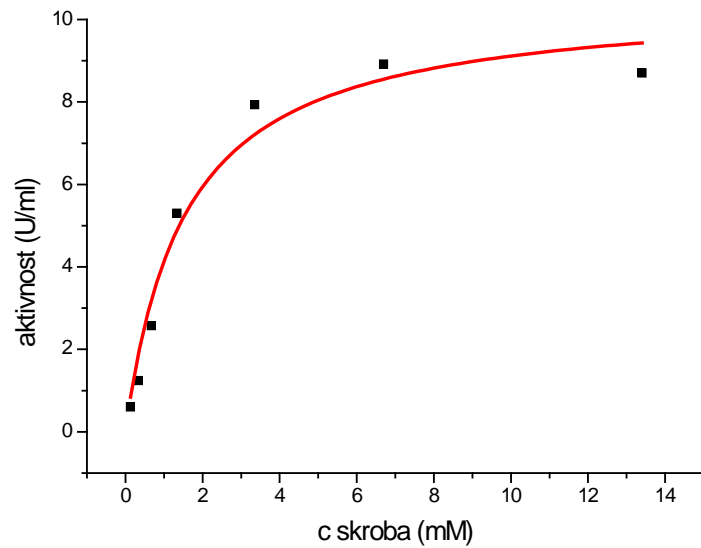


Slika 35. Zavisnost aktivnosti slobodne i vezane amiloglukoziidaze od pH

#### 4.3.10. Kinetičke konstante, $K_m$ i $V_{max}$

Kinetičke konstante za slobodnu i imobilizovanu amiloglukoziidazu sa rastvornim skrobom kao supstratom, određene su primenom *Michaelis - Menten*-ovog kinetičkog modela (slika 36).





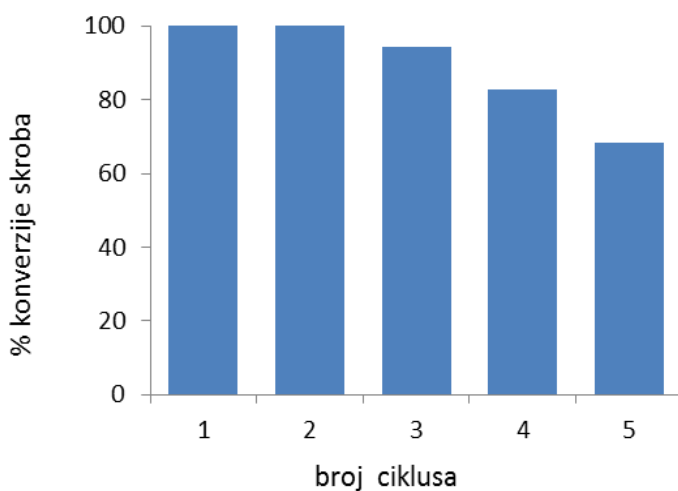
Slika 36. Zavisnost specifične aktivnosti za rastvornu (gore) i imobilizovanu (dole) amiloglukozidazu od koncentracije (c) skroba

Vrednost  $K_m$  za slobodan enzim iznosi 1,54 mM, a za imobilizovan 1,03 mM. Ove vrednosti ukazuju da je nakon imobilizacije došlo do povećanja afiniteta

enzima prema supstratu.  $V_{max}$  za imobilizovan enzim je 3,3 puta manja od vrednosti za enzim u rastvoru (3,14 za imobilizovan i 10,51 za slobodan), što ukazuje na postojanje difuzionih ograničenja.

#### 4.3.11. Operativna stabilnost

Operativna stabilnost amiloglukozidaze imobilizovane na tiramin-ksilanu posmatrana je tokom uzastopnih repetitivnih ciklusa u bač reaktoru. Trajanje svakog ciklusa bilo je 3 sata, a količina hidrolizovanog skroba je praćena spektrofotometrijski i izražena kao procenat konverzije (slika 37). Nakon petog ciklusa imobilizat je zadržao 68% početne aktivnosti, i imobilizovani enzim se pokazao otpornim na ispiranje, što ukazuje na postojanje kovalentih veza molekula enzima sa tiramin-ksilanom.

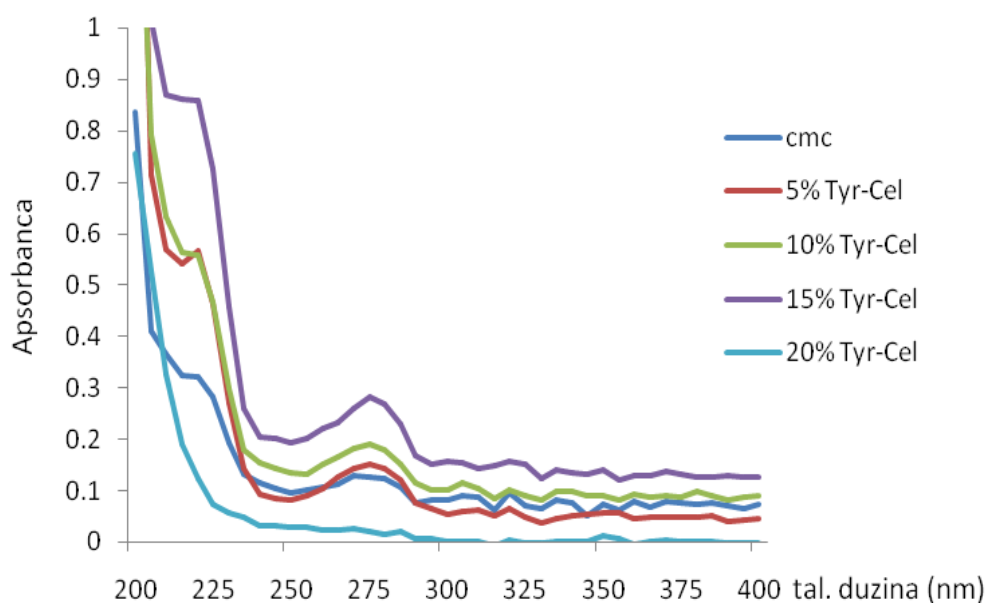


Slika 37. Aktivnost imobilizovane amiloglukozidaze tokom ponavljajuće upotrebe u bač reaktoru

#### 4.4. Imobilizacija ketoprofena u tiramin-karboksimetil-celuloznom hidrogelu

##### 4.4.1. Hemijska modifikacija karboksimetil-celuloze

Karboksimetilceluloza (Sigma Aldrich) je kao i ksilan perjodatno oksidovana u molskim odnosima 5 - 20%, a zatim su joj uvedene fenolne grupe, reduktivnom aminacijom sa tiramin-HCl-om. Ove modifikacije potvrđene su UV - spektroskopijom (slika 38) i kiselo - baznom titracijom (slika 38).



Slika 38. UV-Vis spektri karboksimetilceluloze (CMC) i tiramin modifikovanih celuloza (Tyr-Cel) različitih stepena modifikacije

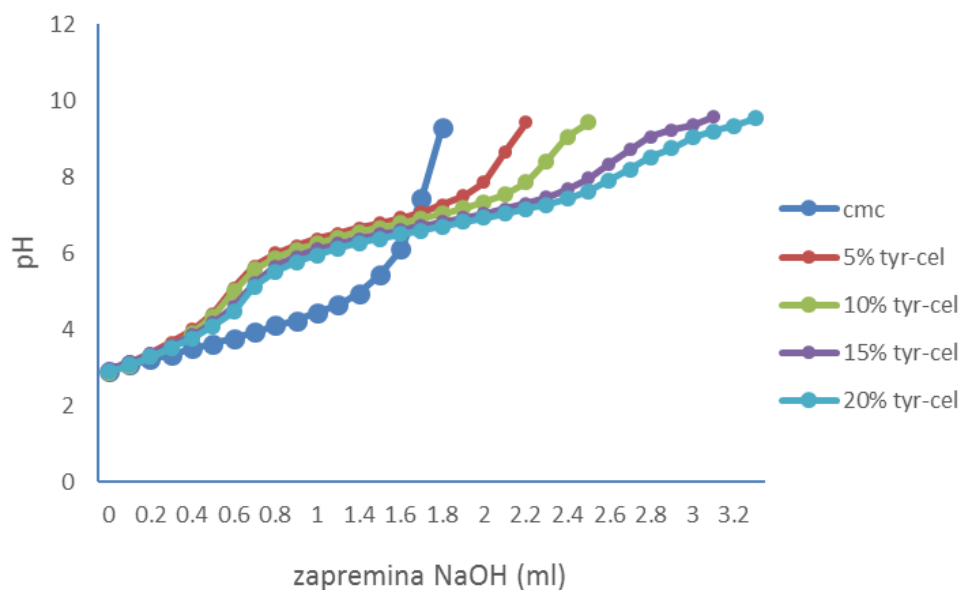
Na spektrima CMC i Tyr- Cel vidi se da sa modifikacijom dolazi do pojave pika na 274 nm, što potvrđuje da su uvedene fenolne grupe i da je intenzitet pikova veći sa povećanjem stepena oksidacije celuloze. Ipak, intenzitet pikova je

slabiji nego kod ksilana, i broj uvedenih fenolnih grupa na celuloznom polimeru je manji nego na ksilanskom (tabela 8).

Tabela 8. Gustina uvedenih fenolnih grupa za različite stepene oksidacije polimera, izražena kao prosečan broj glikozidnih jedinica između 2 fenolne grupe

Molarni odnos perjodata (%)	0%	5%	10%	15%	20%
Br. gl. jedinica između 2 tiramina	0	149	87	85	59

Titracione krive karboksimetilceluloze i Tyr Cel pokazuju da je došlo do uvođenja dodatnih jonizabilnih grupa na celuloznim polimerima (pojavljuje se dodatni plato na krivama na pH oko 7) i potvrđuju modifikaciju tiraminom (slika 39).



Slika 39. Titracione krive CMC i 5 - 20% oksidovane Tyr-Cel

Takođe se može videti da sa povećanjem stepena oksidacije raste i dužina platoa, što ukazuje na prisustvo većeg broja jonizabilnih grupa što je stepen oksidacije veći.

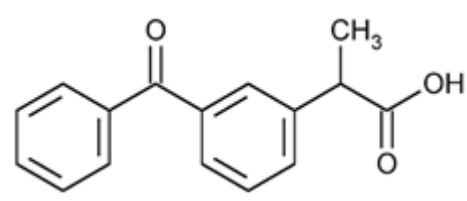
Rastvori svih modifikata Tyr–Cel su prešli u stanje gela kada su im dodati HRP (3 U), GOx (13 U) i glukoza (0,133 M) (slika 40).



Slika 40. Izgled Tyr–Cel gela, dobijenog dodatkom enzima HRP, GOx i glukoze

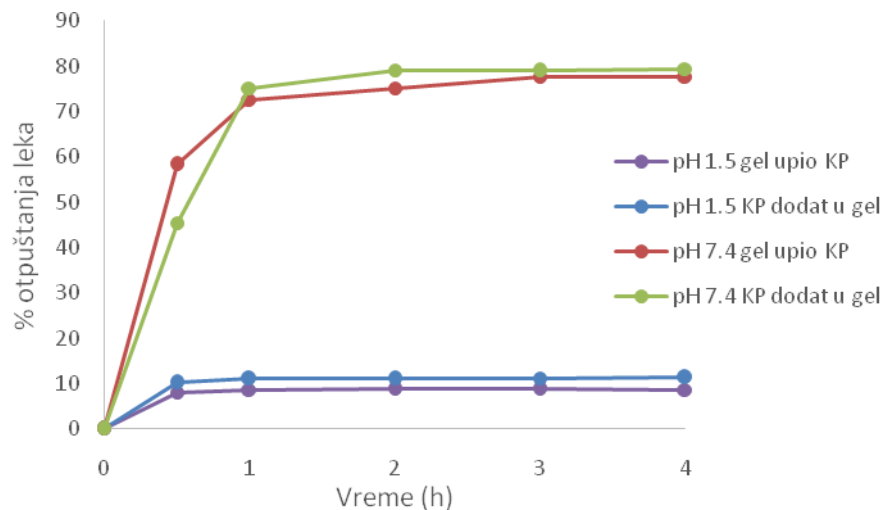
#### 4.4.2. pH - zavisno dostavljanje ketoprofena u Tyr–Cel hidrogelu

Kako je broj fenolnih grupa koji je uveden na celulozne polimere bio manji nego kod ksilana, izabrana je 20 % oksidovana Tyr–Cel, kao najviše modifikovani polimer za eksperiment sa dostavljanjem leka. Kao model malog molekula leka, koristili smo ketoprofen (slika 41) i ispitivali da li Tyr–Cel ima odgovarajuće osobine, koje bi omogućila njenu upotrebu kao “pametnog” hidrogela za specifično dostavljanje terapijskih sredstava.



Slika 41. Hemijska struktura ketoprofena

Kao što se na slici 42 može videti, oslobađanje ketoprofena iz gela je značajno veće na pH 7,4 nego na pH 1,5 za oba načina punjenja gela lekom (potapanjem gela u rastvor ketoprofena, ili njegovim dodavanjem prilikom pravljenja gela). Prisustvo jonizabilnih karboksilnih grupa Tyr–Cel dovodi do toga da je gel pri nižim pH vrednostima potpuno protonovan i kontrahovan. Pri prelasku u više pH vrednosti, dolazi do deprotonacije, odbijanja polimernih lanaca, povećane hidrofилnosti i ulaska vode u gel, i sve to dovodi do toga da ketoprofen iz gela difunduje u okolni bazni rastvor. Za 4 sata na pH 1,5 oslobodi se 9 - 11 % ketoprofena sadržanog u gelu, dok se za isto vreme na pH 7,4 oslobodi 78 - 79 % leka. Takođe, može se primetiti da kod oslobađanja imamo početno naglo oslobađanje leka, praćeno daljim konstantnim oslobađanjem manjih količina. Ovo početno oslobađanje se javlja usled brze difuzije leka sa spoljašnje površine gela i u skladu je sa ranijim istraživanjima [122, 123].



Slika 42. Otpuštanje ketoprofena (KP) na pH 1,5 i 7,4 pri temperaturi od 37 °C

Dostavljanjem ketoprofena u TyGel gelu omogućava da se izbegnu neželjeni efekti leka, kao što su iritacija želuca i gornjeg dela gastrointestinalnog trakta i da se lek ciljano otpusti na višim pH vrednostima u tankom crevu.

## 5. ZAKLJUČCI

Testirane su četiri metode za imobilizaciju peroksidaze unutar alginatnih kuglica i razvijen je efikasan metod imobilizacije aminovane peroksidaze na perjodatno oksidovani alginat. Zahvaljujući kovalentnom vezivanju enzima za matriks, dobijen je imobilizat povećane stabilnosti u prisustvu organskih rastvarača i proširenog pH optimuma, koji se može koristiti u bač reaktorima tokom više ciklusa bez značajnijeg gubitka aktivnosti. Na ovaj način pripremljen imobilizat HRP je pogodan kandidat za industrijsku primenu u uklanjanju fenola ili sintezu polimera u organskim rastvaračima i vodenim rastvorima.

Alginat je testiran i kao nosač u cilju antibakterijskog tretmana rana. Sintetisani DHP polimer u kombinaciji sa alginatnim hidrogelom pokazao je antimikrobnu aktivnost na sve testirane Gram (-) i Gram (+) sojeve, koja se može porediti sa antibioticima streptomycinom i ampicilinom, a u nekim slučajevima je i bolja od pomenutih antibiotika. Alginatni gel je pojačao baktericidno dejstvo DHP, verovatno praveći mrežu koja opkoljava i zarobljava bakterije. Poseban značaj ovog antimikrobnog hidrogela je njegova potencijalna primena na sojeve bakterija rezistentne na postojeće antibiotike.

Ksilanu izolovanom iz čokova kukuruza uvedene su funkcionalne grupe najpre dvostrukom karboksimetilacijom, a potom perjodatnom oksidacijom, pa reduktivnom aminacijom sa tiraminom. Na taj način uvedene su i pozitivne i negativne šarže i ovako modifikovan ksilan gelirao je u prisustvu enzima peroksidaze i glukoza oksidaze dodatkom glukoze. U zavisnosti od molskog odnosa perjodata, dobijeni su modifikati različitog stepena oksidacije (5%, 10%,



15% i 20%). Enzim amiloglukozidaza korišćen je kao model makromolekula za imobilizaciju. Polimer koji je oksidovan 10 mol % perjodatom pokazao je najveću sposobnost vezivanja enzima i vezani enzim je imao najveću specifičnu aktivnost. Optimalna količina enzima je iznosila oko 10 U, a koncentracija polimera 5%. Imobilizovani enzim pokazao je povećanu termostabilnost i afinitet prema supstratu i nakon 5 ciklusa ponovljene upotrebe zadržao je skoro 70% početne aktivnosti.

Karboksimetilceluloza je takođe perjodatno oksidovana, a zatim modifikovana uvođenjem fenolnih i amino grupa tiramina, što je omogućilo njeno geliranje peroksidazom. U 20 mol % oksidovanu Tyr-Cel imobilizovan je ketoprofen kao model malog molekula leka, bilo direktno dodatkom prilikom pravljenja gela, ili punjenjem gela u rastvoru leka. Otpuštanje ketoprofena iz celuloznog gela pri pH 1,5 (što odgovara pH vrednosti želudačnog soka) tokom 4 sata iznosilo je do 11%, a pri pH 7,4 (što odgovara pH vrednosti lumena tankog creva) iznosilo je do 79% sadržine leka. Na taj način pokazano je da Tyr-Cel može da se koristi kao pH - osetljiv nosač za oralnu administraciju leka, omogućujući njegovo kontrolisano i ciljano otpuštanje u crevima.

## 6. LITERATURA

1. Salisu, A., A.A. Naim, and M.M. Sanagi, *Chemical Modification of Marine Polysaccharide (Alginate) By Free-Radical Graft Copolymerization— a Short Review*. IOSR Journal of Applied Chemistry, 2013. **4**(3): p. 39-44.
2. Melia, C.D. and P. Timmins, *Natural Polysaccharides in Hydrophilic Matrices, in Hydrophilic Matrix Tablets for Oral Controlled Release*, P. Timmins, S.R. Pygall, and C.D. Melia, Editors. 2014, Springer New York. p. 87-122.
3. Milasinovic, N., et al., *Immobilization of lipase from Candida rugosa into copolymer hydrogels of poly(N-isopropylacrylamide-co-itaconic acid) synthesized in the presence of surfactants*. Hemijska industrija, 2011. **65**(6): p. 667-673.
4. Qiu, Y. and K. Park, *Environment-sensitive hydrogels for drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **53**: p. 321-339.
5. Michel, G., et al., *The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga Ectocarpus siliculosus. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes*. New Phytol, 2010. **188**(1): p. 82-97.
6. Hay, I.D., et al., *Microbial alginate production, modification and its applications*. Microb Biotechnol, 2013. **6**(6): p. 637-50.
7. Draget, K.I., O. Smidsroed, and G. Skjaak-Braek, *Alginates from Algae, in Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry* A. Steinbuchel and S.K. Rhee, Editors. 2005, Wiley-VCH: Weinheim. p. 215-244.
8. Draget, K.I., *Alginates*, in *Handbook of Hydrocolloids*, G.O. Phillips and P.A. Williams, Editors. 2009, Woodhead Publishing Cambridge, UK. p. 807-828.
9. Andersen, T., et al., *Alginates as biomaterials in tissue engineering*. Carbohydr. Chem., 2012. **37**: p. 227 – 258.

10. Lee, K.Y. and D.J. Mooney, *Alginate: properties and biomedical applications*. Prog Polym Sci, 2012. **37**(1): p. 106-126.
11. Grassi, M., et al., *Structural characterization of calcium alginate matrices by means of mechanical and release tests*. Molecules, 2009. **14**(8): p. 3003-17.
12. Augst, A.D., H.J. Kong, and D.J. Mooney, *Alginate hydrogels as biomaterials*. Macromol Biosci, 2006. **6**(8): p. 623-33.
13. Draget, K.I. and C. Taylor, *Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications*. Food Hydrocolloids, 2011. **25**(2): p. 251-256.
14. Hassan, R., A. Gobouri, and I. Zaafarany, *Kinetics and Mechanism of Sol-Gel Transformation between Sodium Alginate Anionic Polyelectrolyte and Some Alkaline Earth Metal Ions with Formation of Coordination Biopolymer Ionotropic Polymembrane Hydrogels of Capillary Structures*. Advances in Biosensors and Bioelectronics, 2013. **2**(3): p. 47-56.
15. Hernández, R., J. Sacristán, and C. Mijangos, *Sol/Gel Transition of Aqueous Alginate Solutions Induced by Fe<sup>2+</sup> Cations*. Macromolecular Chemistry and Physics, 2010. **211**(11): p. 1254-1260.
16. Jørgensen, T.E., et al., *Influence of Oligoguluronates on Alginate Gelation, Kinetics, and Polymer Organization*. Biomacromolecules, 2007. **8**: p. 2388-2397.
17. Dornish, M. and F. Rauh, *Alginate in An Introduction to Biomaterials*, S.A. Guelcher and J.O. Hollinger, Editors. 2005, CRC Press. p. 261-272.
18. LeRoux, M.A., F. Guilak, and L.A. Setton, *Compressive and shear properties of alginate gel: Effects of sodium ions and alginate concentration*. J Biomed Mater Res, 1999. **47**(1): p. 46-53.
19. Mørch, Y.A., et al., *Effect of Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, and Sr<sup>2+</sup> on Alginate Microbeads*. Biomacromolecules, 2006. **7**(5): p. 1471-80.
20. Mancini, F. and T.H. McHugh, *Fruit-alginate interactions in novel restructured products*. Nahrung, 2000. **44**: p. 152- 157.

21. Donati, I. and S. Paoletti, *Material Properties of Alginates*, in *Alginates: Biology and Applications*, B.H. Rehm, Editor. 2009, Springer Berlin Heidelberg. p. 1-53.
22. Bhatia, S., *Natural Polymer Drug Delivery Systems*. 1 ed. 2016, Switzerland: Springer International Publishing. 225.
23. Lu, L., et al., *Study on partially oxidized sodium alginate with potassium permanganate as the oxidant*. Journal of applied polymer science, 2009. **113**(6): p. 3585-9.
24. Yang, J.-S., Y.-J. Xie, and W. He, *Research progress on chemical modification of alginate: A review*. Carbohydrate Polymers, 2011. **84**(1): p. 33-39.
25. Dalheim, M.O., et al., *Efficient functionalization of alginate biomaterials*. Biomaterials, 2016. **80**: p. 146-56.
26. Berthiaume, F. and J.R. Morgan, *Methods in Bioengineering: 3D Tissue Engineering*. 2010: Artech House.
27. Mhanna, R., et al., *Chondrocyte culture in three dimensional alginate sulfate hydrogels promotes proliferation while maintaining expression of chondrogenic markers*. Tissue Eng Part A, 2014. **20**(9-10): p. 1454-64.
28. Ma, L., et al., *Anticoagulant sodium alginate sulfates and their mussel-inspired heparin-mimetic coatings*. J. Mater. Chem. B, 2016. **4**: p. 3203-15.
29. Maiti, S., S. Ranjit, and B. Sa, *Polysaccharide-Based Graft Copolymers in Controlled Drug Delivery*. International Journal of PharmTech Research, 2010. **2**: p. 1350-8.
30. Pawar, S.N. and K.J. Edgar, *Alginate esters via chemoselective carboxyl group modification*. Carbohydrate Polymers, 2013. **98**(2): p. 1288-1296.
31. Hasenhuettl, G.L. and R.W. Hartel, *Food Emulsifiers and Their Applications*. 2. ed. 2008, New York: Springer-Verlag 426.

32. Jindal, A.B., M.N. Wasnik, and H.A. Nair, *Synthesis of thiolated alginate and evaluation of mucoadhesiveness, cytotoxicity and release retardant properties*. Indian Journal of Pharmacy, 2010. **72**(6): p. 766-74.
33. Cho, S.S., *Handbook of Dietary Fiber*. 2001: CRC Press.
34. Sun, J. and H. Tan, *Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications*. Materials, 2013. **6**(4): p. 1285-1309.
35. Klemm, D., H.-P. Schmauder, and T. Heinze, *Cellulose*. Biopolymers Online, 2005. **6**: p. 275-312.
36. Wada, M., et al., *The structure of celluloses*. Powder Diffraction, 2008. **23**(2): p. 92-5.
37. Chen, H., *Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose*, in *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice*, H. Chen, Editor. 2014, Springer: Netherlands. p. 25-71.
38. Brown, R.M., *Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century?* Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2004. **42**(3): p. 487-495.
39. Festucci-Buselli, R.A., W.C. Otoni, and C.P. Joshi, *Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants*. Braz. J. Plant Physiol., 2007. **19**(1): p. 1-13.
40. Strachan, J., *Solubility of Cellulose in Water*. Nature 1938. **141**: p. 332-3.
41. Zhang, S., et al., *Dissolution behaviour and solubility of cellulose in NaOH complex solution*. Carbohydrate Polymers, 2010. **81**(3): p. 668-674.
42. Li, P. and R. Liu, *Cellulose Gels and Microgels: Synthesis, Service, and Supramolecular Interactions*, in *Supramolecular Polymer Networks and Gels*, S. Seiffert, Editor. 2015, Springer: Switzerland. p. 209-51.
43. Singh, P., et al., *From Cellulose Dissolution and Regeneration to Added Value Applications – Synergism Between Molecular Understanding and Material Development*. 2015.

44. Feller, R.L. and M. Wilt, *Evaluation of Cellulose Ethers for Conservation*. 1990: Getty Conservation Institute.
45. Ten, E. and W. Vermerris, *Functionalized Polymers from Lignocellulosic Biomass: State of the Art*. *Polymers*, 2013. **5**(2): p. 600-642.
46. Ballinas-Casarrubias, L., et al., *Biopolymers from Waste Biomass – Extraction, Modification and Ulterior Uses*. 2016.
47. Bouhdadi, R., et al., *Chemical modification of cellulose by acylation: Application to adsorption of methylene blue*. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 2011. **13**(1): p. 105-116.
48. Shokri, J. and K. Adibki, *Application of Cellulose and Cellulose Derivatives in Pharmaceutical Industries*. 2013.
49. Mark, H.F., *Encyclopedia of Polymer Science and Technology, Concise*. 3rd Edition ed. 2007, Hoboken, New Jersey: Wiley-Interscience. 1488.
50. Gilbert, R.D. and J.F. Kadla, *Polysaccharides – Cellulose*, in *Biopolymers from Renewable Resources*, D.L. Kaplan, Editor. 1998, Springer Berlin Heidelberg: Berlin. p. 47-95.
51. Gürdağ, G. and S. Sarmad, *Cellulose Graft Copolymers: Synthesis, Properties, and Applications*. 2013: p. 15-57.
52. Onofrei, M.-D. and A. Filimon, *Cellulose-based hydrogels: Designing concepts, properties, and perspectives for biomedical and environmental applications*, in *Polymer science: research advances, practical applications and educational aspects*, A. Méndez-Vilas and A. Solano, Editors. 2016, formatex: Badajoz, Spain. p. 108-20.
53. Edlund, U. and A.C. Albertsson, *A Microspheric System: Hemicellulose-based Hydrogels*. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 2008. **23**(2): p. 171-186.
54. Ebringerova, A. and Z. Hromadkova, *Xylan of Industrial and Biomedical Importance*. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1999. **16**: p. 325-346.

55. Martins, D.A.B., et al., *Agroindustrial Wastes as Substrates for Microbial Enzymes Production and Source of Sugar for Bioethanol Production*, in *Integrated Waste Management- Volume II*, M.S. Kumar, Editor. 2011, InTech: Shanghai. p. 319-360.
56. Bajpai, P., *Microbial Xylanolytic Enzyme System: Properties and Applications*. *Advances in Applied Microbiology*, 1997. **43**: p. 141-194.
57. Chanda, S.K., et al., *The constitution of xylan from esparto grass (Stipa tenacissima, L.)*. *J. Chem. Soc.*, 1950: p. 1289-1297.
58. Eda, S., A. Ohnishi, and K. Koto, *Xylan isolated from the stalks of Nicotiana tabacum*. *Agric Biol Chem*, 1976. **40**: p. 359-364.
59. Bastawde, K.B., *Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1992. **8**(4): p. 353-368
60. Rennie, E.A. and H.V. Scheller, *Xylan biosynthesis*. *Curr Opin Biotechnol*, 2014. **26**: p. 100-7.
61. Sun, S.N., et al., *Structural Characterization of Hemicelluloses from Bamboo Culms (Neosinocalamus Affinis)*. *Cellulose Chem. Technol.*, 2012. **46**(3-4): p. 165-176.
62. Kabel, M.A., et al., *Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose*. *Carbohydrate Polymers*, 2007. **69**(1): p. 94-105.
63. Busse-Wicher, M., et al., *The pattern of xylan acetylation suggests xylan may interact with cellulose microfibrils as a twofold helical screw in the secondary plant cell wall of Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2014. **79**(3): p. 492-506.
64. Deutschmann, R. and R.F. Dekker, *From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research*. *Biotechnol Adv*, 2012. **30**(6): p. 1627-40.
65. Hon, D.N.S., *Chemical Modification of Lignocellulosic Materials*. 1995: Taylor & Francis.

66. Sun, R.C., *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels: Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicelluloses and Cellulose*. 2010: Elsevier Science.
67. Cumpstey, I., *Chemical modification of polysaccharides*. ISRN Org Chem, 2013. **2013**: p. 1-27.
68. Petzold, K., et al., *Carboxymethyl Xylan - Control of Properties by Synthesis*. Macromolecular Symposia, 2005. **232**(1): p. 27-36.
69. Dumitriu, S., *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility, Second Edition*. 2004: CRC Press.
70. Belmokaddem, F.Z., et al., *Green synthesis of xylan hemicellulose esters*. Carbohydr Res, 2011. **346**(18): p. 2896-904.
71. Moine, C., et al., *Chemical valorization of forest and agricultural by-products. Obtention, chemical characteristics, and mechanical behavior of a novel family of hydrophobic films*. J Environ Sci Health B, 2004. **39**(4): p. 627-40.
72. da Silva, A.E., et al., *Xylan, a Promising Hemicellulose for Pharmaceutical Use, in Products and Applications of Biopolymers*, J. Verbeek, Editor. 2012, InTech: Croatia p. 61-84.
73. Semenčenko, V.V., *Ispitivanje različitih hibrida kukuruza kao sirovine za proizvodnju bioetanol, skroba i hrane za životinje 2013*, Tehnološko – Metalurški Fakultet, Univerzitet u Beogradu: Beograd. p. 289.
74. Oliveira, E.E., et al., *Xylan from corn cobs, a promising polymer for drug delivery: production and characterization*. Bioresour Technol, 2010. **101**(14): p. 5402-6.
75. Hromadkova, Z., J. Kovacikova, and A. Ebringerova, *Study of the classical and ultrasound-assisted extraction of the corn cob xylan*. Industrial Crops and Products, 1999. **9**: p. 101-109.
76. Dodd, D. and I.K. Cann, *Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production*. Glob Change Biol Bioenergy, 2009. **1**(1): p. 2-17.



77. Almdal, K., et al., *What is a 'gel'*. Macromol. Chem., Macromol. Symp., 1993. **76**: p. 49-51.
78. Park, M., et al., *Preparation and characterization of keratin-based biocomposite hydrogels prepared by electron beam irradiation*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2013. **33**(8): p. 5051-7.
79. Elisseeff, J., *Hydrogels: Structure starts to gel*. Nature Materials 2008. **7**: p. 271 - 273
80. Gibas, I. and H. Janik, *Review: Syntetic polymer hydrogels for biomedical applications* CHEMISTRY & CHEMICAL TECHNOLOGY, 2010. **4**(4): p. 297-304.
81. Gulrez, S.K.H., S. Al-Assaf, and G.O. Phillips, *Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications, in Progress in Molecular and Environmental Bioengineering- From Analysis and Modeling to Technology Applications*, A. Carpi, Editor. 2011, InTech: Croatia. p. 117-150.
82. Ebara, M., et al., *Smart Hydrogels, in Smart Biomaterials*, M. Ebara, et al., Editors. 2014, Springer: Japan. p. 9-65.
83. Ahmed, E.M., *Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review*. J Adv Res, 2015. **6**(2): p. 105-21.
84. Tomić S. Lj., Suljovrujić E. H., and F.J. M., *Biocompatible and bioadhesive hydrogels based on 2- hydroxyethyl methacrylate, monofunctional poly(alkylene glycol)s and itaconic acid* Polymer Bulletin 2006. **57**: p. 691–702.
85. Okay, O., *General Properties of Hydrogels, in Hydrogel Sensors and Actuators*, G. Gerlach and K.-F. Arndt, Editors. 2009, Springer-Verlag: Berlin. p. 1-14.
86. Pal, K., A.K. Banthia, and D.K. Majumdar, *Polymeric Hydrogels: Characterization and Biomedical Applications. Designed Monomers & Polymers*, 2009. **12**(3): p. 197-220.
87. Hoare, T.R. and D.S. Kohane, *Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges*. Polymer, 2008. **49**(8): p. 1993-2007.

88. Ganji F., Vasheghani-Farahani S., and V.-F. E., *Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review*. Iranian Polymer Journal, 2010. **19**(5): p. 375-398.
89. Peppas, N.A., et al., *Hydrogels in pharmaceutical formulations*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2000. **50**: p. 27-46.
90. Rogero S. O., et al., *Biocompatibility Study of Polymeric Biomaterials*. Artificial Organs, 2003. **27**(5): p. 424-427.
91. Lai, J.Y., *Biocompatibility of chemically cross-linked gelatin hydrogels for ophthalmic use*. J Mater Sci Mater Med, 2010. **21**(6): p. 1899-911.
92. Schmalz, G., *Determination of Biocompatibility*, in *Biocompatibility of Dental Materials*, G. Schmalz and D. Arenholt-Bindslev, Editors. 2009, Springer: Berlin. p. 13-43.
93. Cui, Q., et al., *A Combined Physical-Chemical Polymerization Process for Fabrication of Nanoparticle-Hydrogel Sensing Materials*. Macromolecules, 2012. **45**(20): p. 8382-8386.
94. Maitra, J. and V.K. Shukla, *Cross-linking in Hydrogels - A Review*. American Journal of Polymer Science, 2014. **4**(2): p. 25-31.
95. Patil, P., D. Chavanke, and M. Wagh, *A review on ionotropic gelation method: novel approach for controlled gastroretentive gelspheres* International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2012. **4**: p. 27-32.
96. Omidian, H. and K. Park, *Hydrogels*, in *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*, J. Siepmann, R.A. Siegel, and M.J. Rathbone, Editors. 2012, Springer US: New York. p. 75-106.
97. Fan, W., et al., *Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2012. **90**: p. 21-7.
98. Koukaras, E.N., et al., *Insight on the formation of chitosan nanoparticles through ionotropic gelation with tripolyphosphate*. Mol Pharm, 2012. **9**(10): p. 2856-62.

99. Garcia, L., M.R. Aguilar, and J. San Roman, *Biodegradable Hydrogels for Controlled Drug Release*, in *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*, R.M. Ottenbrite, K. Park, and T. Okano, Editors. 2010, Springer New York. p. 147-155.
100. Tako, M., et al., *The Principles of Starch Gelatinization and Retrogradation*. Food and Nutrition Sciences, 2014. **05**(03): p. 280-291.
101. Hennink, W.E. and C.F. van Nostrum, *Novel crosslinking methods to design hydrogels*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002. **54**: p. 13-36.
102. El-Sherbiny, I.M. and M.H. Yacoub, *Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges*. Glob Cardiol Sci Pract, 2013. **2013**(3): p. 316-42.
103. Akhtar, M.F., M. Hanif, and N.M. Ranjha, *Methods of synthesis of hydrogels ... A review*. Saudi Pharmaceutical Journal, 2015.
104. Jiang, F., et al., *Mechanical properties of tough hydrogels synthesized with a facile simultaneous radiation polymerization and cross-linking method*. Radiation Physics and Chemistry, 2015. **106**: p. 7-15.
105. Darwis, D., *Role of radiation processing in production of hydrogels for medical applications*. Atom Indonesia, 2009. **35**(2): p. 85-104.
106. Jin, R. and P.J. Dijkstra, *Hydrogels for Tissue Engineering Applications*, in *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*, R.M. Ottenbrite, K. Park, and T. Okano, Editors. 2010, Springer: New York. p. 203-225.
107. Paleos, G.A. *What Are Hydrogels*. 2012.
108. Chirani, N., et al., *History and Applications of Hydrogels*. Journal of Biomedical Sciences, 2016. **4**(2): p. 1-23.
109. Kolodynska, D., et al., *Hydrogels from Fundamentals to Application*. 2016.
110. Caló, E. and V.V. Khutoryanskiy, *Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products*. European Polymer Journal, 2015. **65**: p. 252-267.

111. Sharpe, L.A., et al., *Therapeutic applications of hydrogels in oral drug delivery*. *Expert Opin Drug Deliv*, 2014. **11**(6): p. 901-15.
112. Simões, S., *Modular Hydrogels for Drug Delivery*. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2012. **03**(02): p. 185-199.
113. Institute, C.a.L.S., *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Eighth Edition*. 2009: Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
114. Tsukatani, T., et al., *Comparison of the WST-8 colorimetric method and the CLSI broth microdilution method for susceptibility testing against drug-resistant bacteria*. *J. Microbiol. Method* 2012. **90**: p. 160-166.
115. Bernfeld, P., *Amylases, alpha and beta*. *Methods in enzymology*, 1955. **1**: p. 149-158.
116. Evans, D.F., et al., *Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects*. *Gut*, 1988. **29**(8): p. 1035-1041.
117. Alemzadeh, I. and S. Nejati, *Removal of Phenols with Encapsulated Horseradish Peroxidase in Calcium Alginate*. *Iran. J. Chem. Chem. Eng.*, 2009. **28**: p. 43-49.
118. Bayramoğlu, G. and M.Y. Arıca, *Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: Horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads*. *Journal of Hazardous Materials*, 2008. **156**(1-3): p. 148-155.
119. Monier, M., et al., *Immobilization of horseradish peroxidase on modified chitosan beads*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010. **46**(3): p. 324-330.
120. Mohan, S.V., et al., *Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process*. *Chemosphere*, 2005. **58**(8): p. 1097-105.
121. Jr, O.A., et al., *Tyramine electropolymerization revisited by DFT and experimental study*. *Journal of Molecular Structure*, 2013. **1037**: p. 200-208.
122. Park, M.-C., et al., *Ketoprofen-LDH Nanohybrid for Transdermal Drug Delivery System*. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2012. **33**(6): p. 1827-1828.

123. Sivakumar, R., N.N. Rajendran, and N. Narayanan, *Design of mucoadhesive hydrophilic beads entrapped with ketoprofen for delivery into small intestine*. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 2011. **2**(1): p. 706-13.

## 7. BIOGRAFIJA

Dragica Spasojević je rođena u Sremskoj Mitrovici, 02. maja 1984. godine. Hemijski fakultet, Univerziteta u Beogradu, na katedri za biohemiju, upisala je školske 2003/04. godine. Diplomirala je 2009. godine sa prosečnom ocenom 8,94 i ocenom 10 na diplomskom radu. Doktorske studije na Hemijskom fakultetu, smer – doktor biohemijskih nauka, upisala je školske 2010/11. godine.

Od oktobra 2011. godine zaposlena je kao istraživač–pripravnik u Institutu za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu. Od marta 2012. do danas radi kao istraživač–saradnik na istom institutu, na projektu osnovnih istraživanja 173017 ("Istraživanje strukture – funkcija u ćelijskom zidu biljaka i izmene strukture zida enzimskim inženjeringom").

Do sada je objavila 7 naučnih radova u časopisima sa impakt faktorom, od toga dva rada iz doktorske teze kao prvi autor, jedan kategorije M21 i jedan kategorije M23.

## Izjava o autorstvu

Potpisana Dragica Spasojević

Broj indeksa \_\_\_DB 07/2010\_\_\_\_\_

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Modifikacija alginata, celuloze i ksilana iz ćelijskog zida biljaka, fenolnim jedinjenjima i aminima, za dobijanje hidrogelova“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu,

Potpis doktoranda



---

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora \_\_Dragica Spasojević \_\_\_\_

Broj upisa \_\_\_\_\_ DB 07/2010 \_\_\_\_\_

Studijski program \_doktor biohemijskih nauka \_\_\_\_\_

Naslov rada „Modifikacija alginata, celuloze i ksilana iz ćelijskog zida biljaka, fenolnim jedinjenjima i aminima, za dobijanje hidrogelova “

Mentor dr Radivoje Prodanović, vanredni profesor Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

Potpisani \_\_\_\_\_

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci, vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu,

Potpis doktoranda





## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Modifikacija alginata, celuloze i ksilana iz ćelijskog zida biljaka, fenolnim jedinjenjima i aminima, za dobijanje hidrogelova “

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu, pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju, pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu, mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci).

U Beogradu,

Potpis doktoranda



---