

UNIVERZITET U BEOGRADU  
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Jelena P. Spasojević

**RADIJACIONO-HEMIJSKA SINTEZA  
TERMO- I pH-OSETLJIVIH  
ANTIBAKTERIJSKIH SREBRO/POLI(N-  
IZOPROPILAKRILAMID-*ko*-ITAKONSKA  
KISELINA) NANOKOMPOZITA**

Doktorska disertacija



Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Jelena P. Spasojević

**RADIATION-CHEMICAL SYNTHESIS OF  
THERMO- AND pH-SENSITIVE  
ANTIBACTERIAL SILVER/POLY(N-  
ISOPROPILACRYLAMIDE-co-ITACONIC  
ACID) NANOCOMPOSITES**

Doctoral dissertation



Belgrade, 2016

**Mentori:**

---

dr Melina Kalagasidis Krušić, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški  
fakultet

---

dr Aleksandra Radosavljević, viši naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke  
„Vinča“

**Članovi komisije:**

---

dr Marija Nikolić, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški  
fakultet

---

dr Zorica Kačarević-Popović, naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke  
„Vinča“

---

dr Nedeljko Milosavljević, naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu

**Datum odbrane:**

---

*Doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za radijacionu hemiju i fiziku „Gama“ i Laboratoriji za atomsku fiziku, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, i rezultat je istraživanja u okviru projekta pod nazivom „Funkcionalni, funkcionalizovani i usavršeni nano materijali“ br. III 45005, finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.*

*Deo istraživanja u toku izrade ove doktorske disertacije urađen je u saradnji sa sledećim institucijama:*

- Klinika za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Klinički centar Srbije*
- Institut za mikrobiologiju, Vojnomedicinska akademija, Beograd*
- Institut za anatomiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu*
- Institut za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu*
- Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu*

Zahvaljujem se

*dr Aleksandri Radosavljević, višem naučnom saradniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, na bezrezervnoj podršci, svesrdnoj pomoći i idejama koje su doprinele uspešnom savladavanju svih prepreka u toku izrade ove doktorske disertacije;*

*dr Zorici Kačarević-Popović, naučnom savetniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, na posvećenosti i nesebičnom zalaganju koji su doprineli da doktorska disertacija poprimi ovaj oblik i kvalitet;*

*dr Melini Kalagasidis Krušić, vanrednom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na sugestijama, konstruktivnim diskusijama i pomoći u svim fazama izrade ove doktorske disertacije;*

*dr Mariji Nikolić, vanrednom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu i dr Nedeljku Milosavljeviću, naučnom saradniku Univerziteta u Beogradu, na stručnom mišljenju i predlozima tokom finalizacije doktorske disertacije;*

*koleginici Jeleni Krstić na timskom radu i podršci tokom izrade ove doktorske disertacije;*

*mojim prijateljima koji su svojom podrškom i strpljenjem učinili izradu ove doktorske disertacije mnogo lakšom.*

*Posebnu zahvalnost dugujem svojim roditeljima, Predragu i Radosiji, na prenetoj ljubavi i usađenim životnim vrednostima i bratu Nebojši na neograničenoj podršci i veri.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojim najvećim ljubavima, suprugu Vuku i ćerki Nini, čiji osmesi ulepšavaju svaki moj dan. Njima posvećujem ovu doktorsku disertaciju.*

## REZIME:

# Radijaciono-hemijska sinteza termo- i pH-osetljivih antibakterijskih srebro/poli(*N*-izopropilakrilamid-*ko*-itakonska kiselina) nanokompozita

U okviru ove doktorske disertacije izvedena je radijaciono-hemijska sinteza i karakterizacija novih nanokompozita na bazi umreženih polimernih matrica *N*-izopropilakrilamida (NiPAAm) i itakonske kiseline (IK) i nanočestica srebra (Ag/P(NiPAAm/IK)). Za sintezu nanokompozita je korišćena radiolitička metoda koja omogućava umrežavanje i fino podešavanje svojstava nosača tj. polimerne matrice, ali i formiranje nanočestica srebra željenih svojstava unutar polimerne matrice (*in situ* sinteza). Radiolitička metoda sinteze je izvedena pod dejstvom gama zračenja na kobaltnom (<sup>60</sup>Co) izvoru. Sintetisani uzorci su podvrgnuti detaljnoj fizičko-hemijskoj karakterizaciji u cilju dobijanja informacija o polimernim matricama kao nosačima i nanočesticama srebra kao nanopuniocima, ali i u cilju ispitivanja njihovog sinergističkog dejstva u nanokompozitnim sistemima.

Morfologija umreženih sistema je ispitana primenom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) i mikro kompjuterizovane topografije (mikro-CT), a studija bubrenja praćenjem kinetike bubrenja u medijumima različitih pH-vrednosti i temperature, pri čemu su simulirani fiziološki uslovi. Utvrđeno je da prisustvo itakonske kiseline i inkorporacija nanočestica srebra utiču na morfologiju nanokompozita, parametre polimerne mreže, kao i na kapacitet bubrenja.

Optička svojstva nanokompozita su ispitana metodom spektroskopije u ultraljubičastoj i vidljivoj oblasti spektra (UV-Vis) i teorijskim modelovanjem primenom MiePlot 3.4 programskog paketa čiji je algoritam zasnovan na Mie-ovoj teoriji. U apsorpcionim spektrima je zapažena karakteristična plazmonska apsorpcija sa maksimumom u opsegu od 390 nm do 412 nm, dok je

modelovanjem određeno da se vrednost prečnika nanočestica srebra kreće između

6,8 nm i 16,2 nm.

Strukturalna karakterizacija nanočestica srebra izvedena je primenom metode difrakcije rendgenskog zračenja (XRD), dok su morfološka ispitivanja izvršena mikroskopskim metodama (SEM i TEM). Pokazano je da su sintetisane nanočestice srebra sfernog oblika, veličine oko 16 nm kao i da poseduju površinski centriranu kubnu (*eng. face centered cubic - fcc*) kristalnu strukturu. Nanočestice su unutar polimerne matrice stabilisane isključivo fizičkim interakcijama, što je pokazano metodom infracrvene spektroskopije sa Fourier-ovom transformacijom (FTIR) i fotoelektronskom spektroskopijom rendgenskih zraka (*X-ray photoelectron spectroscopy-XPS*).

Mehaničke karakteristike sintetisanih sistema su ispitane na termomehaničkom analizatoru TMA Q400EM (u statičkim uslovima) i DMA Rheometrics 605 analizatoru (u dinamičkim uslovima). Utvrđeno je da promena odnosa komonomernih komponenti utiče na mehanička svojstva sistema, kao i da nanokompoziti pokazuju znatno bolje mehaničke karakteristike u odnosu na polimernu matricu, te se može smatrati da nanočestice srebra deluju kao ojačanja u ispitanim nanokompozitima.

Takođe, ispitana je mogućnost primene nanokompozitnih sistema za kontrolisano otpuštanje aktivnih supstanci praćenjem kinetike oslobađanja jona srebra, a zatim i modelovanjem dobijenih rezultata primenom različitih farmakokinetičkih modela. Utvrđeno je da ispitivani nanokompoziti mogu biti korišćeni kao sistemi za kontrolisano otpuštanje jona srebra, a da kinetika otpuštanja zavisi od svojstava polimerne matrice, ali i od oblika i veličine samih nanočestica srebra. Antibakterijski potencijal je ispitan na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, dok je analiza citotoksičnosti izvedena na keratinocitnim ćelijama kože. Dobijeni rezultati ukazuju da se sintetisani sistemi mogu uspešno koristiti kao terapijski agens u interakciji sa bakterijama (*Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*) u okviru terapijskih doza koje se kreću

između 0,78-12,5 ppm. Promenom odnosa komonomernih komponenti, kao i veličinom i koncentracijom nanočestica srebra unutar polimerne matrice, svaki od ispitanih sistema može biti sintetisan tako da bude primenljiv kao terapijski agens u tretmanu zarastanja rana (npr. u dijabetologiji). Ispitani sistemi u obliku hidrogelnih obloga pokazali su zadovoljavajuću antibakterijsku aktivnost ispod granica citotoksičnosti i bez štetnih dejstava po okolno tkivo.

*Ključne reči:* N-izopropilakrilamid, itakonska kiselina, nanočestice srebra, gama zračenje, inteligentni hidrogelovi, nanokompoziti, otpuštanje jona srebra, antimikrobna aktivnost, citotoksičnost

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Hemijsko inženjerstvo

UDK: 542.913 : 615.281 : 66.017



**ABSTRACT:**

Radiation-chemical synthesis of thermo- and pH-sensitive  
antibacterial silver/poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-itaconic acid)  
nanocomposites

In this study, radiation-chemical synthesis and characterization of the novel nanocomposite systems based on silver nanoparticles (AgNPs) and crosslinked copolymer matrix of *N*-isopropylacrylamide (NiPAAm) and itaconic acid (IA) (Ag/P(NiPAAm/IA)) were performed. Radiolytic method, which is used for synthesis, enables fine tuning of properties of polymer matrix as a carrier, as well as formation of the silver nanoparticles with desired properties within polymer matrix (*in situ* synthesis). The radiolytic synthesis method is carried out by gamma irradiation at a cobalt (<sup>60</sup>Co) radiation facility. Synthesized samples were undergo to detailed physico-chemical characterization in order to obtain information about polymer matrix as a carrier and silver nanoparticles as a nanofillers, but also to examine their synergistic effects in the nanocomposite systems.

Morphology of the crosslinked systems was performed by scanning electron microscopy (SEM) and micro computerized topography (micro-CT), while swelling study was performed by monitoring the swelling kinetics in the swelling media with different pH and temperature, i.e. in simulated physiological conditions. It has been shown that the addition of itaconic acid and incorporation of AgNPs have influences on the morphology, network parameters as well as on the swelling capacity.

The optical properties of the nanocomposites were investigated by ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis) and theoretical modeling using MiePlot 3.4 software package, with algorithm based on Mie's theory. Obtained absorption spectra exhibit the characteristic plasmon peak with maxima

between 390 nm and 412 nm, while the modeling has shown that the mean size of the silver nanoparticles was in the range between 6.8 nm and 16.2 nm.

Structural characterization of the nanoparticles was performed using X-Ray diffraction (XRD), whereas microscopic methods (SEM and TEM) were used for morphological investigation. It has been shown that the synthesized silver nanoparticles are spherical in shape with the size of about 16 nm with the face centered cubic (*fcc*) crystal structure. The stabilization of the silver nanoparticles within the polymer networks occurs only through the physical interactions, which was confirmed by infrared spectroscopy with Fourier transform (FTIR) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS).

Mechanical properties were examined by thermomechanical analysis on TMA Q400EM (in static mode) and on DMA 605 rheometrics (in dynamic mode). It was shown that comonomers ratio has strong influence on mechanical properties of polymer networks. Moreover, the obtained results indicate that nanocomposites have much better mechanical properties compared with polymer network, and hence it can be considered that AgNPs act as additional reinforcement in the investigated nanocomposites.

The possibility of potential application of these nanocomposite hydrogels in silver controlled release systems was tested by monitoring of silver ion release from nanocomposites, and modeling of obtained results using different pharmacokinetic models. It was found that the investigated systems can be used as systems for the controlled release of silver ions, and that release kinetics depends on diffusion characteristics of polymer matrix, as well as on morphology and size of silver nanoparticles embedded in the matrix. Antibacterial potential was investigated against Gram-positive and Gram-negative bacteria, while cytotoxicity test was carried out on skin keratinocyte cells. Obtained results show that investigated systems can be successfully used as a therapeutic agents to interact with bacteria (*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) within the therapeutic interval between 0.78-12.5 ppm. Changing ratio of comonomer components as well as size and concentration of

silver nanoparticles within the polymer matrix, each system can be synthesized in such way that it can be applicable as a therapeutic agent in the treatment of wound healing (for example in diabetology). The investigated systems in the form of hydrogel wound dressing, showed optimal antibacterial activity, below the cytotoxicity level, and without any harmful effects on the surrounding tissue.

*Key words:* N-isopropylacrylamide, itaconic acid, silver nanoparticles, gamma irradiation, intelligent hydrogels, nanocomposites, silver ion release, antimicrobial activity, cytotoxicity

Scientific area: Technological engineering

Field: Chemical engineering

UDC: 542.913 : 615.281 : 66.017

# SADRŽAJ

## POGLAVLJE I – UVOD I TEORIJSKI DEO

<b>1. Uvod</b> .....	1
1.1. Cilj rada .....	3
<b>2. Teorijski deo</b> .....	5
2.1. Kompozitni materijali .....	5
2.1.1. Nanokompozitni materijali .....	5
2.1.2. Polimerni nanokompoziti .....	6
2.2. Hidrogelovi .....	7
2.2.1. Pojam hidrogelova .....	7
2.2.2. Klasifikacija i metode dobijanja hidrogelova .....	8
2.2.3. Osnovna svojstva i struktura hidrogelova .....	10
2.2.4. Hidrogelovi osetljivi na spoljašnje stimulanse .....	14
2.2.5. Hidrogelovi kao nosači nanočestica srebra .....	17
2.2.6. Mehanička svojstva hidrogelova kao nosača .....	20
2.3. Nanočestice metala .....	22
2.3.1. Pojam i osnovna svojstva nanočestica metala .....	22
2.3.2. Metode sinteze nanočestica metala .....	27
2.3.3. Nanočestice metala kroz istoriju .....	29
2.3.4. Nanočestice srebra .....	31
2.3.5. Antibakterijski potencijal srebra i primena u medicini .....	32
2.3.6. Citotoksičnost nanočestica srebra .....	36
2.3.7. Kliničke studije i preporuke za bezbednu upotrebu nanočestica srebra .....	38

2.4. Radijaciono-hemijski aspekti sinteze nanokompozitnih sistema .....	40
2.4.1. Visoko energijski izvori zračenja .....	40
2.4.2. Osnovni pojmovi u radijacionoj hemiji .....	41
2.4.3. Uticaj jonizujućeg zračenja na materiju .....	44
2.4.4. Radiolitičko umrežavanje polimera .....	45
2.4.5. Radiolitička sinteza nanokompozitnih sistema .....	50
2.4.6. Prednosti radiolitičke metode .....	52
2.5. Mogućnosti primene Ag/hidrogel nanokompozita .....	54

## **POGLAVLJE II – EKSPERIMENTALNI DEO**

<b>3. Eksperimentalni deo .....</b>	<b>57</b>
3.1. Materijali .....	57
3.2. Sinteza hidrogelova i nanokompozita .....	59
3.2.1. Sinteza polimernih matrica (hidrogelova) .....	60
3.2.2. Sinteza nanokompozita .....	61
3.3. Karakterizacija hidrogelova i nanokompozita .....	61
3.3.1. Fizičko-hemijska karakterizacija hidrogelova i nanokompozita .....	62
3.3.2. Morfološke karakteristike hidrogelova i nanokompozita .....	63
3.3.3. Karakteristike nanočestica srebra .....	64
3.3.4. Interakcije između nanočestica i polimerne matrice .....	64
3.3.5. Mehanička svojstva hidrogelova i nanokompozita .....	65
3.3.6. Biomedicinski potencijal sintetisanih nanokompozita .....	66

## **POGLAVLJE III – REZULTATI I DISKUSIJA**

<b>4. Procena efikasnosti izabrane radijaciono-hemijske metode sinteze .....</b>	<b>70</b>
4.1. Određivanje mase neproreagovalih materija .....	70

4.2. Određivanje udela gel faze u polimernim matricama .....	70
4.3. Udeo itakonske kiseline u polimernim matricama.....	71
4.4. Infracrvena spektroskopija sa Fourier-ovom transformacijom .....	72
<b>5. Optička svojstva sintetisanih sistema .....</b>	<b>74</b>
5.1. Apsorpcioni spektri nanokompozita .....	74
5.2. Teorijsko modelovanje apsorpcionih spektara i procena veličine inkorporiranih nanočestica srebra .....	76
<b>6. Fizičko-hemijska svojstva hidrogelova i nanokompozita.....</b>	<b>80</b>
6.1. Studija bubrenja i kinetika difuzije .....	80
6.1.1. <i>Bubrenje u vodi</i> .....	80
6.1.2. <i>Temperaturna osetljivost hidrogelova i nanokompozita</i> .....	86
6.1.3. <i>pH osetljivost hidrogelova i nanokompozita</i> .....	91
<b>7. Morfologija polimernih matrica i strukturna svojstva nanokompozita.....</b>	<b>93</b>
7.1. Parametri mreže polimernih matrica.....	93
7.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija.....	95
7.3. Mikro-kompjuterizovana topografija ( $\mu$ -CT) .....	97
7.4. Analiza nanokompozita infracrvenom spektroskopijom sa Furie-ovom transformacijom.....	101
7.5. Fotoelektronska spektroskopija X zraka (XPS).....	102
7.6. Mikrostrukturna analiza difrakcijom rendgenskih zraka (XRD) .....	105
7.7. Morfologija nanočestica srebra .....	111
<b>8. Mehanička svojstva hidrogelova i nanokompozita.....</b>	<b>113</b>
8.1. Ispitivanja u statičkom režimu rada .....	114
8.2. Ispitivanja u dinamičkom režimu rada .....	117

<b>9. Biomedicinski potencijal Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita .....</b>	<b>119</b>
9.1. Otpuštanja jona srebra iz Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita u <i>in vitro</i> uslovima.....	119
9.2. Ispitivanje baktericidnog dejstva nanokompozita.....	123
9.2.1. Difuzionna test metoda.....	124
9.2.2. Metoda merenja optičke gustine .....	126
9.3. Citotoksičnost Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita.....	128
 <b>POGLAVLJE IV - ZAKLJUČAK</b>	
<b>10. Zaključak.....</b>	<b>131</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>134</b>
<b>PRILOG I.....</b>	<b>157</b>
<b>PRILOG II .....</b>	<b>160</b>
<b>BIOGRAFIJA AUTORA.....</b>	<b>163</b>

## SPISAK SKRAĆENICA I SIMBOLA

### *I Skraćenice*

Ag/PNiPAAm	Srebro/poli( <i>N</i> -izopropilakrilamid)
Ag/P(NiPAAm/IK)	Srebro/poli( <i>N</i> -izopropilakrilamid- <i>ko</i> -itakonska kiselina)
AFM	Mikroskopija atomskih sila
BE	Energija veze ( <i>eng. Binding energy</i> )
DMA	Dinamičko-mehanička analiza
EPA	Agencija za zaštitu životne sredine ( <i>eng. Environmental protection agency</i> )
E.C.	<i>Escherichia coli</i>
FBS	Fetalni serum ( <i>eng. Fetal Bovine Serum</i> )
fcc	Površinski centrirana kubna struktura ( <i>eng. Face centered cubic structure</i> )
FTIR	Infracrvena spektroskopija sa Fourier-ovom transformacijom
FWHM	Širina apsorpcione trake na poluvisini ( <i>eng. full width at half maximum</i> )
HEKs	Keratinocitne ćelije kože ( <i>eng. human epidermal keratinocytes</i> )
HaCaT	Ćelijska linija zdravih humanih keratinocita
IK	Itakonska kiselina
LCST	Donja kritična temperatura rastvora ( <i>eng. Lower critical solution temperature</i> )
MIC	Minimalna inhibitorna koncentracija
MBC	Minimalna baktericidna koncentracija
μ-CT	Mikro kompjuterizovana topografija
NiPAAm	<i>N</i> -izopropilakrilamid
OD metoda	Metoda optičke gustine
P(NiPAAm)	Poli( <i>N</i> -izopropilakrilamid)
P(NiPAAm/IK)	Poli( <i>N</i> -izopropilakrilamid- <i>ko</i> -itakonska kiselina)
PHEMA	Poli(2-hidroksietil metakrilat)



PVA	Poli(vinil alkohol)
PVP	Poli(vinil piroolidon)
PLGA	Poli(mlečna- <i>ko</i> -glikolna kiselina)
PEG	Poli(etilen glikol)
PAA	Poli(akril amid)
PEGD	Poli(etilen glikol dimetakrilat)
PMMA	Poli(metil metakrilat)
RBE	Relativna biološka efikasnost
S.A.	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEM	Skenirajuća elektronska mikroskopija
SBF	Simulirana telesna tečnost ( <i>eng. Simulated body fluid</i> )
SPR	Površinske plazmonske apsorpcije ( <i>eng. surface plasmon resonance</i> )
STM	Skenirajući tunelski mikroskop( <i>eng. Scanning Tunnelig Microscopy</i> )
TEM	Transmisiona elektronska mikroskopija
TMA	Termo-mehanička analiza
UCST	Gornja kritična temperatura rastvora ( <i>eng. Upper critical solution temperature</i> )
UV-Vis	Spektroskopija u ultraljubičastoj i vidljivoj oblasti spektra
WHO	Svetska zdravstvena organizacija ( <i>eng. World Health Organization</i> )
XRD	Difrakcija rendgenskih zraka ( <i>eng. X-ray diffraction</i> )
XPS	Fotoelektronska spektroskopija rendgenskih zraka ( <i>eng. X-ray photoelectron spectroscopy</i> )

## II Simboli

$a$	Parametar kristalne rešetke
$a'$	Parametar u Etter modelu bubrenja
$Ar(Ag)$	Atomska masa srebra
$A$	Parametar u Kopcha modelu otpuštanja jona srebra
$B$	Parametar u Kopcha modelu otpuštanja jona srebra
$b$	Parametar u Etter modelu bubrenja
$C$	Parametar u Kopcha modelu otpuštanja jona srebra
$C_n$	Karakterističan Florijev odnos
$c_{HGNC}$	Molarna koncentracija inkorporiranih nanočestica srebra
$c(AgAAS)/gHG$	Totalna koncentracija srebra određena atomskom apsorpcionom spektroskopijom
$c_{tot}$	Totalna koncentracija srebra određena ispitivanjem otpuštanja jona srebra u fiziološkim uslovima
$d$	Međuravansko rastojanje
$D_y$	Jedinične doze zračenja
$D_{sch}$	Veličina kristalita (Debaj-Sherrer-ova jednačina)
$D_{WH}$	Veličina kristalita (Williams Hall metoda)
$D_{WHM}$	Veličina kristalita (modifikovana Williams Hall metoda)
$D_d$	Koeficijent difuzije u procesu otpuštanja jona srebra
$D_{Early}$	Koeficijent difuzije u procesu bubrenja ( <i>eng. Early-time model</i> )
$D_{Late}$	Koeficijent difuzije u procesu bubrenja ( <i>eng. Late-time model</i> )
$D_{Etter}$	Koeficijent difuzije u procesu bubrenja ( <i>eng. Etter model</i> )
$\delta$	Debljina kserogela
$\delta_D$	Gustina dislokacija
$\varepsilon$	Deformacija kristalita
$\varepsilon_{fc}$	Deformacija kidanja

$E_0$	Redoks potencijal srebra
$E_c$	Modul kompresibilnosti
$E_y$	Jungov modul elastičnosti
$\phi$	Funkcionalnost umreživača
$G'$	Modul sačuvane energije
$G''$	Modul izgubljene energije
$(h, k, l)$	Milerovi indeksi određene kristalografske ravni
$X$	Maseni udeo jonske komponente
$\chi$	Parametar interakcije polimer-rastvarač
$\xi$	Veličina pora
$x$	Gustina umreženja određena sol-gel analizom nakon procesa zračenja
$x_0$	Broj strukturnih jedinica glavnog lanca umreženih apsorbovanom dozom
$I$	Jonska jačina medijuma za bubrenje
$k$	Kinetička konstanta bubrenja
$k_c$	Konstanta kubne strukture ( $k=0,9$ )
$k_d$	Konstanta brzine kontrakcije
$K_{a1}$	Prva konstanta jonizacije itakonske kiseline
$K_{a2}$	Druga konstanta jonizacije itakonske kiseline
$k_{KP}$	Konstanta brzine difuzije Korsmeyer-Peppas modela
$k_h$	Konstanta brzine difuzije Higuchi modela
$k_{hc}$	Konstanta brzine difuzije Hixon-Crowel modela
$k_{mb}$	Konstanta brzine difuzije Makoid-Banakar modela
$m_k$	Masa kserogela
$m_{k1}$	Masa kserogela pre procesa ekstrakcije
$m_{k2}$	Masa kserogela posle procesa ekstrakcije

$m_{hs}$	Masa hidrogela nakon sinteze
$m_{hr}$	Mase hidrogela u ravnotežnom stanju
$m_{ht}$	Masa hidrogela u nabubrelom stanju u trenutku $t$
$m_{hk}$	Masa kontrahovanog hidrogela na kraju procesa kontrakcije
$m_1$	Masa piknometra napunjenog toluenom
$m_2$	Masa piknometra u kome se nalaze toluen i uzorak
$l_{cc}$	Dužina C-C veze za polimere vinilnog tipa
$\lambda$	Talasna dužina X-zraka
$M_c$	Molarna masa između dve tačke umreženja
$M_r$	Molarna masa ponavljajuće jedinice
$\mu$	Poasonov koeficijent
$n$	Karakterističan eksponent dobijen praćenjem kinetike bubrenja
$n_{MB}$	Karakterističan eksponent Makoid-Banakar modela dobijen praćenjem procesa otpuštanja jona srebra
$pK_{a1}$	Prva konstanta disocijacije itakonske kiseline
$pK_{a2}$	Druga konstanta disocijacije itakonske kiseline
$r$	Poluprečnik nanočestica srebra dobijen teorijskim modelovanjem apsorpcionih spektara
$R$	Univerzalna gasna konstanta
$r_d$	Brzina procesa kontrakcije hidrogelova
$\rho_c$	Stepen umreženja određen iz bubrenja
$\rho_1 = \rho_{\times g}$	Gustina polimerne matrice (kserogela)
$\rho_2$	Gustina medijuma za bubrenje
$\rho_T$	Gustina toluena
$\rho(Ag)$	Teorijska vrednost gustine srebra kao kompaktnog materijala
$s$	Sol faza
$SD$	Stepen bubrenja

$SD_{eq}$	Ravnotežni stepen bubrenja
$S.a.$	Specifična površina nanočestica srebra
$S_{bulk}$	Rastvorljivost nanočestica srebra
$\sigma$	Napon
$\sigma_{fc}$	Napon kidanja
$tg \delta$	Faktor prigušenja
$\vartheta$	Ugao difrakcije
$T$	Temperatura
$y$	Gustina kidanja lanaca
$y_0$	Broj strukturnih jedinica lanca na kojima je došlo do kidanja veze
$\gamma$	Teorijska vrednost površinskog napona nanočestica srebra
$Y(Ag)$	Teorijska vrednost Jungovog modula za srebro
$V_1$	Molarna zapremina medijuma za bubrenje
$V_m$	Molarna zapremina nanočestica
$V_{sfere}$	Izračunata zapremina sferne nanočestice
$\nu$	Specifična zapremina polimera
$\nu_e$	Efektivna gustina umreženja dobijena mehaničkom analizom
$\nu_f$	Fermijeva brzina za srebro
$\Delta\omega_{1/2}$	Širina apsorpcione trake na poluvisini
$W_g$	Maseni udeo gel faze u polimernoj matrici
$\nu_{2s}$	Udeo polimera u nabubrelom stanju
$\nu_{2r}$	Udeo polimera nakon sinteze

## SPISAK SLIKA I TABELA

### *I Spisak slika*

**Slika 2.1.** Šematski prikaz oslobađanja nanočestica iz termo- i pH-osetljivih hidrogelova.

**Slika 2.2.** Vrste adsorpcije polimera na površinu metalnih nanočestica: horizontalna (a), vertikalna (b) i adsorpcija u obliku petlje (c).

**Slika 2.3.** Adsorpcioni spektri sfernih Ag nanočestica različitih veličina (a) i Au nanočestica različitog oblika (b).

**Slika 2.4.** Primeri upotrebe nanostrukturnih materijala: Likurgov pehar (a), Lustreware keramika (b), vitraž (c) i „damask“ sablja (d).

**Slika 2.5.** Različiti mehanizmi antimikrobnog delovanja nanočestica srebra.

**Slika 2.6.** Šematski prikaz procesa umrežavanja polimera (stvaranje intra- i intermolekulskih veza).

**Slika 2.7.** Šematski prikaz formiranja PNiPAAm polimerne mreže.

**Slika 2.8.** Šematski prikaz formiranja P(NiPAAm/IK) polimerne mreže.

**Slika 2.9.** Šematski prikaz dobijanja nanokompozita metodom gama zračenja.

**Slika 3.1.** Strukturna formula *N*-izopropilakrilamida.

**Slika 3.2.** Strukturna formula itakonske kiseline.

**Slika 4.1.** FTIR spektri homopolimernih (a) i kopolimernih (b) hidrogelova.

**Slika 5.1.** Izgled uzoraka: PNiPAAm i Ag/PNiPAAm kserogelovi (a) i različite nijanse obojenja Ag/PNiPAAm nanokompozita u zavisnosti od koncentracije AgNO<sub>3</sub> (mM) (b).

**Slika 5.2.** UV-Vis spektri Ag/PNiPAAm nanokompozita (puna linija) i spektri dobijeni iz MiePlot simulacije (isprekidana linija).

**Slika 5.3.** UV-Vis spektri Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita (puna linija) i spektri dobijeni iz MiePlot simulacije (isprekidana linija).

**Slika 6.1.** Krive bubrenja PNiPAAm (a) i P(NiPAAm/IK) (b) hidrogelova u vodi na 25 °C.

**Slika 6.2.** Krive bubrenja Ag/PNiPAAm (a) i Ag/P(NiPAAm/IK) (b) nanokompozita u vodi na 25 °C.

**Slika 6.3.** Zavisnost  $\ln(SD/SD_{eq})$  od  $\ln t$  za PNiPAAm (a) i P(NiPAAm/IK) (b) hidrogelove pri bubrenju u vodi na 25 °C.

**Slika 6.4.** Krive Etter modela pri bubrenju homopolimernih nanokompozita (a) i kopolimernih hidrogelova (b), u vodi na 25 °C.

**Slika 6.5.** Krive bubrenja u vodi na 37 °C za P(NiPAAm/IK) hidrogelove (a) i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozite (b).

**Slika 6.6.** Krive bubrenja u rastvoru SBF-a na 37 °C za P(NiPAAm/IK) hidrogelove (a) i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozite (b).

**Slika 6.7.** Ravnotežni stepen bubrenja P(NiPAAm/IK) hidrogelova (a) i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita (b) na različitim temperaturama.

**Slika 6.8.** Krive kontrakcije za P(NiPAAm/IK) hidrogelove (a) i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozite (b).

**Slika 6.9.** Zavisnost ravnotežnog stepena bubrenja od pH-vrednosti okolnog medijuma za P(NiPAAm/IK) hidrogelove (a,c) i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozite (b,d).

**Slika 7.1.** SEM mikrografije PNiPAAm hidrogelova: 5 mas.% (a), 10 mas.% (b) i 15 mas.% (c).

**Slika 7.2.** SEM mikrografije 10 mas.% PNiPAAm hidrogela (a), i nanokompozita na bazi 10 mas.% PNiPAAm-a sa 5mM (b), 10mM (c) i 50 mM AgNO<sub>3</sub> (d).

**Slika 7.3.** SEM mikrografije P(NiPAAm/IK) hidrogelova: 100/0,0 (a), 98,5/1,5 (b), 97,0/3,0 (c) i 95,5/4,5 (d).

**Slika 7.4.** Uticaj koncentracije polimerne matrice na morfologiju PNiPAAm-a: 5 mas.% (a), 10 mas.% (b) i 15 mas.% (c).

**Slika 7.5.** Uticaj udela IK na morfologiju kopolimernih matrica: P(NiPAAm/IK): 98,5/1,5 (a) i 95,5/4,5 (b).

**Slika 7.6.** Reprezentativni primeri 3D rekonstrukcije 10 mas.% PNiPAAm-a dobijene mikro kompjuterizovanom topografijom ( $\mu$ -CT).

**Slika 7.7.** FTIR spektri nanokompozita: Ag/PNiPAAm (a) i Ag/P(NiPAAm/IK) (b).

**Slika 7.8.** XPS spektri za Ag3d (a), O1s (b) i N1s (c) u Ag/PNiPAAm nanokompozitima (5 mas.% PNiPAAm sa 5 mM AgNO<sub>3</sub>).

**Slika 7.9.** XPS spektri za Ag3d (a), O1s (b) i N1s (c) u Ag/PNiPAAm nanokompozitima (15 mas.% PNiPAAm sa 50 mM AgNO<sub>3</sub>).

**Slika 7.10.** Difraktogrami Ag/PNiPAAm i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita.

**Slika 7.11.** Vrednosti površinskog napona i deformacije za nanokompozitne uzorke homopolimera (a i b) i kopolimera (c i d).

**Slika 7.12.** Gustina dislokacija za nanokompozitne uzorke homopolimera (a) i kopolimera (b).

**Slika 7.13.** TEM mikrografija i raspodela veličine nanočestica srebra u 10 mM AgNO<sub>3</sub>/10 mas.% PNiPAAm nanokompozitu.

**Slika 7.14.** SEM mikrografija Ag(10mM)/10 mas.%PNiPAAM nanokompozita (a) i histogram raspodele veličine inkorporiranih nanočestica srebra (b).

**Slika 8.1.** Zavisnost napon-deformacija za PNiPAAM hidrogelove (a) i Ag/PNiPAAM nanokompozite (b).

**Slika 8.2.** . Uticaj udela IK (a) i prisustva nanočestica (b) na zavisnost napon-deformacija.

**Slika 8.3.** Zavisnost modula  $G'$  (a),  $G''$  (b) i  $tg\delta$  (c) od ugaone brzine za P(NiPAAM/IK) hidrogelove.

**Slika 9.1.** Matematičko modelovanje oslobađanja  $Ag^+$ -jona iz Ag/P(NiPAAM/IK) nanokompozita: kumulativno oslobođeni  $Ag^+$ -joni (a) i određivanje koeficijenta difuzije jona srebra po modelu Korsmeyer-Peppas (b).

**Slika 9.2.** Matematičko modelovanje oslobađanja  $Ag^+$ -jona iz Ag/P(NiPAAM/IK) nanokompozita: Higuchi (a), Hixson-Crowel (b), Kopcha (c) i Makoid-Banakar (d).

**Slika 9.3.** Antibakterijska aktivnost Ag/P(NiPAAM/IK) nanokompozita.

**Slika 9.4.** Procenat preživelih bakterija *S. aureus* i *E. coli* nakon kontakta sa uzorcima hidrogela i nanokompozita (●-kontrola, ●-hidrogel, ●-Ag/hidrogel, dok je sa C označena koncentracija ispitivanih bakterija)

**Slika 9.5.** Procenat preživelih HaCaT ćelija pri kontaktu sa uzorcima hidrogelova i nanokompozita.

**Slika P-1.** Krive bubrenja Ag-PNiPAAM nanokompozita u vodi na 25 °C.

**Slika P-2.** Krive bubrenja P(NiPAAM/IK) hidrogelova u puferima različitih pH-vrednosti na 25 °C.

**Slika P-3.** Krive bubrenja P(NiPAAM/IK) hidrogelova u puferima različitih pH-vrednosti na 37 °C.

**Slika P-4.** Krive bubrenja Ag/P(NiPAAM/IK) nanokompozita u puferima različitih pH-vrednosti na 25 °C.

**Slika P-5.** Krive bubrenja Ag/P(NiPAAM/IK) nanokompozita u puferima različitih pH-vrednosti na 37 °C.

**Slika P-6.** Zavisnost  $\ln(SD/SD_{eq})$  od  $\ln t$  za Ag/P(NiPAAM) nanokompozite.

**Slika P-7.** Krive dobijene modelovanjem procesa bubrenja Ag/PNiPAAM nanokompozita u vodi na 25 °C, primenom *Early-time modela*.

**Slika P-8.** Krive dobijene modelovanjem procesa bubrenja P(NiPAAM/IK) hidrogelova i Ag/P(NiPAAM/IK) nanokompozita u vodi na 25 °C, primenom *Early-time modela*.

**Slika P-9.** Krive dobijene modelovanjem procesa bubrenja Ag/PNiPAAM nanokompozita u vodi na 25 °C, primenom *Late-time modela*.



**Slika P-10.** Krive dobijene modelovanjem procesa bubrenja P(NiPAAm/IK) hidrogelova i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita u vodi na 25 °C, primenom *Late-time modela*.

**Slika P-11.** Krive dobijene modelovanjem procesa bubrenja Ag/PNiPAAm i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita u vodi na 25 °C primenom *Etter modela*.

## **II Spisak tabela**

**Tabela 2.1.** Oblasti primene srebra u medicini.

**Tabela 3.1.** Reagensi za pripremanje SBF rastvora (pH=7,40).

**Tabela 3.2.** Koncentracije srebro nitrata i apsorbirane doze potrebne za redukciju Ag<sup>+</sup>-jona.

**Tabela 4.1.** Udeo gel faze u polimernim matricama.

**Tabela 4.2.** Sadržaj itakonske kiseline u P(NiPAAm/IK) hidrogelovima određen elementarnom analizom.

**Tabela 5.1.** Vrednosti parametara izračunatih iz apsorpcionih spektara.

**Tabela 6.1.** Kinetički parametri bubrenja PNiPAAm hidrogelova i Ag/PNiPAAm nanokompozita u vodi na 25 °C.

**Tabela 6.2.** Kinetički parametri bubrenja P(NiPAAm/IK) hidrogelova i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita u vodi na 25 °C.

**Tabela 6.3.** Vrednosti konstante brzine kontrakcije za P(NiPAAm/IK) hidrogelove i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozite.

**Tabela 7.1.** Vrednosti strukturnih parametara mreže za homopolimerne (PNiPAAm) i kopolimerne (P(NiPAAm/IK)) hidrogelove u vodi na 25 °C.

**Tabela 7.2.** Vrednosti strukturnih parametara mreže za kopolimerne P(NiPAAm/IK) hidrogelove u vodi na 37 °C.

**Tabela 7.3.** Vrednosti parametara dobijenih mikro-kompjuterizovanom topografijom.

**Tabela 7.4.** Vrednosti parametara dobijenih XRD analizom.

**Tabela 8.1.** Karakteristični parametri dobijeni mehaničkom analizom u statičkom režimu.

**Tabela 8.2.** Karakteristični parametri izračunati iz dinamičko-mehaničke analize.

**Tabela 9.1.** Kumulativno *in vitro* oslobađanje Ag<sup>+</sup>-jona iz Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita.

**Tabela 9.2.** Rezultati modelovanja oslobađanja Ag<sup>+</sup>-jona.

# *Poglavlje I*

*Uvod*

*Teorijski deo*

## 1. Uvod

Tehnološke potrebe za novim materijalima poslednjih godina dovele su do kreativnih pristupa sintezi i generisanju struktura, svojstava i funkcija u oblasti nanokompozitnih sistema na bazi polimernih hidrogelova i nanočestica metala. Nanočestice predstavljaju posebno važnu klasu nanomaterijala zahvaljujući specifičnim fizičko-hemijskim svojstvima koja poseduju, a koja se znatno razlikuju od makroskopske faze metala. Karakteristična svojstva nanočestica, kao što su optička, magnetna, katalitička, električna, mehanička i biohemijska, uslovlila su veliko interesovanje istraživača za oblast nanočestica. Ove karakteristike omogućavaju izuzetno široku primenu u optici, katalizi, mehanici, mikroelektronici itd. Jedna od najvažnijih i u pogledu primene najinteresantnijih karakteristika nanočestica srebra jeste da sprečavaju rast i razvoj jednoćelijskih organizama i samim tim ispoljavaju značajna antimikrobna svojstva, pa se mogu koristiti kao agens protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, gljiva ili virusa. To je uslovlilo ekspanziju istraživanja u cilju primene u medicini i farmaciji. Naime, široka primena antibiotika, čak i onih novijih generacija, dovela je do pojave rezistentnih sojeva bakterija i virusa što smanjuje uspešnost saniranja infekcija. Zahvaljujući antimikrobnim svojstvima, nanočestice kao što su cink-oksidi (ZnO), titan-dioksid (TiO<sub>2</sub>), zlato (Au) i srebro (Ag) su postale dobra alternativa tradicionalnim antibioticima. Nanočestice srebra pokazale su se kao vrlo korisno terapijsko sredstvo za prevenciju rasta mikroorganizama i razvoj infekcija, pa su razvijeni nanokompozitni sistemi sa srebrom za upotrebu u medicini. Međutim, upotreba obloga za rane sa srebrom je suočena sa značajnim izazovima kao što su nedostatak efikasnosti, njihova isplativost ili pitanje sigurnosti tj. toksičnosti. Stoga, razvoj i optimizacija obloga koje dostavljaju antimikrobno srebro kao terapijski agens, u okviru netoksičnih terapijskih doza u koncentracijama od 0,78-12,5 ppm, može značajno da poveća efikasnost primene.

S obzirom da svojstva nanočestica zavise od njihove veličine, oblika i okruženja u kome se nalaze, od ključne je važnosti obezbediti odgovarajuće hemijske i geometrijske karakteristike čestica koje će biti konstantne tokom primene. Polimerni hidrogelovi pokazali su se kao pogodni nosači kako za formiranje, rast i stabilizaciju nanočestica, tako i za kontrolisano otpuštanje srebra kao aktivne supstance u uslovima potencijalne primene (medicini, farmaciji, bioinženjerstvu tkiva, itd.).

Zahvaljujući poroznoj strukturi, hidrogelovi imaju sposobnost upijanja i zadržavanja bioloških fluida unutar umrežene polimerne matrice pri čemu se pore ponašaju kao nanoreaktori u kojima se odigrava nukleacija i rast nanočestica srebra. Podešavanjem uslova sinteze hidrogelova dobijaju se matrice različitih svojstava čime se utiče na morfologiju, veličinu i raspodelu veličina inkorporiranih nanočestica.

S druge strane, za pojedine primene ili specifična mesta dostave aktivnih supstanci, poželjno je da hidrogelovi budu osetljivi na spoljne stimulanse. Ono što ovu klasu gelova čini unikatnim je njihova sposobnost da promenom svojih fizičkih i hemijskih svojstava odreaguju na promenu fizioloških uslova sredine u kojoj se primenjuju (pH-vrednost, temperatura, jonska jačina, promena koncentracije biološki aktivnih supstanci, itd.). Najčešće korišćeni, a samim tim i najinteresantniji, su pH- i temperaturno-osetljivi hidrogelovi, jer su pH-vrednost i temperatura dva parametra koja se najčešće menjaju u fiziološkim sistemima. Poli(*N*-izopropilakrilamid) (PNiPAAm) hidrogel je pogodan za upotrebu u biološkim sistemima pošto nije toksičan za tkiva, a termoosetljiv je u opsegu fiziološki relevantnih temperatura. Uvođenjem jonizujućih grupa u hidrogelove na bazi PNiPAAm-a dobijaju se kopolimeri koji, pored temperaturne, poseduju i pH osetljivost, što daje veliku mogućnost podešavanja i kontrole bubrenja, odnosno upijanja i otpuštanja aktivnih supstanci. Kao pH osetljiva komponenta u ovom radu odabrana je itakonska kiselina (IK) koja ima dve karboksilne grupe, čime se povećava opseg pH-vrednosti u kojima se kopolimer može primenjivati. Variranjem odnosa

komonomera, NiPAAm-a i IK, mogu se kontrolisati morfologija i strukturne karakteristike nosača, čime se utiče i na morfologiju, veličinu, raspodelu veličina nanočestica srebra, a samim tim i na mogućnost kontrolisanog otpuštanja srebra.

U dosadašnjim istraživanjima razvijeno je više metoda za sintezu Ag/hidrogel nanokompozita. Međutim, da bi mogli da se primenjuju u medicini i farmaciji, agensi koji se koriste za sintezu hidrogelova i nanočestica ne bi trebalo da budu biološki štetni. Imajući u vidu da se principi sinteze radijaciono-hemijskom metodom pod dejstvom gama zračenja zasnivaju na biološki neškodljivim i biokompatibilnim radiolitičkim proizvodima vode, to se ova metoda nameće kao metoda izbora jer kombinuje prednosti radiolitičke metode, reagenasa neškodljivih po okolinu uz istovremenu stabilizaciju čestica u polimernoj matrici. Pored toga, to je jednostavan i brz način sinteze čije je izvođenje lako kontrolisati, a kao jednu od najznačajnijih prednosti treba izdvojiti mogućnost sinteze i sterilizacije proizvoda u jednom tehnološkom koraku, što je izuzetno važno za primenu u biomedicinskim tehnologijama.

S obzirom da sintetisani Ag/hidrogel nanokompoziti imaju izuzetno veliki aplikativni potencijal u medicini i farmaciji, kao i da se radijaciono-tehnološki postupak sinteze primenom gama zračenja može svrstati u specifični postupak nanoinženjeringa materijala, predmet rada ove disertacije pripada veoma aktuelnoj oblasti nanonauka i nanotehnologija.

## 1.1. Cilj rada

Cilj ove doktorske disertacije je sinteza i karakterizacija novih termo- i pH-osetljivih antibakterijskih srebro/poli(*N*-izopropilakrilamid-*ko*-itakonska kiselina), (Ag/P(NiPAAm/IK)) hidrogel nanokompozita. Zbog brojnih prednosti koje nudi, kao metoda sinteze izabrana je radijaciono-hemijska metoda upotrebom gama zračenja. S obzirom da ova metoda nije do sada korišćena za sintezu pomenutih sistema, značajan deo istraživanja je posvećen

razvoju i optimizaciji same metode sinteze u cilju poboljšanja karakteristika dobijenih sistema. Imajući u vidu da su u ovom radu izabrani *N*-izopropilakrilamid i itakonska kiselina kao termo- i pH-osetljive komonomerne komponente, koje mogu imati značajan uticaj na svojstva nanočestica, istraživanja su obuhvatila detaljnu fizičko-hemijsku i mehaničku karakterizaciju polimerne matrice. Analiza dobijenih rezultata pružila je informacije o međusobnom uticaju ove dve komponente, kao i sinergetskom dejstvu koje imaju na svojstva Ag/hidrogel nanokompozita, što omogućava podešavanje svojstava polimerne matrice za dobijanje nanokompozita željenih karakteristika. Takođe, posebna pažnja je posvećena ispitivanju uticaja prisustva nanočestica srebra u polimernoj matrici na osnovne karakteristike materijala koje se mogu fino podešavati promenom koncentracije, veličine i raspodele nanočestica unutar polimerne mreže. Eksperimentalna ispitivanja kinetike otpuštanja jona srebra u fiziološkim uslovima i primena farmakokinetičkih modela omogućili su razvoj i optimizaciju sintetisanih sistema u cilju dobijanja materijala za primenu u tretmanima zarastanja rana (npr. u dijabetologiji) koji su efikasni antibakterijski agensi ispod granice toksičnosti. Shodno tome, antibakterijska svojstva su ispitana na Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama, a citotoksičnost na keratinocitnim ćelijama kože.

## 2. Teorijski deo

### 2.1. Kompozitni materijali

Kompozitni materijali su materijali koji se sastoje od dva ili više različitih materijala koji su različiti po hemijskom sastavu, a međusobno ne reaguju i ne mešaju se. Na taj način dobijaju se materijali sa svojstvima koja se umnogome razlikuju od svojstava pojedinačnih komponenti. Upravo je to razlog zbog koga su kompozitni materijali boljih karakteristika od materijala korišćenih za njihovo dobijanje (Hull D. i sar. 1996). Osnovna faza kompozita je matrica koja okružuje i drži fragmente mnogo jačeg materijala koji se naziva punilac. Kao matrica se koriste metalni, keramički i polimerni materijali, dok punioci mogu biti čestice ili vlakna (ugljenična, keramička, staklena, aramidna i oksidna). Veliki broj materijala koji stoji na raspolaganju kao moguća kombinacija u izradi kompozita doveo je do porasta interesovanja za razvoj specifičnih proizvoda koji će omogućiti poboljšanje performansi materijala uz istovremeno smanjenje troškova, što je za potrošača jedan od najvažnijih ciljeva. Kompozitni materijali se danas u velikoj meri primenjuju u svakodnevnom životu i različitim granama industrije. Zahvaljujući svojim specifičnim karakteristikama potpuno je opravdano očekivati još brži razvoj i primenu ovih materijala jer se njihovom proizvodnjom i pažljivim odabirom sastavnih komponenti mogu dobiti materijali koji su lakši, jači, kvalitetniji i čistiji (Hull D. i sar. 1996; Ajayan P. i sar. 2004; Džunuzović E. doktorska disertacija, 2010; Kickelbick G. i sar. 2003).

#### 2.1.1. Nanokompozitni materijali

Početak devedesetih godina prošlog veka postignut je maksimum u razvoju kompozita i javila se potreba za novim materijalima koji će biti u stanju da isprate sve veće zahteve tržišta i industrije. Pomak je napravljen ubacivanjem punila u vidu čestica nanometarskih dimenzija. Tako je stvorena

nova klasa materijala, nanokompozitni materijali, koji u osnovnoj matrici sadrže dispergovane čestice reda veličine od 1 do 100 nm. U zavisnosti od vrste komponenata koje se koriste razlikuju se nanokompoziti tipa organsko/organski, organsko/neorganski i neorgansko/neorganski. Iako su nanopunioci prisutni u malom masenom procentu sveukupne mase materijala, zahvaljujući velikoj specifičnoj površini koju poseduju, kao i mogućnosti finog dispergovanja unutar matrice, doprinose pojavi novih i značajnom poboljšanju postojećih svojstava kao što su mehanička, optička, toplotna, električna, magnetna itd.. Nanokompozitni materijali su predmet velikog broja istraživanja u nauci o polimerima, pa su samim tim i mogućnosti primene mnogobrojne. Koriste se u građevinskoj, mašinskoj, avio i auto industriji, elektronici, optici, različitim oblastima hemijske industrije, kao i u farmaciji, medicini i bioinženjeringu (Ajayan P. i sar. 2004; Džunuzović E. doktorska disertacija, 2010).

### 2.1.2. Polimerni nanokompoziti

Polimerni nanokompozitni materijali sve više postaju materijali koji se koriste kao zamena za tradicionalne materijale u različitim granama industrije. To su višefazni sistemi u kojima se u matrici polimernog tipa nalaze pravilno dispergovani nanopunioci. Svojstva polimernih nanokompozita zavise od vrste polimerne matrice, oblika, veličine i koncentracije nanočestica, kao i od interakcija između matrice i nanočestica. Pri izboru konstituenata ima se u vidu krajnja primena materijala, pri čemu se komponente biraju tako da deluju sinergistički, što je uslov da se dobije novi materijal poboljšanih svojstava uz istovremeno eliminisanje nedostataka. Tako ovi materijali imaju sposobnost zadržavanja karakteristika nanočestica (optička, električna, magnetna) i svojstva matrica (mehanička, hemijska). Kao matrice koriste se različiti polimerni materijali, termoplastični, elastomerni, itd., dok se kao nanopunioci koriste nanočestice metala (Ag, Au, Cu, Pd, Pt), oksida ( $\text{TiO}_2$ , ZnO,  $\text{SiO}_2$ ) i drugi. Oblast koja privlači možda i najveću pažnju istraživača poslednjih godina je primena



polimernih nanokompozita u medicini i medicinskom bioinženjeringu. Kao polimerne matrice u ovim istraživanjima koriste se biokompatibilni polimerni materijali (npr. hidrogelovi), dok su od nanočestica posebno interesantne one koje poseduju antimikrobna svojstva (Džunuzović E. doktorska disertacija, 2010; Bhattacharya S.i sar. 2008; Schexnailder P. i Schmidt G. 2009).

## 2.2. Hidrogelovi

### 2.2.1. Pojam hidrogelova

Hidrogelovi su trodimenzionalne, hidrofilne polimerne mreže sposobne da upiju i zadrže velike količine vode ili neke druge biološke tečnosti, pri čemu njihova struktura ostaje nepromenjena. Prvu sintezu materijala ove vrste izveo je češki hemičar Otto Wichterle sa svojim saradnicima, pri čemu su sintetisani hidrogelovi poli(2-hidroksietil metakrilata) (PHEMA) (Wichterle O. i Lim D. 1960). Ovi hidrogelovi su korišćeni za izradu kontaktnih sočiva, i izazvali su veliko interesovanje istraživača jer su predstavljali novu, zanimljivu i nedovoljno istraženu klasu materijala. Usledila je ekspanzija istraživanja materijala tipa hidrogelova i samim tim njihova masovna upotreba kroz različite komercijalne proizvode. Najinteresantnije, a u pogledu primene svakako i najvažnije, jeste svojstvo hidrogelova da su nerastvorni i pored prisustva velike količine fluida unutar mreže (Hoffman A. 2012). Nerastvorljivost je posledica umreženja koje potiče od kovalentnih veza kod hemijski i od fizičkih veza kod fizički umreženih polimernih matrica. Na taj način dobija se porozna trodimenzionalna struktura, koja im omogućava bubrenje, ali ne i rastvaranje. Pogonska sila za proces bubrenja je sila osmotskog pritiska koja naizmenično izaziva istezanje (pri bubrenju) i skupljanje (pri kontrakciji) polimernih lanaca do postizanja ravnotežnog stanja koje odgovara maksimalnom stepenu bubrenja, odnosno kontrakcije (Ahmed E. 2015; Kopecek J. 2009). Hidrogelovi u procesu bubrenja mogu da upiju i do 95 mas.% fluida, kada po svojim svojstvima postaju sličniji živim tkivima više nego bilo koja

druga vrsta sintetskog materijala, zbog čega su interesantni za primenu u regenerativnoj medicini i bioinženjeringu (popunjavanje i zamena tkiva i organa, biološki lepkovi, matrice za rast ćelija) (Drury J. i Mooney D. 2003; Milašinović i sar. 2010a). Tome doprinosi porozna struktura nastala umrežavanjem, koja je dovoljno stabilna da materijal poseduje i zadržava potreban oblik i formu, a istovremeno omogućava difuziju proizvoda metabolizma. Na taj način hidrogelovi su postali značajna klasa biomaterijala (Ratner B. i Hoffman A. 1976).

### 2.2.2. Klasifikacija i metode dobijanja hidrogelova

U zavisnosti od kriterijuma koji se uzima u obzir hidrogelovi se klasifikuju na više načina. Osnovna podela je na osnovu porekla, na hidrogelove koji potiču od prirodnih ili sintetskih polimera, ali i od njihovih kombinacija. Najčešće korišćeni prirodni polimeri su celuloza, pektin, hitozan, alginat, kolagen i skrob. Sintetski polimeri se dobijaju reakcijama polimerizacije, pri čemu je veliki broj monomera koji se u tim reakcijama može koristiti. I prirodni i sintetski polimeri imaju i prednosti i mane. Prirodni polimeri se dobijaju iz obnovljivih izvora, biokompatibilni su i biodegradabilni. Međutim, njih obično odlikuju loša mehanička svojstva i mogućnost sadržaja patogena koji mogu izazvati imuno reakciju organizma. S druge strane, veliki broj mogućih kombinacija monomera pri sintezi sintetskih polimera daje mogućnost strogog kontrolisanja i modifikovanja strukture polimerne mreže kako bi se dobio materijal željenih svojstava. Ovo je veoma važno jer razumevanje strukture hidrogelova znači i razumevanje ponašanja materijala u različitim uslovima, što na kraju određuje mogućnost primene. Za primenu u medicini i farmaciji važno je ponašanje hidrogelova pod uticajem promena u spoljašnjoj sredini, pa se prema tome dele na konvencionalne hidrogelove koji ne pokazuju promene i hidrogelove osetljive na spoljne stimulanse koji pokazuju značajne promene svojstava kao odgovor na promene u spoljašnjoj sredini (Qiu Y. i Park K. 2001; Cong H. i sar. 2014). Na osnovu broja monomera/polimera koji ulaze u sastav

hidrogelova dele se na homopolimere, kopolimere i multipolimere. Takođe, prema prirodi bočnih grupa u polimernim lancima hidrogelove je moguće klasifikovati na neutralne i jonske, pri čemu jonski mogu biti anjonski, katjonski ili amfolitni. U zavisnosti od strukture mreže razlikuju se jednostavne, semi-interpenetrirajuće, interpenetrirajuće i hibridne polimerne mreže. Važna podela se može izvesti i na osnovu veličine pora, i to na neporozne (1-10 nm), mikroporozne (10-100 nm), makroporozne (0,1-1 µm) i superporozne (>1 µm) (Peppas N. i sar. 2000).

Kada se govori o metodama sinteze, postoje dva osnovna načina umrežavanje hidrogelova, fizički i hemijski. Fizički način umrežavanja podrazumeva formiranje fizičkih interakcija kao što su vodonične veze, jonske i hidrofobne interakcije, formiranjem kalemljenih blok kopolimera, kao i kristalizacijom i prepletajima polimernih lanaca. Hemijski način umrežavanja, s druge strane, podrazumeva formiranje hemijskih veza između polimernih lanaca, što ovim materijalima daje postojanost u strukturi. Osnovni tipovi reakcija kojima se mogu dobiti hemijski umrežene polimerne matrice su reakcije polikondenzacije i reakcije radikalne polimerizacije (Kalagasidis Krušić M. 2007). Najviše zastupljene su reakcije radikalne polimerizacije koje se obično odigravaju u vodenim rastvorima uz prisustvo hemijskih agenasa (inicijatori, inhibitori, umreživači). Imajući u vidu da neke od ovih supstanci, i to obično one koje su najefikasnije, mogu biti toksične, poslednjih godina se sve češće pribegava metodama radikalne polimerizacije korišćenjem izvora visoke energije (elektronski snop, ultrazvuk, gama zračenje, mikrotalasno polje) (Hennink W.E. i van Nostrum C.F. 2002; Gil E.S. i Hudson S.M. 2004). U ovom radu, za sintezu nanokompozitnih materijala korišćena je radijaciono-hemijska metoda pod dejstvom gama zračenja. Detaljniji prikaz delovanja gama zračenja na materiju, analiza samog procesa sinteze kao i prednosti koje ova metoda nudi biće objašnjeni u Poglavlju 2.4.

### 2.2.3. Osnovna svojstva i struktura hidrogelova

Osnovna svojstva hidrogelova određuju se pre svega odabirom monomera, udela komonomernih komponenti, kao i uslova i načina sinteze. Svojstva i karakteristike monomera utiču na hemijsku strukturu u pogledu vrste i broja bočnih veza, a samim tim i na ponašanje hidrogelova u različitim uslovima. Uzimajući u obzir potencijalnu primenu, komonomerne komponente se biraju tako da kranji proizvodi zadovolje sve buduće potrebe. Ukoliko se planira primena u medicini, komponente koje ulaze u sastav hidrogelova moraju biti biokompatibilne, ali isto tako i netoksične, dok je poželjno ali ne i neophodno da budu i biodegradabilne. Veliki je broj kako prirodnih tako i sintetskih monomera koji se u ove svrhe mogu koristiti, a njihovim pažljivim odabirom, podešavanjem njihovih odnosa i načinom izvođenja sinteze mogu se dobiti materijali željenih svojstava. Za primenu u biomedicini najčešće se koriste poli(vinil alkohol) (PVA), poli(*N*-vinil-2-pirolidon) (PVP), poli(*N*-izopropilakrilamid) (PNiPAAm). Kada je jedan od zahteva biodegradabilnost vrlo često se koriste kopolimeri mlečne i glikolne kiseline (PLGA), dok se u nekim slučajevima isto svojstvo može postići i uvođenjem različitih prirodnih polimera ili degradabilnih grupa kao što su estri, ortoestri, anhidridi, amidi ili urea u osnovni lanac. Još jedna interesantna grupa hidrogelova, koja je posebno važna za primenu u fiziološkim uslovima, jesu hidrogelovi koji poseduju pH- i temperaturnu-osetljivost. Monomeri koji se koriste za sintezu ovakvih sistema su monomeri na bazi akrilamida i njegovih derivata, kao i hidrofилni monomeri na bazi akrilne, metakrilne i itakonske kiseline (Milašinović N. doktorska disertacija, 2011).

Bubrenje hidrogelova je jedna od njihovih najvažnijih karakteristika, a predstavlja sposobnost upijanja velike količine vode ili fiziološke tečnosti, pri čemu se polimerna mreža ne rastvara (Hoffman A. 2012). Pogonska sila za proces bubrenja je sila osmotskog pritiska koja izaziva istezanje polimernih lanaca i širenje polimerne mreže, a sila koja joj se suprotstavlja je sila elastičnog pritiska koja teži da delove istegnutih makromolekula vrati u prvobitno stanje.

Kada se ove dve sile izjednače sistem se nalazi u stanju termodinamičke ravnoteže (Hoffman A. 2012; Kopecek J. 2009). Postoji više teorijskih modela kojima se opisuje fenomen bubrenja, i bez obzira na to kojim teorijskim modelom će se opisati, jasno je da je kapacitet bubrenja svojstvo koje će uticati na sve ostale parametre kao i na mogućnost primene (Flory P.J. i Rehner J. 1943; Adnađević B. i Jovanović J. 2008). Kapacitet bubrenja se opisuje stepenom bubrenja koji se definiše na sledeći način:

$$SD = \frac{(m_{ht} - m_k)}{m_k} \quad (2.1)$$

gde je  $m_{ht}$  masa hidrogela u nabubrelom stanju u trenutku  $t$ , a  $m_k$  masa kserogela.

Ravnotežni stepen bubrenja ( $SD_{eq}$ ) se takođe određuje prema jednačini (2.1), s tim što se umesto mase hidrogela u trenutku  $t$  uzima masa na kraju procesa bubrenja, tj. u ravnotežnom stanju ( $m_{hr}$ ).

Parametri koji utiču na stepen bubrenja su brojni: karakteristike polimerne mreže (poroznost, stepen umreženja, hidrofilnost i hidrofobnost, prisustvo jonskih grupa, fleksibilnost lanaca), karakteristike medijuma za bubrenje (jonska jačina, uticaj kontra jona), kao i uslovi u kojima se proces bubrenja izvodi (pH i temperatura).

Struktura polimerne mreže se definiše preko sledećih parametara: udeo polimera u nabubrelom stanju ( $v_{2s}$ ), udeo polimera nakon sinteze ( $v_{2r}$ ), parametar interakcije polimer-rastvarač ( $\chi$ ), molarna masa između dve tačke umreženja ( $M_c$ ), efektivna gustina umreženja ( $\rho_c$ ) i veličina pora ( $\xi$ ). Vrednosti za  $v_{2r}$ ,  $v_{2s}$  i  $\chi$  se mogu dobiti korišćenjem sledećih jednačina (Caykara T. i sar. 2004a; Caykara T. i sar. 2006a; Kalagasidis Krušić M. i sar. 2009):

$$v_{2r} = \left[ 1 + \frac{(m_{hs} - 1)\rho_2}{\rho_1} \right]^{-1} \quad (2.2)$$

$$v_{2s} = \left[ 1 + \frac{(m_{hr} - 1)\rho_2}{\rho_1} \right]^{-1} \quad (2.3)$$

$$\chi = [\ln(1 - v_{2s}) + v_{2s}]/v_{2s}^2 \quad (2.4)$$

gde su  $m_{hs}$ ,  $m_k$  i  $m_{hr}$  mase hidrogelova nakon sinteze, nakon sušenja (kserogel) i u stanju ravnoteže, dok su  $\rho_2$  and  $\rho_1$  gustine polimerne matrice i medijuma u kome se odvija proces bubrenja, redom.

U slučaju nejonskih hidrogelova, u koje spadaju hidrogelovi na bazi poli(*N*-izopropilakrilamida), vrednost molarne mase između dve tačke umreženja se može odrediti pomoću sledeće jednačine (Peppas N. i sar. 2000; Milašinović i sar. 2010b):

$$M_c = - \frac{\left(1 - \frac{2}{\phi}\right) v_1 v_{2r}^{2/3} v_{2s}^{1/3}}{v [\ln(1 - v_{2s}) + v_{2s} + \chi v_{2s}^2]} \quad (2.5)$$

dok se u slučaju jonskih hidrogelova sa dve karboksilne grupe koje jonizuju koristi jednačina (Milašinović i sar. 2010b):

$$\left[ \frac{(2K_{a1}K_{a2} + 10^{-pH}K_{a1})}{2((10^{-pH})^2 + 10^{-pH}K_{a1} + K_{a1}K_{a2})} \right]^2 \left( \frac{V_1 v_{2s}^2 X^2}{4I^2 v^2} \right) \\ = \ln(1 - v_{2s}) + v_{2s} + \chi v_{2s}^2 + \frac{\left(1 - \frac{2}{\phi}\right) v_1 v_{2r}^{2/3} v_{2s}^{1/3}}{v M_c} \quad (2.6)$$

Parametri koji figurišu u ovim jednačinama su:  $\phi$ -funktionalnost umreživača (u slučaju gama zračenja  $\phi=4$ ) (Caykara T. 2004b),  $V_1$ -molarna zapremina medijuma za bubrenje,  $v$ -specifična zapremina polimera,  $K_{a1}$  i  $K_{a2}$  prva i druga konstanta jonizacije kiseline,  $X$ -maseni udeo jonske komponente i  $I$ -jonska jačina medijuma za bubrenje.

Veličina pora može se odrediti korišćenjem jednačine:

$$\xi = v_{2s}^{-1/3} l_{cc} \left( \frac{C_n 2M_c}{M_r} \right)^{1/2} \quad (2.7)$$

u kojoj  $C_n$  predstavlja karakterističan Florijev odnos ( $C_n, IA = 4,63$  i  $C_n, NiPAAm = 11,7$ ),  $l_{cc}$  je dužina C–C veze,  $M_r$  molarna masa ponavljajuće jedinice (Milašinović i sar. 2010a; Milašinović i sar. 2010b; Peppas N. i sar. 2000; Kalagasidis Krušić M. i sar. 2009) dok se stepen umreženja može dobiti iz sledeće relacije:

$$\rho_c = M_r / M_c \quad (2.8)$$

Pored strukturnih parametara polimerne matrice, za kompletnu karakterizaciju procesa bubrenja potrebno je odrediti i mehanizam transporta tečnosti u

polimernu matricu koji se dobija iz kinetike bubrenja. Proces bubrenja se može opisati primenom poluempirijske jednačine koja prati promenu mase hidrogela sa vremenom u toku procesa bubrenja (Liu Y. i sar. 2014; Khare A. i Peppas N. 1995)

$$\frac{SD}{SD_{eq}} = kt^n \quad (2.9)$$

gde je  $k$  kinetička konstanta hidrogela koja predstavlja konstantu brzine ovog modela, dok je  $n$  karakterističan eksponent koji opisuje mehanizam transporta fluida u polimernu matricu. Logaritamski oblik jednačine (2.9) daje pravolinijsku zavisnost u početnom stupnju bubrenja ( $SD/SD_{eq} \leq 0,6$ ) te se vrednosti  $k$  i  $n$  dobijaju iz odsečka i nagiba prave, redom. U zavisnosti od vrednosti eksponenta postoji više prihvaćenih modela difuzije: (i) Fick-ova difuzija ( $n \leq 0,5$ ) gde je dominantan proces relaksacije polimernih lanaca, (ii) ne-Fick-ova difuzija ( $0,5 < n < 1$ ) kada su uticaji difuzije i relaksacije polimernih lanaca izjednačeni i (iii) difuzija tipa II ( $n > 1$ ) kada je dominantan proces difuzije medijuma (Milosavljević i sar. 2011; Can H. i sar. 2005). Praćenjem kinetike bubrenja i polazeći od Fick-ovog zakona, moguće je odrediti koeficijent difuzije ( $D$ ), korišćenjem sledećih aproksimacija: aproksimacija modela u početnom periodu bubrenja ( $SD/SD_{eq} < 0,6$ ; (jed 2.10)), aproksimacija modela u završnoj fazi bubrenja ( $SD/SD_{eq} > 0,6$ ; (jed 2.11)) i Etter model koji opisuje proces bubrenja u celom intervalu ( $0 < SD/SD_{eq} < 1$ ; (jed 2.12)) (Mullarney M. i sar. 2006; Krstić J. i sar. 2014a):

$$\frac{SD}{SD_{eq}} = 4 \left( \frac{D_{Early}t}{\pi\delta^2} \right)^{1/2} \quad (2.10)$$

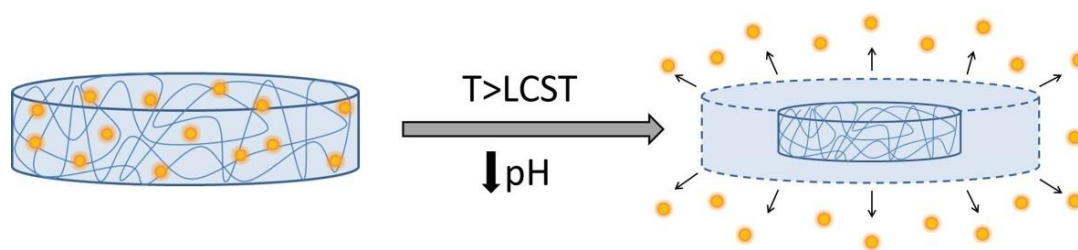
$$\frac{SD}{SD_{eq}} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \exp\left(-\frac{D_{Late}\pi^2t}{\delta^2}\right) \quad (2.11)$$

$$\frac{SD}{SD_{eq}} = 1 - \exp\left[-k \left(\frac{D_{Etter}t}{\delta^2}\right)^{a'}\right]^{1/b} \quad (2.12)$$

U navedenim jednačinama  $D_{Early}$ ,  $D_{Late}$  i  $D_{Etter}$  su koeficijenti difuzije procesa bubrenja u odgovarajućim modelima,  $\delta$  debljina kserogela, dok su  $a'$  i  $b$  parametri Etter modela.

#### 2.2.4. Hidrogelovi osetljivi na spoljašnje stimulanse

Poslednjih godina posebna pažnja se poklanja ispitivanju hidrogelova osetljivih na spoljašnje stimulanse. Spoljašnji uticaji se mogu podeliti na fizičke (temperatura, pritisak, zvuk, električno polje, magnetno polje, svetlost), hemijske (pH-vrednost, jonska jačina, prisustvo specifičnih molekula) i biološke (biomolekuli). Ono što ovu klasu hidrogelova čini jedinstvenim jeste njihova sposobnost da na promenu fizioloških uslova sredine u kojoj se nalaze odreaguju promenom nekog od svojih fizičko-hemijskih svojstava, zbog čega se nazivaju inteligentnim sistemima. Svojstva koja se najčešće menjaju su oblik, zapremina i mehanička svojstva (Qiu Y. i Park K. 2001; Kumar A. i sar. 2007). Sistemi koji su najinteresantniji, a samim tim i najčešće ispitivani su termo- i pH-osetljivi hidrogelovi, jer su temperatura i pH-vrednost dva parametra koja se u fiziološkim uslovima primene najviše menjaju (Slika 2.1), što je i razlog zbog čega su u ovom radu odabrane upravo termo- i pH-osetljive komonomerne komponente (Galaev I. i sar. 1999; Martins G. i sar. 2011). Ova klasa hidrogelova je posebno interesantna za primenu u sistemima za kontrolisano otpuštanje aktivnih supstanci, kao što je šematski prikazano na Slici 2.1.



**Slika 2.1.** Šematski prikaz oslobađanja nanočestica iz termo- i pH-osetljivih hidrogelova.

Temperaturna osetljivost hidrogelova je uslovljena postojanjem hidrofilnih i hidrofobnih segmenata u polimeru. Hidrogelovi koji su temperaturno osetljivi imaju kritičnu temperaturu rastvora (temperaturu faznog prelaza) i sposobnost da odreaguju promenom zapremine na promenu temperature okolnog



medijuma, na osnovu čega se dele na negativno ili pozitivno temperaturno osetljive i termoreverzibilne hidrogelove. Negativno temperaturno osetljivi hidrogelovi imaju donju kritičnu temperaturu rastvora (eng. *Lower Critical Solution Temperature* - LCST) ispod koje bubre, dok pri porastu temperature iznad LCST dolazi do njihove kontrakcije. Suprotno tome pozitivno temperaturno osetljivi hidrogelovi imaju gornju kritičnu temperaturu rastvora (eng. *Upper Critical Solution Temperature* - UCST) i pokazuju suprotno ponašanje (Xue W. i Hamley I.W. 2002; Cortes J. i sar. 2008). Termoreverzibilni hidrogelovi predstavljaju klasu termoosetljivih materijala za koje je karakteristična sol-gel promena faza u zavisnosti od toga da li poseduju gornju ili donju kritičnu temperaturu rastvora. Treba napomenuti da je više polimera koji imaju LCST, oni su više ispitani, a kao posebno interesantna grupa materijala se izdvajaju hidrogelovi čija je temperatura prelaza bliska temperaturi tela, što je osnov za biomedicinsku primenu. Neki od polimera koji se najčešće koriste su poli(*N*-izopropilakrilamid), poli(*N*-izopropilmetakrilamid), poli(*N,N*-dietilakrilamid), poli(vinil-izobutiroamid), poli(metil viniletar), hidroksipropil celuloza i drugi (Milašinović N. doktorska disertacija, 2011). U ovom radu korišćen je poli(*N*-izopropilakrilamid) koji ima LCST oko 32 °C, i pogodan je za upotrebu u biološkim sistemima pošto nije toksičan za tkiva, a termoosetljiv je u opsegu fiziološki relevantnih temperatura. Na temperaturama ispod LCST dominantan proces je apsorpcija vode usled formiranja vodoničnih veza između molekula vode i hidrofilnih delova polimernog lanca. Iznad LCST slabi uticaj vodoničnih veza, pri čemu preovlađuju interakcije između hidrofobnih segmenata polimernog lanca i dolazi do kontrakcije (Qiu Y. i Park K. 2001; Schild H.G. 1992; Pelton R. 2000). Na vrednost temperature faznog prelaza ovih sistema može se uticati promenom odnosa hidrofobnih i hidrofilnih segmenata lanca, tj. promenom sastava i odnosa komonomernih komponenti, dok se uvođenjem slabo kiselih ili baznih grupa u temperaturno osetljiv hidrogel postiže se i pH osetljivost. Sposobnost hidrogela da reaguje na promene i pH-vrednosti i temperature pruža veliku mogućnost kontrole svojstava hidrogelova (Zhang J. i

Peppas N.A. 2000; Milašinović N. doktorska disertacija, 2011). Prvi hidrogel na bazi *N*-izopropilakrilamida sintetisao je Chibante 1978. godine, nakon čega je obavljen veliki broj istraživanja i objavljen značajan broj radova (Pelton R. i Chibante P. 1986; Pelton R. 2000). Grupa turskih istraživača (Caykara T. i saradnici) bavila se sintezom i karakterizacijom hidrogelova na bazi *N*-izopropilakrilamida. Njihova istraživanja su pokazala da povećanje koncentracije monomera nema značajnog uticaja na vrednost LCST temperature, ali dovodi do smanjenja kapaciteta bubrenja. Inkorporacijom poli(etilen glikola) (PEG) u polimernu matricu dobijeni su makroporozni hidrogelovi manjeg stepena umreženja, a većeg kapaciteta bubrenja. Značajan uticaj na temperaturu faznog prelaza, kapacitet bubrenja i parametre mreže postignut je kopolimerizacijom sa monomerima hidrofilnog tipa (Caykara T. i sar. 2006a; Caykara T. i sar. 2004a; Turan E. i sar. 2007).

Hidrogelovi čije ponašanje zavisi od pH okruženja nazivaju se *pH*-osetljivi hidrogelovi. Uslov da hidrogelovi pokažu pH osetljivost jeste postojanje jonskih grupa u osnovnom ili bočnom lancu polimera. Vrste jonskih grupa određuju i kojoj grupi pH osetljivih materijala hidrogel pripada, pa se tako razlikuju anjonski (karboksilne, sulfonske grupe), katjonski (amino grupe) i amfolitni hidrogelovi. Kada pH osetljiv hidrogel dođe u kontakt sa medijumom određene pH-vrednosti i jonske jačine, bočne grupe jonizuju i dolazi do stvaranja određenih jonskih vrsta. Usled formiranja istoimenog naelektrisanja na pojedinim delovima lanca dolazi do pojave odbojnih elektrostatičkih sila, polimerna mreža se širi što dovodi do povećanja kapaciteta bubrenja (Brannon-Peppas L. i Peppas A. 1991; Cortes J. i sar. 2008). Anjonski i katjonski hidrogelovi pokazuju suprotno ponašanje, pa tako anjonski hidrogelovi bubre u baznoj, a katjonski u kiseljoj sredini. S obzirom da amfolitni hidrogelovi sadrže i anjonske i katjonske grupe, njihova pH osetljivost je uslovljena udelom ovih grupa. Kao pH osetljiva komponenta u radu je korišćena itakonska kiselina (IK), a razlozi za njen izbor kao komonomera su višestruki (Weiss-Malik R.A. i sar. 2004; Jones M.S. 1999). Itakonska kiselina je nezasićena dikarbonska organska

kiselina čije su konstante disocijacije  $pK_{a1}=3,85$  i  $pK_{a2}=5,44$  (Weast R.C. 1972). Prednost IK u odnosu na druge komponente koje bi se mogle primeniti, kao što su akrilna ili metakrilna kiselina, jeste postojanje dve karboksilne grupe, čime se širi opseg pH-vrednosti potencijalne primene hidrogelova u čiji sastav kao komponenta ulazi IK. Takođe, velika prednost je i u mogućnosti njenog dobijanja iz nepetrohemijskih izvora (Caykara T. i sar. 2004a; Ozkahraman B. i sar. 2011). Mogućnosti primene ove grupe hidrogelova su široko rasprostranjene i to najviše u medicini i farmaciji (Galaev I. i Mattison B. 1999), gde postoje procesi koji se moraju odvijati na tačno određenim pH-vrednostima. To je uslovalo primenu pH osetljivih hidrogelova kao nosača za kontrolisano otpušanje lekova i lekovitih supstanci, koje su zaštićene, tj. inkapsulirane unutar polimerne matrice, pri čemu proces otpuštanja kreće na tačno određenoj pH-vrednosti. Prva istraživanja o kombinaciji temperaturno- i pH-osetljive komponente objavili su Erbil i Uyanik ispitujući uticaj udela IK na kinetiku bubrenja i osnovne parametre mreže kopolimernih hidrogelova. Pokazano je da porast udela hidrofilne komponente dovodi do povećanja vrednosti  $SD_{eq}$  i  $M_c$ , smanjenja stepena umreženja, pri čemu se vrednost temperature faznog prelaza pomera ka višim vrednostima. Do istih zaključaka došao je i Ozkahraman sa svojim saradnicima, koji je takođe ispitivao karakteristike kopolimernih hidrogelova sa različitim udelima IK. Variranjem pH-vrednosti u procesu bubrenja hidrogelova, pokazano je da sa povećanjem pH-vrednosti dolazi do porasta ravnotežnog stepena bubrenja do pH=9, nakon čega dolazi do smanjenja vrednosti  $SD_{eq}$  (Erbil C. i sar. 2000; Ozkahraman B. i sar. 2011).

#### 2.2.5. Hidrogelovi kao nosači nanočestica srebra

Materijali koji su među prvima korišćeni kao nosači aktivnih agenasa bili su polimerni materijali. Samim tim, oni su i prvi dobili dozvolu za praktičnu primenu iz čega je proizašao veliki broj komercijalnih proizvoda. Veliki je broj polimera koji se mogu koristiti u ove svrhe, a koji će biti korišćen zavisi

prvenstveno od primene. Kao prirodni polimeri najčešće se koriste hitozan, karboksimetil celuloza i skrob, dok se od sintetskih polimera najviše primenjuju poli(akril amid) (PAA), poli(vinil alkohol) (PVA), poli(*N*-vinil-2-pirolidon) (PVP), poli(*N*-izopropilakrilamid) (PNiPAAm), poli(etilen glikol dimetakrilat) (PEGD) i poli(2-hidroksimetil metakrilat). Svaki od ovih polimera poseduje određena svojstva, ali ono što im je zajedničko jeste da su svi biokompatibilni i toksikološki bezbedni. Kao rezultat razvoja ove ideje, polimerni materijali se koriste kao nosači različitih terapijskih agenasa, između ostalih i nanočestica, čime se ujedno rešava jedan od osnovnih problema u praktičnoj primeni nanočestica, a to je pojava aglomeracije. U zavisnosti od hemijske strukture polimera, stabilizacija nanočestica se može ostvariti elektrostatičkim interakcijama kao i stvaranjem koordinativnih veza između nanočestica i određenih funkcionalnih grupa u polimernim lancima. U slučaju prirodnih polimera stabilizacija rasta nanočestica se obično odigrava preko amidnih i hidroksilnih grupa, pa tako postoji značajan broj istraživanja koji obuhvata inkorporaciju nanočestica Ag, Au i Cu u polimerne matrice ovog tipa. Pored prirodnih, i pojedini sintetski polimeri pokazuju zadovoljavajuću biokompatibilnost, što im omogućava da se ravnopravno sa prirodnim polimerima koriste kao nosači aktivnih supstanci u biomedicinskim ispitivanjima. Istraživanja koja obuhvataju stabilizaciju nanočestica sintetskim polimerima su brojna, o čemu svedoči značajan broj objavljenih radova (Vimala K. i sar. 2009; Karthikeyan B. i sar. 2005; Gaddy G.A. i sar. 2004; Krklješ A. i sar. 2007a; Jovanović Ž. i sar. 2012).

Kao jedna od grupa polimernih materijala koji su našli svoju primenu kao nosači nanočestica, posebno su se izdvojili hidrogelovi. Zahvaljujući trodimenzionalnoj umreženoj strukturi koju poseduju, hidrogelovi predstavljaju bolje matrice za inkorporaciju aktivnih supstanci u odnosu na konvencionalne nevodene i polimerne sisteme. Svojim specifičnim svojstvima ova grupa materijala nametnula se naročito u sistemima u kojima je potrebno obezbediti ciljanu dostavu terapijskog agensa, pa se tako hidrogelovi koriste

kao potkožni implantati i kao nosači aktivnih supstanci za različite vrste tkiva ili organa. Razlog tome je formirana polimerna mreža koja zadržava aktivni agens unutar matrice, pri čemu on ostaje zaštićen do trenutka primene, dok u isto vreme omogućava kontinualno otpuštanje u željenom vremenskom periodu i na željenom mestu. Kontinualno otpuštanje je najznačajnije dostignuće i poboljšanje do koga se došlo primenom umreženih polimera. Naime, proizvodi izgrađeni od polimera koji ne poseduju umreženu strukturu vezuju nanočestice na svojoj površini. Prilikom upotrebe dolazi do trenutnog otpuštanja, pa se često dešavalo da koncentracija srebra premašuje dozvoljene granice propisane EPA standardom (*eng. Environmental Protection Agency - EPA*) (<http://www3.epa.gov/>). Primera radi, prema EPA standardu dozvoljena količina srebra u vodi za piće iznosi 0,1 mg/ml. Ako se uzme u obzir da se svojstva polimerne mreže mogu vrlo lako podešavati (npr. uslovima sinteze ili kopolimerizacijom), pri čemu se varira veličina pora i stepen umreženja, to pruža mogućnost inkorporiranja molekula različitih svojstava (između ostalih i nanočestica metala). Za inkorporaciju nanočestica srebra u hidrogelove najvažnija je upravo njihova poroznost, jer se tečnošću ispunjene pore koje postoje u umreženoj matrici ponašaju kao nanoreaktori u kojima se odigravaju nukleacija i rast nanočestica (Krstić J. i sar. 2014b; Vimala K. i sar. 2009). Kontinualno otpuštanje srebra ( $\text{Ag}^+$ -jona) zavisi kako od karakteristika polimerne matrice, tako i od svojstava samih nanočestica srebra, njihove veličine, koncentracije i distribucije u polimernoj matrici. Podešavanjem uslova sinteze i kombinacijom odgovarajućih komonomernih komponenti, u zavisnosti od ciljne primene, dobijaju se matrice različitih stepena umreženja, stabilnosti i mehaničkih svojstava, (Murthy P.S.K. i sar. 2008), ali i postiže delovanje aktivne supstance u dužem vremenskom periodu pri čemu se ne prelazi granica toksičnosti. Mohan i saradnici su utvrdili da hidrogelovi predstavljaju pogodne nosače za sintezu nanočestica srebra, kao i da se kontrolom svojstava polimerne mreže (stepen umreženja i veličina pora) može uticati na morfologiju i veličinu samih nanočestica. Dobijene nanočestice srebra su imale oblik sfera čija veličina

opada sa porastom stepena umreženja, a sintetisani nanokompoziti su se pokazali kao efikasan baktericidni agens (Mohan Y.M. i sar. 2010). Zadovoljavajuću antibakterijsku aktivnost pokazali su i nanokompoziti semi-interpenetrirajućih (SEMI-IPM) hidrogelova poli(akril amida) i ugljenih hidrata sa nanočesticama srebra, koje su sintetisali i ispitali Vimala i saradnici. Prisustvo ugljenih hidrata u polimernoj mreži dovelo je do blagog povećanja kapaciteta bubrenja, a UV-Vis, XRD i TEM analizama potvrđeno je prisustvo sfernih nanočestica srebra površinski centrirane kubne (*fcc*) strukture i veličine u opsegu od 2 nm do 20 nm (Vimala K. i sar. 2009). Da su hidrogelovi pogodni nosači i stabilizatori nanočestica srebra pokazali su i Boonkaew i saradnici objavivši više radova u kojima su ispitivali nanokompozite hidrogelova i nanočestica srebra koji su korišćeni kao obloge za tretmane kožnih oboljenja. U svojim istraživanjima nanočestice srebra, prečnika manjeg od 30 nm, su sintetisali dejstvom zračenja visokih energija (UV i  $\gamma$ -zračenje), a dobijeni nanokompozitni sistemi su bili ispod granice toksičnosti za ćelije fibroblasta, uz istovremenu zadovoljavajuću antibakterijsku aktivnost (Boonkaew B. i sar. 2014a; Boonkaew B. i sar. 2014b).

#### 2.2.6. Mehanička svojstva hidrogelova kao nosača

Jedno od najvažnijih svojstava hidrogelova koje ih čini tako jedinstvenim jeste njihova biokompatibilnost, uslovljena velikim sadržajem vode ili biološkog fluida unutar polimerne matrice. Istovremeno veliki procenat vode znači i lošija mehanička svojstva, a samim tim i njihova primena postaje ograničena. Za primenu u farmaciji i medicini mehanička svojstva su veoma značajna, tako da je poboljšanjem mehaničkih svojstava moguće proširiti opseg primene hidrogelova. Naime, hidrogel koji se koristi kao nosač aktivne supstance mora imati stabilnu formu i strukturu koja tokom primene mora ostati nenarušena jer na taj način štiti agens do trenutka njegovog ispuštanja i delovanja. Na taj način je moguće diktirati profil, odnosno brzinu ispuštanja inkorporiranog agensa, čime se obezbeđuje željeni tok terapije. Takođe, mreža

mora ostati netaknuta i kada se hidrogelovi koriste kao obloge za zarastanje rana, jer se mora omogućiti njihova pravovremena i potpuna zamena novim materijalom sa novom količinom agensa. Balans između elastičnosti, mekoće i odsustva mehaničke iritacije po okolno tkivo je zahtev koji hidrogelovi moraju ispuniti kada se koriste za *in vivo* implantacije (Ahearne M. i sar. 2008; Rattanaruengsrikul V. i sar. 2009). Sve ovo pokazuje koliki značaj mehanička svojstva hidrogelova imaju za njihovu primenu. Mehanička svojstva hidrogelova se mogu kontrolisati promenom načina sinteze, sastava ili stepena umreženja. Uslovi pod kojima se izvodi reakcija polimerizacije, kao što su vreme i temperatura reakcije ili vrsta i količina rastvarača, značajno utiču na mehanička svojstva hidrogelova. Mehanička jačina hidrogela opada ukoliko se koristi velika količina rastvarača pri sintezi, jer se na taj način smanjuje stepen umreženja. U slučaju kopolimernih hidrogelova poboljšanje mehaničkih svojstava se postiže povećanjem udela komonomerne komponente koja poseduje bolja mehanička svojstva. Isti efekat se postiže i dodavanjem manje hidrofilne komponente jer se na taj način smanjuje stepen bubrenja, ili komponente koja može da gradi vodonične veze koje deluju kao dodatno umreženje (Baker B. i sar. 2010; Luo Y. i sar. 2009). Za hidrogelove je karakteristično da povećanje stepena umreženja poboljšava njihova mehanička svojstva, ali smanjuje stepen bubrenja, pa se kao posledica javlja slabija difuzija medijuma u polimernu mrežu. S obzirom na važnost difuzije u procesima otpuštanja aktivne supstance, potrebno je naći optimalno umreženje kako bi svi zahtevi bili zadovoljeni i omogućena planirana primena (Anseth K. i sar. 1996). Jedan od načina poboljšanja mehaničkih svojstava jeste uvođenje neorganskih punila u polimernu matricu i upravo takva vrsta materijala je ispitana u ovom radu. Za analizu mehaničkih svojstava hidrogelova primenjuju se različite metode koje se mogu podeliti u dve grupe, metode ispitivanja u statičkom modu i metode ispitivanja u dinamičkom modu. Ispitivanja u statičkom modu najčešće obuhvataju analizu ponašanja hidrogelova pri dejstvu sile istezanja i kompresije. Merenja se izvode na konstantnoj temperaturi, pri čemu se sila

povećava sa vremenom. Prati se promena deformacije uzorka, a kao rezultat se dobijaju standardne krive napon deformacija, iz kojih se mogu odrediti Jungov modul elastičnosti i modul kompresibilnosti. Vrednosti modula se određuju iz nagiba početnog linearnog dela krive u oblasti važenja Hukovog zakona (Jovanović S. i Jeremić K. 2007, TMF). Ispitivanje u dinamičkom modu (dinamičko-mehanička analiza) podrazumeva dejstvo sile na ispitivani materijal, pri čemu se sila menja po nekoj unapred zadatoj funkciji. (Meyvis T. i sar. 2002). Kao rezultat dobijaju se moduli sačuvane ( $G'$ ) i izgubljene energije ( $G''$ ), kao i faktor prigušenja ( $tg \delta$ ).

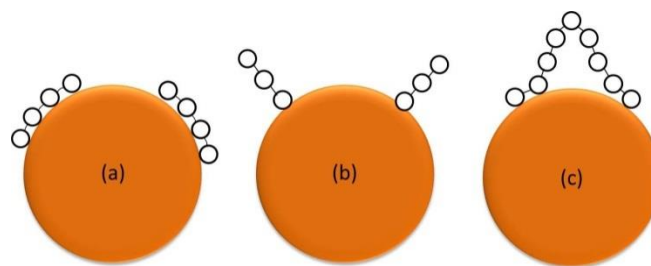
### 2.3. Nanočestice metala

#### 2.3.1. Pojam i osnovna svojstva nanočestica metala

Nanočestice metala predstavljaju posebno važnu klasu nanomaterijala zahvaljujući specifičnim fizičko-hemijskim svojstvima koja poseduju, a koja se znatno razlikuju od makroskopske faze metala. Karakteristika nanočestica jeste da im se dimenzije kreću u opsegu od 1 do 100 nm. Ispod 1 nm nanočestice su bliže svojstvima koja poseduju atomi i molekuli, dok se pri veličinama preko 100 nm približavaju svojstvima koja poseduju makroskopske strukture (Pomogailo A. i Kestelman V. 2005). Karakteristična svojstva nanočestica, kao što su optička, magnetna, katalitička, električna i mehanička (Sharma V. i sar. 2009), rezultat su velike specifične površinske energije koju poseduju, a koja je posledica odnosa specifične površine i zapremine. Zbog toga su značajna ispitivanja usmerena na različite vrste nanočestica: ugljenične nanotube, nanočestice metala (Au, Ag, Cu, Mg, Bi, Pt, Pd) i oksida metala ( $TiO_2$ , ZnO,  $Al_2O_3$ ). Usled velike hemijske stabilnosti, kao posebno značajna grupa izdvajaju se nanočestice plemenitih metala, a najčešće ispitivane su nanočestice srebra, zlata, platine i paladijuma. I pored brojnih pogodnosti uslovljenih postojanjem velikih vrednosti specifične energije, treba naglasiti i negativne strane ovog fenomena. Usled malih dimenzija nanočestica značajan deo atoma se nalazi na



njihovoj površini, pri čemu je taj broj veći što su dimenzije čestica manje. Ovi atomi se po svojstvima razlikuju od atoma u unutrašnjosti čestica, a kao posledica postojanja velikog broja površinskih atoma dolazi do povećanja površinske energije. Kako svaki sistem teži smanjenju energije u cilju prelaska u stabilnije stanje čestice teže da se kreću (Braunovo kretanje), pri čemu dolazi do njihovog spajanja u veće klastere (Heilmann A. 2003; Mason M.G. 1983; Lee S.T. i sar. 1981). To neminovno dovodi do gubitka nekog od specifičnih svojstava nanočestica. Imajući sve navedeno u vidu, može se reći da su nanočestice veoma reaktivne i nestabilne vrste, te da bi se njihova svojstva u potpunosti iskoristila, potrebno je obezbediti stabilnost nanočestica u uslovima primene. Kontrola rasta nanočestica se može postići na više načina. Kada se sinteza izvodi u rastvoru, veoma je bitan izbor i vrsta rastvarača, tako da na stabilnost nanočestica veliki uticaj može imati jonska jačina i viskoznost rastvora. U rastvorima niske jonske jačine dolazi do formiranja dvostrukog električnog sloja čime se zaustavlja aglomeracija, dok će čestice biti stabilnije u viskoznijim rastvorima zbog smanjene mogućnosti difuzije (Rele M. i sar. 2004). Ipak, u većini slučajeva u procesu sinteze nanočestica je neophodna upotreba stabilizatora. Kao stabilizatori mogu se koristiti površinski aktivne materije (surfaktanti), kao i molekuli polimera sa različitim funkcionalnim grupama. Na ovaj način se može uticati i na oblik nanočestica, zahvaljujući tome što različiti ligandi imaju afinitet prema različitim kristalografskim ravnima nanočestica. U ovoj disertaciji nanočestice srebra su sintetisane unutar prethodno formirane i definisane umrežene polimerne matrice (hidrogela). Upravo je postojanje molekula polimera u trenutku formiranja metalnih klastera odgovorno za njihovu stabilizaciju. Polimerni lanci se adsorbuju na površinu nanočestica, dolazi do zasićenja reaktivne površine uz istovremeno stvaranje sternih barijera koje sprečavaju dalji rast (Mohan Y.M. i sar. 2010; Krklješ A. doktorska disertacija, 2009; Sidorov S. i sar. 1999).



**Slika 2.2.** Vrste adsorpcije polimera na površinu metalnih nanočestica: horizontalna (a), vertikalna (b) i adsorpcija u obliku petlje (c).

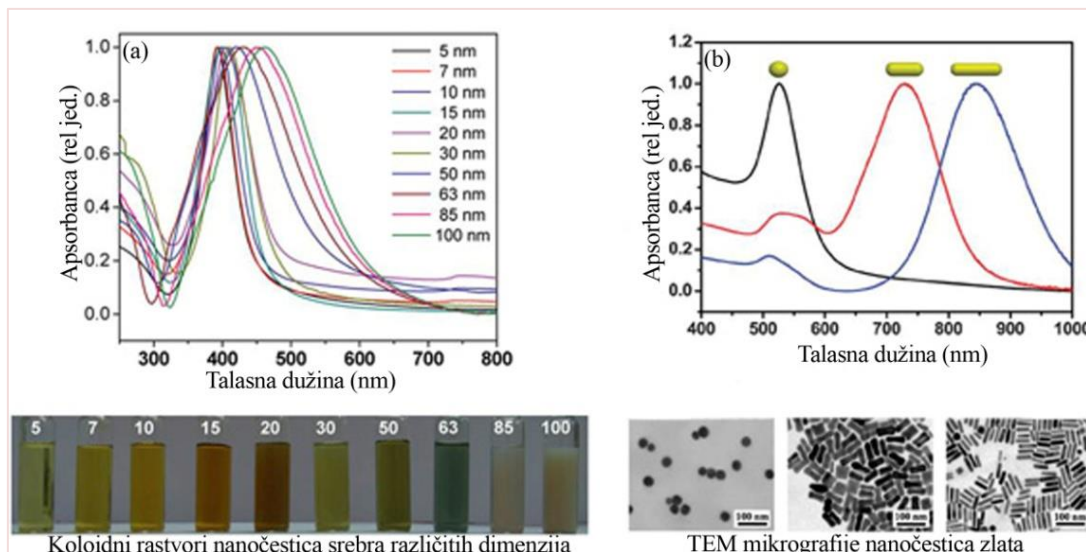
Adsorpcija polimernih lanaca na površinu nanočestica se može odigrati putem fizičke adsorpcije uspostavljanjem van der Waals-ovih sila, vodoničnih veza ili dipolnih interakcija, kao i procesom hemisorpcije formiranjem hemijskih veza. Na koji način će se stabilizacija izvesti zavisi od grupa koje se nalaze na polimernim lancima, kao i od vrste nanočestica koje se stabilišu. Segmenti polimernih lanaca se na površinu mogu adsorbovati u različitim položajima, pa se tako razlikuju horizontalni, vertikalni i položaj u obliku petlje, kao što je prikazano na Slici 2.2.

Specifična svojstva nanočestica uslovljena su, ne samo veličinom već i oblikom nanočestica. Oblik koji je najlakše dobiti je oblik koji je energetski najstabilniji, a to su sferne čestice. Nanočestice sfernog oblika se dobijaju u procesima sinteze gde se ne vrši kontrola rasta, već se one spontano organizuju u sfere. Dodatkom odgovarajućih površinski aktivnih materija kontroliše se rast nanoklastera, pa je metalne nanočestice moguće dobiti u velikom broju različitih oblika. Tako se kao posledica rasta kristala duž određenog pravca (preferentne ravni) mogu sintetisati nanočestice u obliku prizme, štapića, kocki, poliedra kao i nanočestice nedefinisanih geometrija (Barret C. i Massalski T., 1980). S obzirom da različiti oblici čestica iste zapremine imaju različitu specifičnu površinu, a samim tim i različitu vrednost slobodne površinske energije, može se reći da, pored veličine, oblik i strukturne karakteristike takođe imaju veliki uticaj na svojstva nanočestica (Slika 2.3) (Heilmann A. 2003; Banerjee S. i sar. 2014; Navaladian S. i sar. 2009).

Među najvažnijim svojstvima nanočestica koja su interesantna i važna za primenu, ali i za karakterizaciju, su optička svojstva. Nanočestice plemenitih metala ispoljavaju karakteristična optička svojstva u vidljivoj oblasti spektra. Ukoliko se radi o koloidnim disperzijama, ovo svojstvo je moguće i vizuelno detektovati jer dolazi do pojave intenzivnog obojenja. Svaka promena optičkih svojstava nanočestica metala, bilo da je uzrokovana promenom oblika ili promenom dimenzija dovodi do promene karakteristične površinske plazmonske apsorpcije (*surface plasmon resonance* - SPR). Pojava apsorpcione trake u vidljivoj oblasti spektra uslovljena je ponašanjem provodnih elektrona koji pri interakciji sa elektromagnetnim zračenjem podležu procesu koherentnog oscilovanja. Naime, kada je frekvencija upadnog zračenja u rezonanci sa koherentnim oscilovanjem elektrona, dolazi do jakog rasejanja i apsorpcije zračenja, pri čemu se u spektru zapaža intenzivna traka sa tačno definisanim položajem maksimuma (Karthikeyan B. i sar. 2005; Veenas C. i sar. 2009). Ove kolektivne oscilacije provodnih elektrona se još nazivaju i dipolne plazmonske rezonance čestica i karakteristične su za metalne čestice prečnika manjeg od talasne dužine upadne svetlosti. Broj, položaj i širina apsorpcionih traka zavise od veličine, geometrijskih karakteristika, dielektričnih konstanti sredine u kojoj su čestice dispergovane i okruženja nanočestica (Kelly K.L. i sar. 2003).

Fizičko objašnjenje apsorpcije zračenja metalnih nanočestica dao je Mie, proučavajući uticaj veličine i oblika nanočestica, kao i dielektrične konstante okruženja na optička svojstva nanočestica. Analiza se zasnivala na elektrodinamičkim proračunima serije multipolnih oscilacija za ekstinkcione koeficijente sfernih metalnih čestica u funkciji njihovog poluprečnika. Uslov primene Mie-vih proračuna je da je prečnik nanočestica ispod 20 nm, kao i da čestice međusobno ne intereaguju (Mie G. 1908). Ukoliko se radi o česticama većim od 20 nm dipolna aproksimacija se ne može primeniti, jer se u tom slučaju apsorpcioni spektar sastoji od apsorpcije i rasejanja. Takođe, Mie-va serija proračuna se ne može upotrebiti ni u slučaju čvrstih nanokompozita, jer

se usled smanjenja slobodnog prostora, međučestične interakcije ne mogu više zanemariti. To se manifestuje promenom položaja maksimuma, pri čemu dolazi do širenja apsorpcione trake i pomeranja položaja apsorpcionog maksimuma ka višim vrednostima (Krstić J. i sar. 2014b; Krklješ A. i sar. 2007a; Krklješ A. i sar. 2007b; Akamatsu K. i sar. 2000). Uticaj interakcija međusobno bliskih nanočestica u čvrstim nanokompozitnim sistemima ispitan je i objašnjen primenom Maxwell-Garnett-ove teorije, prema kojoj se nanokompoziti posmatraju kao homogen materijal u kome su inkorporirane nanočestice izolovane postojenjem dielektričnog sloja na svojoj površini (Maxwell Garnett J.C. 1904; Maxwell Garnett J.C. 1906; Krklješ A. doktorska disertacija, 2009). Ispitivanje uticaja različitih faktora na optička svojstva nanočestica metala, naročito srebra i zlata, predmet je velikog broja istraživanja, naročito poslednjih godina. Uticaj veličine nanočestica srebra na širinu apsorpcione trake i položaj maksimuma plazmonske apsorpcije ispitivao je Agnihotri S. sa saradnicima, pri čemu je pokazano da sa povećanjem veličine sfernih nanočestica srebra dolazi do širenja apsorpcionih traka uz istovremeno pomeranje maksimuma ka većim vrednostima talasnih dužina (Slika 2.3 (a)). S druge strane, uticaj oblika nanočestica na optička svojstva ispitivao je Hou H. sa saradnicima. U svojim istraživanjima sintetisali su nanočestice zlata sfernog i štapićastog oblika. Sferne nanočestice su pokazale karakterističan pik plazmonske apsorpcije za zlato na oko 520 nm, dok je u slučaju štapića maksimum plazmonske apsorpcije razdvojen na dve komponente, usled postojanja dve vrste oscilacija, transferzalnih i longitudinalnih. Takođe, pokazano je da sa porastom odnosa dužine i širine štapića dolazi do crvenog pomeraja na UV-Vis spektru, tj. vrednost maksimuma plazmanskog pika se nalazi na većim talasnim dužinama (Slika 2.3 (b)) (Agnihotri S. i sar. 2014; Hou H. i sar. 2015).



**Slika 2.3.** Apsorpcioni spektri sfernih Ag nanočestica različitih veličina (a) (preuzeto iz Agnihotri S. i sar. 2014) i Au nanočestica različitog oblika (b) (preuzeto iz Hou H. i sar. 2015; copyright©2015, Royal Society of Chemistry Hou H. i sar., Fine-tuning the LSPR response of gold nanorod polyaniline core-shell nanoparticles with high photothermal efficiency for cancer cell ablation, *J. Mater. Chem. B*).

Na osnovu pregleda mnogobrojnih istraživanja koja su se bavila ispitivanjem uticaja različitih faktora na optička svojstva nanočestica, može se zaključiti da se na oblik i veličinu nanočestica metala može uticati promenom uslova i načina sinteze: izborom vrste rastvarača, načina redukcije i vrste redukcionog sredstva i stabilizatora, kao i promenom parametara sinteze (pH-vrednost, temperatura, koncentracija početnih rastvora) (Mulvaney P. 1996; Yang S. i sar. 2007; Yu D. i Wing-Wah Yam V. 2005; Noguez C. 2007; Wiley B. i sar. 2007; Naghavi K. i sar. 2010).

### 2.3.2. Metode sinteze nanočestica metala

U dosadašnjim istraživanjima eksperimentalno je razvijen i teorijski objašnjen veliki broj metoda koje se koriste za sintezu nanočestica metala. Najviše zastupljen je hemijski metod sinteze nanočestica, pri čemu se kao prekursori koriste joni metala koji u reakciji sa određenim hemijskim

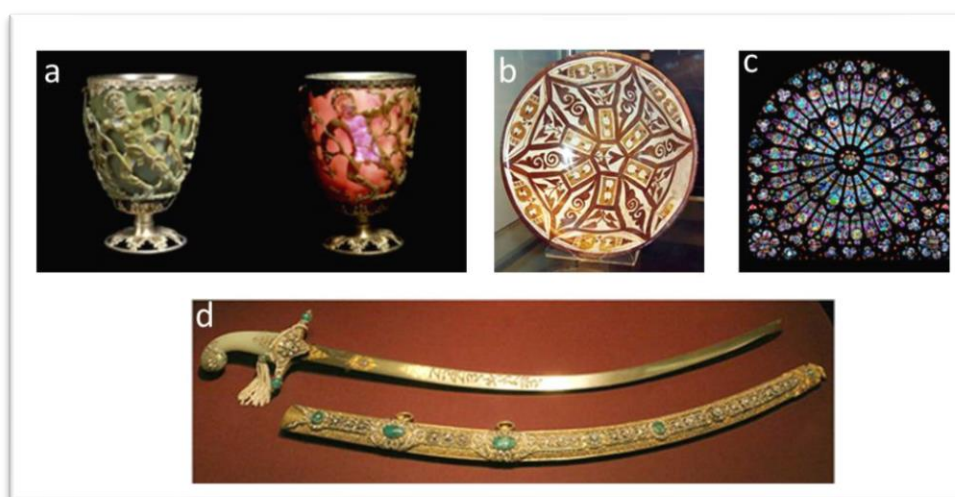
jedinjenjem (redukciono sredstvo) formiraju atome metala. Da bi reakcija bila termodinamički moguća, redoks potencijal redukcionog sredstva mora imati za 0,3-0,4 V negativniju vrednost od redoks potencijala srebra ( $E_{\text{Ag}^+/\text{Ag}^0} = +0,799 \text{ V}$ , za sistem Ag jon/Ag metal) (Vodnik V. doktorska disertacija, 2008). Atomi metala se dalje međusobno spajaju formirajući na taj način metalne klastere određenih oblika i dimenzija. Metoda hemijske redukcije se može odigrati u vodenim i nevodenim rastvorima, a kao redukciona sredstva najčešće se koriste natrijum-borhidrid ( $\text{NaBH}_4$ ), citrati, vodonik, hidrazin ili polisaharidi (Khanna P.K. i sar. 2005; Pillai Z. i Kamat P. 2004; Vimala K. i sar. 2009). Natrijum-borhidrid je jako redukciono sredstvo i omogućava dobijanje stabilnih nanočestica manjih dimenzija i uniformne raspodele. S druge strane citrati predstavljaju slabo redukciono sredstvo, pa se njihovom upotrebom obično dobija nešto šira raspodela veličina nanočestica. Ideja da se izbegne upotreba toksičnih hemijskih agenasa dovela je do upotrebe saharida kao redukcionih sredstava, pa je tako nanočestice moguće dobiti i ukoliko se kao redukciono sredstvo koriste glukoza, galaktoza, maltoza i laktoza (Panacek A. i sar. 2006). Takođe, nanočestice srebra se mogu dobiti i elektrohemijском sintezom pri čemu se redukcija jona srebra postiže korišćenjem električne struje. Prednosti ove metode u odnosu na hemijske su visoka čistoća nanočestica i bolja kontrola veličine što se postiže jednostavnim podešavanjem jačine struje koja se koristi pri sintezi (Jovanović Ž. i sar. 2012; Rodriguez Sanchez L. i sar. 2000). Pored ovih, značajno je pomenuti i mogućnosti sinteze nanočestica pri kojima se redukcija može izvesti mikrotalasima, ultrazvukom, fotohemijski, biohemijski i radijaciono-hemijski (Sharma V. i sar. 2009; Zhou Y. i sar. 1999). U ovom radu je korišćena radijaciono-hemijсka metoda gde je upotrebom gama zračenja izvedena redukcije jona srebra. Ukoliko se u cilju sprečavanja aglomeracije nanočestica koriste molekuli polimera, može se reći da postoje tri osnovna načina dobijanja nanokompozita na bazi nanočestica metala i polimerne matrice. Prvi slučaj se najčešće koristi kada nanočestice i polimerna matrica nisu kompatibilni i podrazumeva inkorporaciju prethodno sintetisanih nanočestica u

polimernu matricu. Pre inkorporacije, nanočestice se površinski modifikuju, ukoliko postoji potreba za promenom nekog njihovog svojstva, a u cilju povećanja kompatibilnosti sa matricom. Ovo je ujedno najzastupljeniji i najlakši način dobijanja nanokompozita. Drugi način koji je danas zastupljen jeste sinteza polimerne matrice u prisustvu nanočestica, koje u ovom slučaju predstavljaju nosioce inicijatora. Inicijator koji se imobilizuje na površinu nanočestica može biti hemijski agens ili radikali nastali iniciranjem pod dejstvom nekog izvora visoke energije. Najnovija istraživanja se baziraju na ispitivanju metoda *in situ* radiolitičke sinteze metalnih nanočestica unutar trodimenzionalne mreže hidrogelova. Polimerni molekuli se, hemijski ili radijaciono-hemijski, prevode u polimerne radikale koji imaju dovoljno veliku redukujuću moć da metal prevedu iz jonskog u atomsko stanje. Na taj način, polimeri proizvode vrste direktno odgovorne za nastanak metalnih nanočestica. Ovom metodom se uspešno sintetišu i bimetalne nanočestice tipa jezgro/omotač (Doty R. i sar. 2005; Kim D.J. i sar. 2005; Li D. i sar. 2007; Mallick K. i sar. 2007; Kumar M. i sar. 2005; Krklješ A. i sar. 2007b). Izbor metode sinteze zavisi od željenih svojstava nanočestica i planirane primene. U ovom radu korišćen je metod *in situ* inkorporacije nanočestica srebra u prethodno sintetisane umrežene polimerne matrice (hidrogelove) metodom gama zračenja.

### 2.3.3. Nanočestice metala kroz istoriju

Rani primeri nanostrukturnih materijala potiču još iz doba starog Rima i Egipta, iz radionica tadašnjih majstora koji su, koristeći zagrevanje, na visokim temperaturama uspevali da dobiju predmete neobičnih svojstava i izgleda. Primera je puno, a najpoznatiji je Likurgov pehar (Freestone I. i sar. 2007) iz rimskog doba, koji zahvaljujući nanočesticama srebra i zlata koje sadrži pokazuje različito obojenje u zavisnosti od položaja izvora svetlosti. Interesantni su i keramički predmeti iz 9. veka oslikani posebnom tehnikom (*eng. Lustreware ceramics*) koja je uključivala upotrebu nanočestica srebra i bakra pri čemu su dobijani predmeti zlatnog sjaja, a da pri tome nisu sadržali zlato.

Mnogobrojni vitraži u evropskim katedralama svoju lepotu duguju nanočesticama zlata i oksida drugih metala. Nanočestice su se koristile i u izradi oružja, pa je tako poznata takozvana „damask“ sablja čije sečivo sadrži ugljenične nanotube i nanožice cementita, koje su ovom materijalu obezbedile potrebnu jačinu, elastičnost i oštrinu ivica (Slika 2.4) (Reibold M. i sar. 2006; <http://www.nano.gov/timeline>).



**Slika 2.4.** Primeri upotrebe nanostrukturnih materijala: Likurgov pehar (a), Lustreware keramika (b), vitraž (c) i „damask“ sablja (d) (preuzeto sa <http://www.nano.gov/timeline>).

Sa razvojem nauke svi ovi fenomeni su razjašnjeni, i dok su se razvijali novi pravci u istraživanjima uporedo se razvijala jedna nova grana nauke. Majkl Faradej je 1875. godine otkrio da koloid zlata pod različitim uslovima osvetljavanja daje različito obojenje, i nazvao ga koloid Rubi (*eng. Ruby colloids*). Viktor La Mer i Robert Dinegar 1950. godine su razvili teoriju i proces za rast monodisperznih koloida predviđajući istovremeno industrijsku upotrebu ovih materijala. Razvijanje nanostrukturnih materijala pratilo je i istovremeno razvijanje mnogih uređaja bez kojih se danas ne može zamisliti karakterizacija nanočestica, pa su tako Binnig i Heinrich Rohrer, istraživači sa IBM-a (*eng. International Business Machines Corporation - IBM*) u Cirihi 1984. godine



konstruisali prvi skenirajući tunelski mikroskop (eng. *Scanning Tunneling Microscopy - STM*) i mikroskop atomskih sila (eng. *Atomic Force Microscopy - AFM*). Na taj način je došlo do razvoja jedne nove grane, kako u nauci, tako i u industriji – nanotehnologije. Nanotehnologija se danas smatra modernom tehnologijom ili tehnologijom budućnosti jer omogućava sintezu i razvoj novih materijala izvanrednih svojstava. Prema proceni američke agencije National Nanotechnology Initiative, u svetu je u 2005. godini u nanotehnologiju uloženo 9 milijardi dolara, a planira se da u periodu 2015-2016. ta ulaganja dosegnu 26 milijardi dolara. Osnovna interesovanja nanotehnologije su nanobiotehnologija, nanosistemi, nanoelektronika i nanostrukturni materijali, od kojih nanokompoziti zauzimaju značajno mesto (Thostenson E. i sar., 2005; <http://www.nano.gov>). 90-tih godina je zabeležen veliki broj novih kompanija koje su poslovale u polju nanotehnologija kao što su Nanophase Technologies (1989), Helix Energy Solutions Group (1990), Zyvex (1997), Nano-Tex (1998) i mnoge druge. U sledećoj dekadi se pojavio značajan broj komercijalnih proizvoda u čiji sastav ulaze nanočestice koje su dovele do poboljšanja svojstava poznatih materijala.

#### 2.3.4. Nanočestice srebra

Kao što je već pomenuto, mnogobrojna jedinjenja se mogu sintetisati u obliku nanočestica (od metala do oksida metala), pri čemu se nanočestice srebra izdvajaju kao najinteresantnija i najčešće sintetisana vrsta. Svojim specifičnim svojstvima kao što su katalitička, optička i posebno antimikrobna, nanočestice srebra svakako taj epitet i zaslužuju. Srebro je plemenit metal koga odlikuje izražena hemijska stabilnost. Do danas je razvijen veliki broj hemijskih procedura za dobijanje nanočestica srebra, uz istovremenu mogućnost variranja svojstava čestica u širokom opsegu. To pruža mogućnost primene u različitim granama industrije. Optička svojstva nanočestica srebra, tj. pojava plazmonske apsorpcije u vidljivom delu spektra, omogućava korišćenje nanočestica srebra za pojačavanje signala u optičkoj spektroskopiji (Stamplecoskie K.G. i sar. 2011).

Značajna je i primena u različitim dijagnostičkim procedurama gde nanočestice srebra imaju ulogu biosenzora (Ren X. i sar. 2005; Sharma V. i sar. 2009;), kao i u kompozitima kada je potrebno poboljšati termičku ili električnu provodljivost. U industriji se koriste kao katalizatori, dok se nanočestice srebra u obliku nanožica koriste u električnim uređajima kao elektrode i konektori (Long Y. i sar. 2011). Jedna od najvažnijih i u pogledu primene najinteresantnijih karakteristika nanočestica srebra jeste da sprečavaju rast i razvoj jednoćelijskih organizama i samim tim ispoljavaju značajna antimikrobna svojstva, pa se mogu koristiti kao agens protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, gljiva ili virusa (Morones J.R. i sar. 2005; Fauss E. 2008; US-EPA 2010).

#### 2.3.5. Antibakterijski potencijal srebra i primena u medicini

Još od drevnih vremena srebro se koristi kao sredstvo za sprečavanje razvoja infekcija. Poznata je upotreba srebra za čuvanje vode za piće, dok se u obliku praha koristilo za lečenje raznih bolesti, kao agens koji ubija bakterije tifusa, kao i za bržu koagulaciju, zarastanje i dezinfekciju rana u I svetskom ratu (Grier N. 1977; Richard J.W. i sar. 2002). Jedan nemački lekar je 1881. godine po prvi put primenio kapi srebra nitrata u koncentraciji od 0,1% za lečenje neonatalnog konjuktivitisa kod novorođenčadi (Rai M. i sar. 2009; Russell A. i Hugo W. 1994). Nakon otkrića penicilina i razvoja velikog broja antibiotika srebro je izgubilo na značaju. Međutim, uporedo sa razvojem novih antibiotika otkrivano je sve više novih mikroorganizama. Problem je nastao kada su zbog dugotrajne ili neadekvatne primene antibiotika određeni mikroorganizmi počeli da pokazuju rezistentnost na neke vrste antibiotika. Javila se potreba za kreiranjem novih antibiotskih formula što podrazumeva dugotrajan i skup proces ispitivanja na živim organizmima. Koliko je proces odobravanja novog antibiotika komplikovan i skup govori i činjenica da se nakon 1980. godine nije pojavila nijedna nova klasa antibiotika. Tek nedavno je prezentovan jedan novi antibiotik, teiksobaktin, koji se pokazao kao efikasan za određene Gram-pozitivne bakterije, inače rezistentne na veliki broj dotadašnjih antibiotika.

Problem je što će komercijalizacija ovog leka nastupiti tek nakon detaljnih ispitivanja na živim organizmima, što je sigurno period od par godina (Kirby T. 2015; Ling L.L. i sar. 2015; Jovanović Ž. doktorska disertacija, 2015). Sve ovo vratilo je srebro u medicinsku primenu, a jedan od prvih proizvoda na bazi srebra koji se u tom periodu pojavio jeste srebro-sulfadiazin. Ovaj agens sa srebrom koristi se i danas kao krema pri lečenju opekotina, a primenjuje se u 1% koncentraciji (Fox C.L. 1967; Rai M. i sar. 2009). Daljim razvojem nanonauka srebro je postalo sastavni deo mnogih proizvoda u različitim oblastima medicine (Tabela 2.1) (US-EPA, 2010; Cheng D. i sar. 2004).

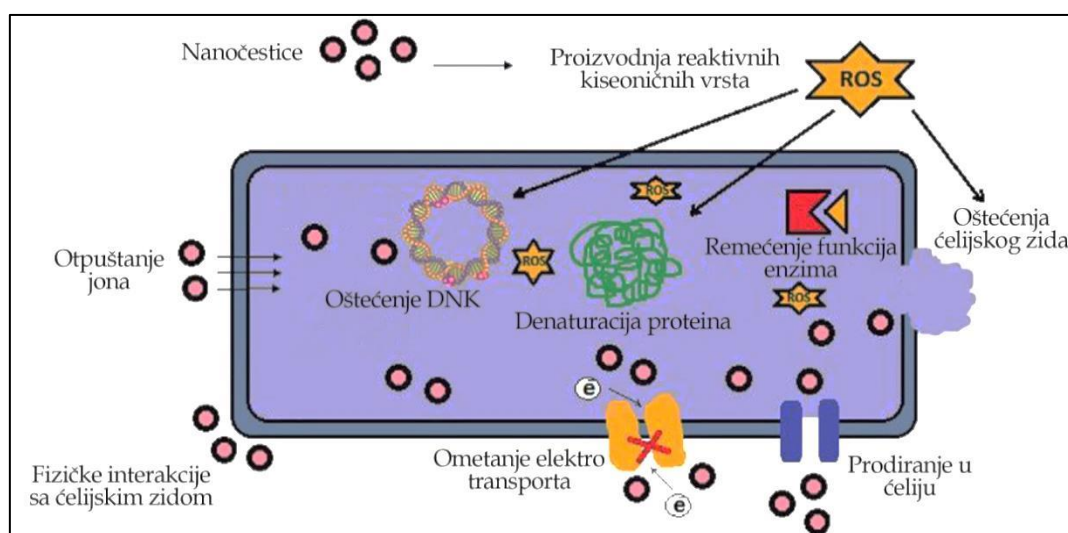
*Tabela 2.1. Oblasti primene srebra u medicini.*

<i>oblast medicine</i>	<i>primena</i>
anesteziologija	premazivanje maski i endotrahealnih linija
kardiologija	premazivanje katetera
oftalmologija	premazi na kontaktnim sočivima
hirurgija	premazi na hiruškim instrumentima
stomatologija	dodaci u dentalnim materijalima
neurohirurgija	premazi uređaja za drenažu
ortopedija	aditivi u materijalima za kosti i implantima
dermatologija	hidrogel obloge za zarastanje rana
farmacija	agensi za akne, dermatitis
nega pacijenta	superapsorbujući hidrogelovi za materijale za inkontijenciju

Nanočestice srebra ispoljavaju snažnu antimikrobnu aktivnost prema širokom spektru mikroorganizama: Gram-negativnim bakterijama - *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Vibrio*; Gram-pozitivnim bakterijama - *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*; gljivicama - *Aspergillus*, *Candida*, *Saccharomyces*; virusima - HIV-1 i HBV (Wijnhoven S.W.P. i sar. 2009; Wright J.B. i sar. 1999; Sun R.W. i sar. 2005). Wijnhoven i saradnici su pokazali da antibakterijski potencijal penicilina G, eritromicina, klindamicina, amoksiciklina i vankomicina protiv *Staphylococcus*

*aureus* i *Escherichia coli* raste u prisustvu nanočestica srebra. Veličina i oblik nanočestica imaju značajan uticaj na antibakterijsku aktivnost i to je jedan od glavnih izazova za istraživače pri kreiranju novog antimikrobnog agensa. Mnoge grupe istraživača bavile su se proučavanjem antimikrobne aktivnosti srebra, pa su tako Panaček i saradnici, kao i Morones i saradnici pokazali da nanočestice manjih dimenzija pokazuju veći potencijal prema bakterijama zahvaljujući većoj specifičnoj površini, čak i pri niskim koncentracijama (Wijnhoven i sar. 2009; Panacek A. i sar. 2006; Morones J.R. i sar. 2005). Mehanizam prema kome nanočestice srebra deluje na bakterije nije do kraja razjašnjen i mišljenja naučnika o tome koji je mehanizam dominantan su podeljena. Različite vrste bakterija imaju i različite strukturne karakteristike, pa će različito i reagovati na prisustvo srebra. Na otpornost bakterija na dejstvo baktericidnog agensa najveći uticaj ima struktura i debljina ćelijskog zida. Gram-pozitivne bakterije imaju deblji ćelijski zid (~20-80 nm) kompleksne građe, sastavljen uglavnom od peptidoglikanskih jedinica sa kovalentno vezanim ugljenim hidratima i proteinima (npr. teihoinskom kiselinom, koja sačinjava 50% suve materije ćelijskog zida). S druge strane, Gram-negativne bakterije imaju jako tanak proteinski sloj ćelijske membrane (svega 2-3 nm), ali pored toga sadrže dodatni membranski sloj sastavljen od gusto pakovanih fosfolipida i polisaharida koji povećavaju gustinu negativnog naelektrisanja na površini. Povećanje negativnog naboja na ćelijskom zidu olakšava vezivanje pozitivno naelektrisanih jona (u ovom slučaju  $Ag^+$ -jona), što je u skladu sa podacima iz literature koji potvrđuju da su Gram-negativne bakterije osetljivije na dejstva baktericidnih agenasa. Najverovatniji mehanizam delovanja jona srebra na bakterije podrazumeva reakcije sa fosforim i tiolnim grupama ćelijskog zida, stvaraju se šupljine i dolazi do curenja citoplazme, što na kraju dovodi do smrti same ćelije. Pored toga što mogu da deluju na određene grupe u ćelijskom zidu, jedan deo jona ulazi unutar ćelije i pokazuje višestruko dejstvo, inhibira deobu ćelije, oštećuje DNK i stvara reaktivne kiseonične vrste (*eng. reactive oxygen species - ROS*) koje mogu biti izuzetno toksične (US-EPA

2010; Wijnhoven S.W.P. i sar. 2009; Morones J.R. i sar. 2005). Pored jona, prema nekim autorima i nanočestice srebra dovode do smrti ćelije. Naime, nanočestice se vezuju za površinu ćelije, remete njenu propustljivost i funkciju ćelijskog disanja, i na taj način dovode do oštećenja. Takođe, u prisustvu nanočestica može doći do formiranja radikala koji mogu dovesti do značajnih oštećenja ćelijskog zida (Morones J.R. i sar. 2005; Sondi I. i Salopek-Sondi B. 2004; . Kim J.S. i sar. 2007). Na Slici 2.5 prikazani su različiti mehanizmi prema kojima nanočestice srebra deluju na ćelije.



**Slika 2.5.** Različiti mehanizmi antimikrobnog delovanja nanočestica srebra (preuzeto iz Dizaj S.M. i sar. 2014; copyright©2014, Elsevier, Dizaj S.M. i sar., Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles, *Mat. Sci. Eng. C-Bio. S*).

Hwang i saradnici su ispitivali delovanje srebra na bioluminescentne bakterije i pokazali da joni i nanočestice imaju sinergističko toksično dejstvo na bakterije (Hwang E.T. i sar. 2008). Mehanizam delovanja srebra na gljive takođe nije razjašnjen, a pretpostavlja se da je sličan mehanizmu delovanja na bakterije. Sun i saradnici su pokazali da su nanočestice srebra efikasni antimikrobni agens protiv virusa HIV-a tip I. Različite studije su pokazale da su nanočestice srebra efikasnije u odnosu na nanočestice zlata, kao i da je efikasnost najveća kada je prečnik ispod 10 nm (Sun R.W. i sar. 2005; Elechiguerra J.L. i sar. 2005).

Nanočestice srebra pokazuju snažno produženo antiinflamatorno dejstvo, suzbijaju zapaljenske procese i formiranje nekrotičnog tkiva, sprečavajući istovremeno i mogućnost infekcije, što je veoma važno u ranoj fazi zarastanja rana (Wijnhoven S.W.P. i sar. 2009). Hidrogelovi sa inkorporiranim nanočesticama srebra se iz tog razloga koriste kao zavoji i obloge za rane (*eng. Wound dressing*), i dostupni su na tržištu kroz različite proizvode: ALGICELL® Ag Antimicrobial Alginate Dressing; Acticoat 7 Antimicrobial Silver Dressing; SILVERCEL Antimicrobial Alginate Dressing - Sterile; SilverSTAT® - Antibacterial Wound Dressing Gel.

#### 2.3.6. Citotoksičnost nanočestica srebra

Svakodnevna upotreba srebra, ne samo u medicini, već i u mnogim drugim oblastima, istovremeno znači i svakodnevni kontakt ljudskog organizma sa srebrom u nekom obliku. Kako se vremenom upotreba proizvoda koji sadrže srebro povećavala, a naročito nakon ekspanzije upotrebe u medicini, povelu se pitanje bezbednosti i mogućih štetnih uticaja, pre svega na ljudski organizam, a zatim i na okolinu. Kada se govori o ljudskom organizmu, načini izlaganja su različiti, pa se tako srebro u organizam može uneti oralno (gutanjem), inhalacijom (udisanjem) ili apsorpcijom (preko kože). Jedan od najčešćih i u javnosti najpoznatiji zdravstveni problem usled prekomerne izloženosti srebru je argirija. Argirija je stanje koje nastaje taloženjem srebra u organizmu nakon dugotrajne izloženosti česticama srebra, i ispoljava se kao plavo sivo obojenje kože koje se može vizuelno uočiti (White J.M.L. i sar. 2003; Rai M. i sar. 2009). Zahvaljujući nanometarskim dimenzijama, čestice imaju sposobnost penetracije kroz različite barijere u ljudskom telu, što znači da putem limfe mogu stići do bilo kog organa, potencijalno ugroziti njegovu funkciju i dovesti do ozbiljnih oboljenja. Izlaganje izuzetno visokim dozama u vazduhu može dovesti do problema sa disanjem i izazvati iritaciju disajnih puteva, dok kod nekih osoba može doći do alergijskih reakcija. Takođe, prema istraživanjima nekih autora, dugotrajno izlaganje velikim dozama može nepovoljno da utiče na koštanu srž,

na funkciju bubrega ili jetre, ili u nekim slučajevima čak i da izazove epileptični napad (Takenaka S. i sar. 2001; Oberdörster G. i sar. 2005). Ispitivanjem baktericidnog potencijala srebra na ćelije sisara došlo se do podataka da minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) koja se odnosi na referentnu kulturu ćelija propisanu standardom iznosi od 0,78–6,25 ppm, dok je minimalna baktericidna koncentracija (MBC) 12,5 ppm. Takođe je pokazano da nema toksičnih efekata na ćelije fibroblasta pri koncentracijama koje se kreću do 1,2 ppm, što je veoma važno kada se govori o topikalnoj primeni za zarastanje rana (Jain J. i sar. 2009; Hardes J. i sar. 2007). Godine istraživanja i sve više komercijalnih proizvoda na bazi srebra doveli su i do značajnog broja standarda i propisa bez kojih bezbedna upotreba ovih proizvoda ne bi bila moguća. Agencija za zaštitu životne sredine u Americi (*eng. United States Environmental Protection Agency – US-EPA*) je 2003. godine kao granicu toksičnosti u slučaju oralne kontaminacije srebrom propisala koncentraciju od 0,005 mg/kg/dan (US-EPA 2010; Samberg M.E. i sar. 2010). Treba napomenuti i da aktivnost nanočestica u *in vivo* uslovima ne zavisi samo od koncentracije, već i od veličine, oblika, specifične površine i raspodele nanočestica. Postoje brojna istraživanja koja obuhvataju ispitivanja toksičnosti srebra, a rezultati su različiti. Francesca Filon Larese i saradnici ispitivali su sposobnost penetracije nanočestica kroz kožu u dva granična slučaja, kroz zdravu neoštećenu i kroz oštećenu kožu. Sintetisane su sferne nanočestice u opsegu od 10 do 50 nm. Utvrđeno je da nanočestice imaju sposobnost penetracije koju je, iako nije značajna, ipak moguće detektovati, kao i da je izraženija na delovima kože koji su oštećeni (Laresea F.F. i sar. 2009). Meghan E. Samberg i saradnici ispitivali su potencijalnu citotoksičnost nanočestica srebra prema keratinocitnim ćelijama kože (*eng. human epidermal keratinocytes-HEKs*). Simulirana je potencijalna topikalna primena nanočestica srebra prečnika u opsegu 20 do 80 nm, u trajanju od 14 dana. Pokazano je da nema značajnog opadanja vijabiliteta ćelija pri primenjenim koncentracijama koje su iznosile od 0,34 do 1,7 ppm, kao i da ne dolazi do lokalnih upalnih procesa (Samberg M.E. i sar. 2010). Iz svega

navedenog se može zaključiti da je i te kako moguće kreirati proizvod, bilo medicinski ili komercijalni, koji će omogućiti maksimalno iskorišćenje svih potencijala koje nanočestice srebra nude, a da se pri tome ne pređe granica toksičnosti. Potencijal bezbedne primene nanočestica srebra se ogleda u pravilnom razumevanju njihovog delovanja u zavisnosti od vrste ćelija sa kojom dolaze u kontakt, kao i u određivanju granice toksičnosti za pojedine primene. U tom smislu, veliki potencijal imaju sistemi koji poseduju sposobnost kontrolisanog otpuštanja jona, pri čemu čestice služe kao rezervoari jona, a koje su u trenutku primene zaštićene i nemaju direktan kontakt sa mestom primene. Hidrogelovi sa inkorporiranim nanočesticama srebra su primer ovih sistema, i imaju veliki potencijal primene kao obloge za različite vrste rana, upala ili infekcija kože. Prednost ovih sistema jeste što na ovaj način vrlo malo srebra bude sistemski apsorbovano, tj. male količine srebra ulaze u organizam (Wilkinson L.J. i sar. 2011). Čak i u slučajevima kada se premaši granična dozvoljena koncentracija, srebro se nalazi u vidu  $Ag^+$ -jona koji nemaju štetan uticaj na centralni i periferni nervni sistem i ne deponuju se u organizmu, već se izlučuju najčešće putem urina (Lansdown A.B.G. 2010). Pored štetnih uticaja na živi svet, posebna pažnja se poklanja i ispitivanju uticaja nanočestica srebra na životnu sredinu. Na osnovu brojnih studija i velikog broja istraživanja svetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization - WHO*) je 2002. godine izdala zvanično saopštenje da je količina jona srebra u životnoj sredini isuviše mala da bi mogla u skorije vreme da dovede do značajnog povećanja sveukupne toksičnosti (Wijnhoven S.W.P. i sar. 2009).

#### 2.3.7. Kliničke studije i preporuke za bezbednu upotrebu nanočestica srebra

Decembra 2011. godine održan je internacionalni koncenzus ekspertske grupe iz celog sveta koji je za cilj imao izdavanje preporuka za bezbednu i pravilnu upotrebu obloga sa nanočesticama srebra (International consensus, London, 2012). Dokument je pružio objašnjenja o delovanju nanočestica srebra u *in vivo* i *in vitro* uslovima zasnovana na iskustvima u kliničkoj praksi i



rezultatima istraživanja koji su do tog trenutka objavljeni. U studiji je učestvovao veliki broj vodećih medicinskih i istraživačkih institucija: Excelsior College School of Nursing, New York (Sjedinjene Američke Države); Silver Chain Nursing Association & Curtin University, Perth (Australija); Section of Wound Healing and Wound Healing Research Unit, Cardiff University (Engleska); Aging Rehabilitation and Geriatric Care Research Centre, St Joseph's Parkwood Hospital, Ontario (Kanada); Sophiahemmet University College, Karolinska University Hospital, Stockholm (Švedska); Diabetic Foot Unit, Complutense University, Madrid (Španija); Inkosi Albert Luthuli Central Hospital, Durban (Južna Afrika); National Programme for Infection Control, Directorate General of Health, Lisbon (Portugal); Faculty of Nursing & Midwifery, Royal College of Surgeons in Ireland, Dublin (Irska). Na osnovu kliničkih ispitivanja objašnjeni su različiti fenomeni koji su do tog trenutka shvatani na pogrešan način. Kao glavni zaključci mogu se izdvojiti sledeći:

- Obloge na bazi nanočestica srebra su efikasno sredstvo za zarastanje rana i sprečavanje razvoja infekcija kada se koriste na odgovarajući način;
- Mala je verovatnoća da se primenom obloga sa srebrom može izazvati sistemsko oboljenje u vidu argirije, jer je uslov za to primena mnogo manjih koncentracija srebra u mnogo dužem vremenskom periodu;
- Nedostatak odgovora na dejstvo srebra nije posledica rezistencije na srebro, već neodgovarajuće primene;
- Iako je teorijski moguće, klinički nije dokazano da prisustvo nanočestica srebra može izazvati rezistenciju na određene vrste antibiotika;
- U slučaju kada su pacijenti deca, obloge se mogu koristiti najduže dve nedelje, uz dodatne mere opreznosti;
- Obloge sa nanočesticama srebra ne iziskuju ulaganja veća nego bilo koje druge obloge sa antimikrobnim dejstvom.

Međutim, postoje i slučajevi kada upotreba obloga sa nanočesticama srebra nije neophodna, pa se u tim slučajevima primenjuju antimikrobni agensi drugog tipa. Kao primeri tih slučajeva se izdvajaju:

- Čiste hiruške rane sa malim rizikom od infekcije;
- Površinske rane izrazito male površine sa malim rizikom od infekcije;
- Kod pacijenata koji su osetljivi na srebro ili bilo koju drugu komponentu sistema;
- Tokom perioda trudnoće, dojenja i kod novorođenčadi;
- Kod pacijenata koji se pripremaju za snimanje metodom magnetne rezonance.

Na osnovu svega izloženog, izdate su preporuke o kliničkoj upotrebi obloga sa nanočesticama srebra, koje će omogućiti efikasnu i u isto vreme bezbednu primenu:

- i. Pre početka tretmana potrebno je izvesti sveobuhvatnu procenu stanja pacijenta i rane koju je potrebno tretirati;
- ii. Odabrati vrstu obloge koja bi se koristila, uzimajući u obzir vrstu i stepen infekcije, dubinu rane, lakoću manipulacije i štetnost po okolinu;
- iii. Nakon početka procesa, u zavisnosti od vrste tretmana, izvoditi pravovremene revizije, na osnovu kojih se terapija prekida, menja ili se završava;
- iv. Posebno obratiti pažnju ukoliko se obloge koriste kod dece i ukoliko je površina rane veoma velika. Ovi slučajevi zahtevaju češće revizije i kontrole.

## **2.4. Radijaciono-hemijski aspekti sinteze nanokompozitnih sistema**

### **2.4.1. Visoko energijski izvori zračenja**

Zračenje visoke energije ili jonizujuće zračenje predstavlja elektromagnetno ili čestično zračenje, energije koja je dovoljno velika da izazove jonizaciju sredine kroz koju prolazi. Podela visoko energijskih izvora zračenja se može izvesti prema različitim kriterijumima. Prema poreklu, izvori jonizujućeg zračenja mogu biti prirodni (kosmičko zračenje, radioaktivni raspad prirodnih radionuklida) ili veštački (UV lampe, Rendgenske cevi, jonski izvori,

akceleratori čestica, radioaktivni raspad veštačkih radionuklida). Prema prirodi se dele na talasne izvore zračenja u koje spadaju X- i  $\gamma$ -zračenje i korpuskularne izvore zračenja u koje spadaju sve naelektrisane i nanaelektrisane čestice ( $\alpha$  i  $\beta$  čestice, elektroni ( $e^-$ ), pozitroni ( $e^+$ ), protoni ( $p$ ), deuteroni ( $d$ ), ubrzani teški joni kao i brzi i spori neutroni ( $n$ )). Takođe, podela se može izvesti i prema vrsti interakcije koju ostvaruju pri prolasku kroz određenu sredinu, pri čemu se razlikuju neposredno jonizujućii izvori zračenja u koje spadaju sve naelektrisane čestice, i posredno jonizujućii izvori zračenja koji obuhvataju gama ( $\gamma$ -) i X-zračenje (Draganić I. 1968; Arnikar H. 1992; Mostafavi M. i Douki T. 2008; Chmielewski A.G. i Haji-Saeid M. 2004). Zahvaljujućii visokim energijama koje postižu, kao i relativno dugim vremenima poluraspada, najčešćee korišćeni izvori gama zračenja visokih energija su kobalt  $^{60}\text{Co}$  i cezijum  $^{137}\text{Cs}$ :

- kobalt-60 ( $^{60}\text{Co}$ ),  $E= 1,17-1,33$  MeV,  $t_{\text{poluraspada}}=5,27$  godina
- cezijum-137 ( $^{137}\text{Cs}$ ),  $E=0,66$  MeV,  $t_{\text{poluraspada}}=30,1$  godina

#### 2.4.2. Osnovni pojmovi u radijacionoj hemiji

*Apsorbovana doza* se definiše kao kolićina apsorbovane energije po jedinici mase materije kroz koju zraćenje prolazi. Jedinica za apsorbovanu dozu je grej (Gy), mada se često kao jedinica koristi i (*rad*) [1 Gy = 100 rad]. Vrednost apsorbovane doze zavisi od jaćine radioaktivnog izvora, rastojanja izmeđuu izvora i materije, vremena ozraćivanja, kao i od sastava samog materijala.

*Brzina apsorbovane doze (jaćina doze)* predstavlja meru uticaja vremena, i definiše se kao kolićina energije jonizujućeg zraćenja koju akumulira jedinica mase ozraćenog materijala u jedinici vremena. Izražava se u jedinici Gy/s ili Gy/h.

*Ekspoziciona doza* je ukupna kolićina naelektrisanja jona koju jonizujućee zraćenje proizvede u jedinićnoj masi vazduha ( $1 \text{ C/kg} = 3,87 \times 10^3$  rendgen (R)).

*Ekvivalentna doza (H)* je apsorbovana doza normirana na specifićni deo tela (u biološkim uzorcima). Pojam ekvivalentne doze je uveden kako bi detaljnije bili opisani efekti jonizujućeg zraćenja u razlićitim biološkim sistemima.

Osnovna jedinica ekvivalentne doze je sivert (1 Sv = 1 Gy), a može se odrediti korišćenjem sledeće jednačine:

$$H = D \cdot RBE \quad (2.13)$$

pri čemu je *RBE* relativna biološka efikasnost (Spinks J.W.T. i Woods R.J. 1976; Arnikar H. 1992.; Chmielewski A.G. i Haji-Saeid M. 2004).

*Radioliza vode* je proces koji se dešava pri izlaganju vodenih sistema dejstvu gama zračenja. U ovom procesu jonizujuće zračenje predaje energiju molekulima vode i dolazi do njihove jonizacije i pobuđivanja (jed. 2.14) (Krkleš A. doktorska disertacija, 2009; Draganić I.G. i Draganić Z.D. 1971; Acharya A. i sar. 2003).



Proizvodi nastali u ovim procesima imaju dovoljno energije da dalje učestvuju u reakcijama jonizacije i pobuđivanja pri čemu nastaju novi proizvodi. Reakcije se nastavljaju do uspostavljanja termodinamičke ravnoteže.

Prenosom protona sa  $H_2O^+$  jona na molekule vode prvo se stvaraju  $H_3O^+$  joni i  $OH^\bullet$  radikali (jed. 2.15), a zatim dolazi i do hidratacije  $H_3O^+$  jona (jed. 2.16):



Elektroni koji su nastali u procesu jonizacije se termalizuju i hidratišu prema jednačini:



Molekuli vode nastali pobuđivanjem podležu procesu disocijacije dajući pri tom  $H^\bullet$  i  $OH^\bullet$  radikale:



Primarne vrste nastale u procesu radiolize vode ( $e_{aq}^-$ ,  $H_3O^+$ ,  $OH^\bullet$ ,  $H^\bullet$ ) dalje difunduju kroz rastvor i međusobno reaguju, pri čemu između ostalih nastaju i molekulski proizvodi radiolize, sve do uspostavljanja ravnoteže. Svi navedeni procesi se dešavaju u periodu od  $10^{-11}$  do  $10^{-10}$  s od trenutka prolaska zračenja

kroz sistem. Neke od reakcija koje se odigravaju mogu se prikazati sledećim jednačinama:



Prikazane jednačine opisuju čitav niz fizičkih i hemijskih procesa koji se dešavaju nakon izlaganja vodenih sistema dejstvu gama zračenja, odigravaju se u periodu do  $10^{-9}$  s od početka zračenja i zbirno se mogu prikazati sledećom jednačinom:



pri čemu se razlikuju radikalski proizvodi ( $e_{aq}^-$ ,  $H_3O^+$ ,  $OH^\bullet$ ,  $H^\bullet$ ) i molekulski proizvodi ( $H_2$  i  $H_2O_2$ ). Nastali proizvodi mogu biti oksidujuće ( $OH^\bullet$  i  $H_2O_2$ ) ili redukujuće vrste ( $e_{aq}^-$  i  $H^\bullet$ ). Osnovno svojstvo radikalskih vrsta jeste njihova nestabilnost koja je uslovljena postojanjem nesparenih elektrona, što ih čini vrlo reaktivnim. Nespareni elektron određene radikalske vrste može da se upari sa sličnim elektronom u drugom radikalu, da bude eliminisan u elektron-transfer reakcijama, kao i da učestvuje u reakcijama koje će kao proizvode dati sekundarne radikale koji će biti mnogo stabilniji. Proces radiolize koji se dešava pod dejstvom gama zračenja je praćen prenosom velike količine energije koja se ne apsorbuje u jednom koraku. Iz tog razloga uveden je pojam radijaciono-hemijskog prinosa (G-vrednost), koji predstavlja odnos broja nastalih proizvoda i apsorbovane energije zračenja. G-vrednost je jednaka broju promena (nastanak radikala, fragmentacija, agregacija) koje nastaju prilikom apsorpcije jonizujućeg zračenja energije od 100 eV. Vrednosti radijaciono-hemijskih prinosa za primarne proizvode radiolize vode iznose:  $G(e_{aq}^-) = G(OH^\bullet) = 2,80$ ;  $G(H^\bullet) =$

0,60;  $G(\text{H}_2) = 0,45$ ;  $G(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,80$  (Draganić I.G. i Draganić Z.D. 1971; Acharya A. i sar. 2003; Kačarević Popović Z. i sar. 2010; Krklješ A. doktorska disertacija 2009). Bez obzira na veliki broj reaktivnih vrsta koje nastaju u procesu radiolize vode, proces je moguće veoma precizno usmeriti ka dobijanju željenog proizvoda. Supstance koje se pri tome koriste nazivaju se hvatači radikala (skevendžeri). Hvatači radikala su supstance koje imaju sposobnost da hemijski reaguju sa nepoželjnim vrstama, tako što će ih prevesti u željene radikalske vrste, ukloniti ih iz sistema ili ih inaktivirati. Na taj način moguće je sve vrste prevesti u željene radikale (redukujuće ili oksidujuće), što olakšava odigravanje procesa, nema neželjenih proizvoda i povećava se prinos reakcije. Efikasno dejstvo hvatača radikala u sistemu je posledica toga što se njihove reakcije sa nepoželjnim vrstama daleko brže odigravaju od reakcija u kojima sa nepoželjnim vrstama reaguju ostale komponente sistema (Radosavljević A. i sar. 2012; Kačarević Popović Z. i sar. 2007; Mostafavi M. i Douki T. 2008).

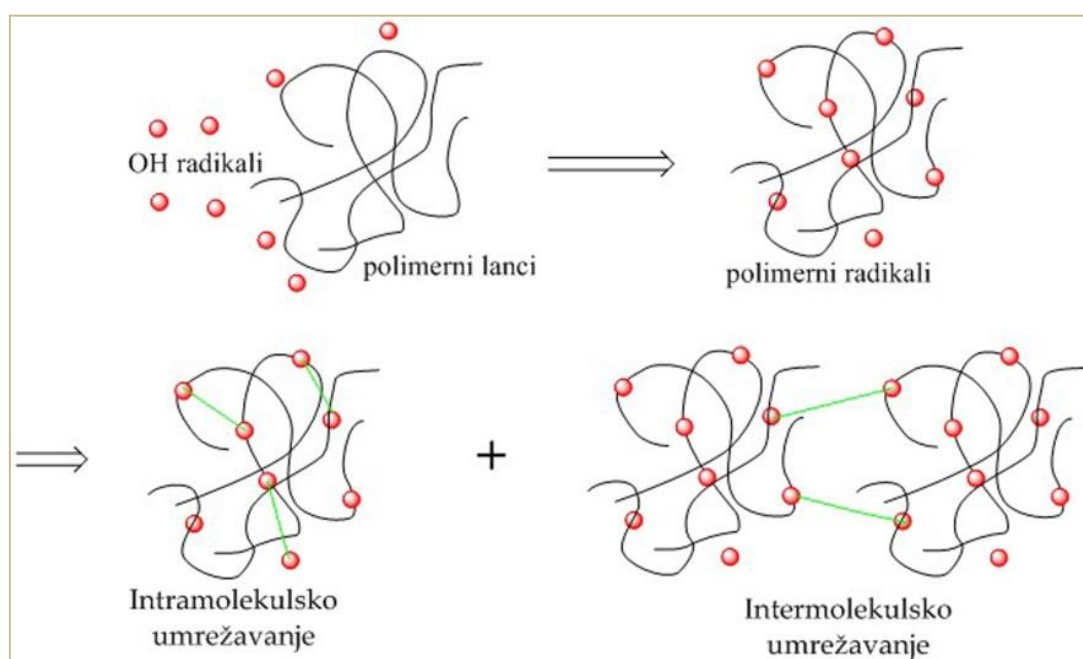
#### 2.4.3. Uticaj jonizujućeg zračenja na materiju

Jonizujuće zračenje se sastoji od subatomske čestice ili elektromagnetnih talasa dovoljno velike energije da odvoje elektron od atoma ili molekula i na taj način ga jonizuju. Kao što je već pomenuto postoje različite vrste zračenja, radioaktivno zračenje ( $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ ), naelektrisane čestice velikih energija (elektroni, protoni, itd.) i rendgensko zračenje ( $X$  zraci). Različite vrste zračenja poseduju različite vrste energija i različitu prodornu moć, pa se samim tim i njihovo delovanje na materiju razlikuje. Kada visokoenergijsko zračenje prolazi kroz materiju, bilo da se radi o živoj ili neživoj materiji, odigravaju se primarne reakcije sa elektronima sredine pri čemu im se predaje velika količina energije. U ovim procesima nastaju nove reaktivne vrste sa širokim spektrom energija koje putujući dalje kroz materiju tu energiju gube učestvujući u različitim mehanizmima (pobuđivanje i jonizacija). Kada se govori o biološkom materijalu, nakon rekombinacije reaktivnih vrsta svi molekuli se ponovo nalaze u stabilnom stanju uz delimično promenjen hemijski sastav, što u određenim

slučajevima znači postojanje nekih vrsta oštećenja. Ukoliko se radi o neživoj materiji, nakon završenog procesa radiolize i rekombinacije reaktivnih vrsta dolazi do formiranja novih ili delimično izmenjenih hemijskih jedinjenja (Arnikaar H. 1992; Mostafavi M. i Douki T. 2008).

#### 2.4.4. Radiolitičko umrežavanje polimera

Umrežavanje polimera podrazumeva transformaciju linearnih polimernih lanaca u trodimenzionalne mreže njihovim međusobnim povezivanjem (Slika 2.6), pri čemu se povećava molarna masa polimera. Međutim, dejstvo jonizujućeg zračenja pored polimerizacije i umrežavanja, može dovesti i do degradacije polimerne mreže što zavisi od strukture samog molekula polimera i od vrste i jačine zračenja. Umrežavanju teže polimeri koji u osnovnom C-C lancu sadrže više H atoma. S druge strane, prirodni polimeri, kao i polimeri koji imaju više supstituenata u osnovnom lancu teže degradaciji (Wang B. i sar. 2000; Wang B. i sar. 1998; Nagaoka N. i sar. 1997).



**Slika 2.6.** Šematski prikaz procesa umrežavanja polimera (stvaranje intra- i intermolekulskih veza).

U cilju optimizacije procesa umrežavanja radijaciono-hemijskom metodom jedan od najvažnijih zadataka jeste što tačnija procena kvantitativnog hemijskog prinosa, tj. stvaranja poprečnih veza. Jedan od najpouzdanijih načina određivanja prinosa procesa umrežavanja jeste sol gel analiza koja se zasniva na gravimetrijskom određivanju sol i gel frakcije nakon završenog procesa zračenja. Umrežavanje polimernih lanaca se karakteriše gustinom umreženja ( $x$ ) koja se može odrediti na sledeći način:

$$x = x_0 \cdot D_\gamma \quad (2.27)$$

gde je  $x_0$  broj strukturnih jedinica glavnog lanca umreženih apsorbovanom dozom, a  $D_\gamma$  jedinična doza zračenja.

Na sličan način definiše se i gustina kidanja lanca ( $y$ ), koja predstavlja broj strukturnih jedinica lanca na kojima je došlo do kidanja veze ( $y_0$ ) pod dejstvom jedinične doze zračenja ( $D_\gamma$ ):

$$y = y_0 \cdot D_\gamma \quad (2.28)$$

Jedinična doza, izražena u  $kGy$ , odgovara apsorpciji energije od  $0,624 \cdot 10^{19}$  eV po gramu. Pedesetih godina prošlog veka značajan doprinos razumevanju procesa umrežavanja pod uticajem zračenja visoke energije, kao i mogućnost određivanja odnosa sol i gel frakcije, dao je Charlesby (Charlesby A. 1960). On je računski rešio problem poprečnog povezivanja polimernih lanaca, a svoju teoriju je zasnovao na računu verovatnoće. Charlesby i Pinner su razvili teoriju umrežavanja polimera sa najverovatnijom raspodelom molarnih masa ( $M_w/M_n = 2$ ) kod kojih se istovremeno sa reakcijama umrežavanja odvijaju i reakcije kidanja makromolekulskih lanaca. Ova teorija povezuje rastvornu frakciju (sol frakciju) ( $s$ ) i apsorbovanu dozu zračenja prema izrazu (Chapiro A. 1962; Ortega A. i sar. 2007):

$$s + s^{1/2} = \frac{y_0}{x_0} + \frac{2}{x_0 P_2 D} \quad (2.29)$$

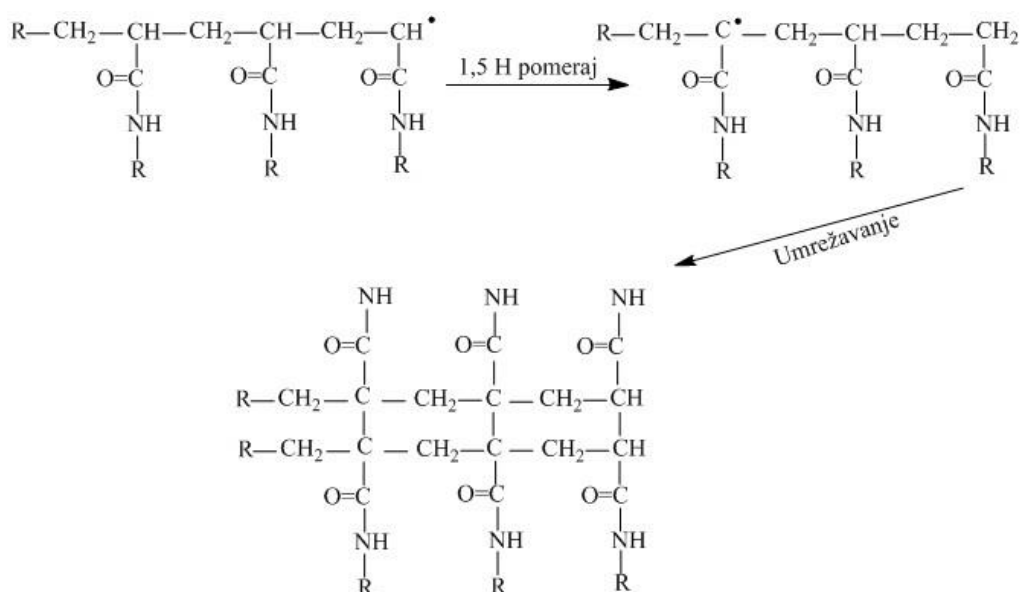
gde  $y_0/x_0$  predstavlja odnos gustine kidanja lanca i umrežavanja i odsečak je na ordinati dijagrama  $s+s^{1/2}$  u zavisnosti od  $1/D$ , a  $2/(x_0 \cdot P_2)$  predstavlja nagib prave. Parametar  $P_2$  predstavlja stepen polimerizacije za odgovarajuću vrednost



apsorbovane doze zračenja  $D$ . Vrednost gel doze se određuje ekstrapolacijom vrednosti  $s+s^{1/2} = 2$ . Teorijski, sve tačke bi, saglasno ovoj jednačini, trebalo da leže na istoj pravoj. Međutim, to nije uvek slučaj. Razlog tome leži u činjenici da ova teorija ne uzima u obzir intermolekulske poprečne veze, kao i da pretpostavlja da sve jedinice lanca imaju istu verovatnoću za kidanje i umrežavanje. I pored ograničenosti primene Charlesby-Pinner-ove jednačine, ona predstavlja dobru aproksimaciju i najpouzdaniji način za određivanje gel doze. Usledila su brojna istraživanja koja su za cilj imala objašnjenje odstupanja koja postoje u Charlesby-Pinner-ovoj teoriji. Inokuti i saradnici razvili su teoriju u kojoj odnos sol frakcije i apsorbirane doze ne zavisi od početne raspodele molarnih masa, dok je Saito-Kang-Dole teorija zasnovana na pretpostavci da su ova odstupanja posledica odstupanja funkcije raspodele molarnih masa od „najverovatnije raspodele“ date kao Wesslau-ova raspodela. Njihova teorija uzima u obzir i efekat apsorbirane doze i temperature na radijacioni prinos umrežavanja (Inokuti M. 1963; Saito O. i sar. 1967).

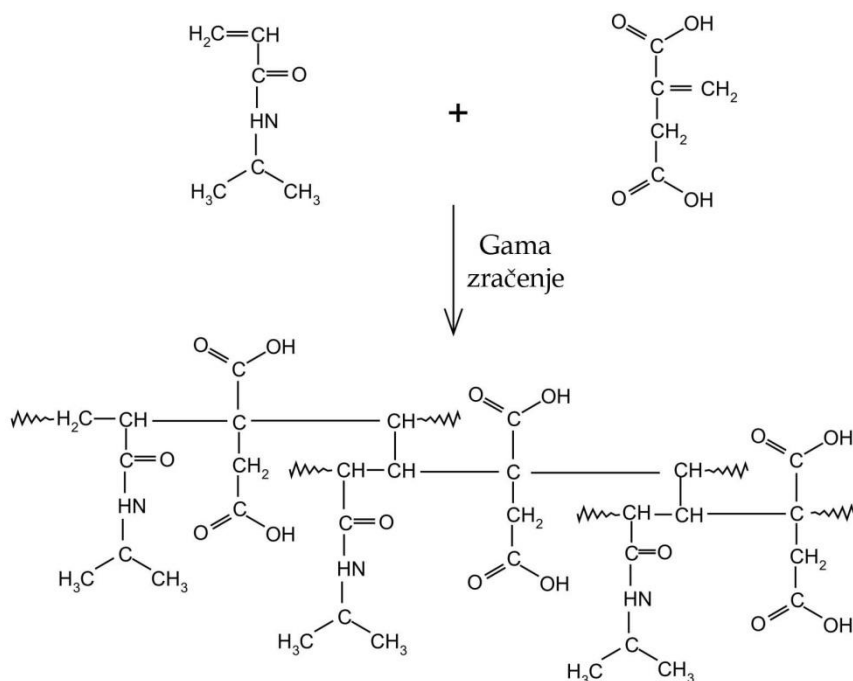
Kao što je već pomenuto, proces umrežavanja započinje ozračivanjem vodenog rastvora monomera (ili kopolimera), pri čemu dolazi do radiolize vode uz formiranje primarnih radikala ( $e_{aq}^-$ ,  $OH^\bullet$ ,  $H^\bullet$ ). U zavisnosti od reakcionih uslova, svaki od nastalih primarnih radikala može da reaguje sa molekulom monomera i na određenom mestu formira novi reaktivni centar. Procesu umrežavanja monomera prethodi proces prenosa aktivnosti duž lanca pri čemu dolazi do formiranja velikog broja sekundarnih radikala (von Sonntag C. i sar. 1999; Baldock C. i sar. 2010). Iako postoje brojna istraživanja, mehanizam umrežavanja molekula NiPAAm-a i kopolimera NiPAAm-a i IK radiolitičkim putem nije do kraja razjašnjen. Razlog tome leži upravo u velikom broju intermedijera koji nastaju pa su mogućnosti povezivanja delova lanca i nastajanja novih hemijskih veza velike. Prve rezultate istraživanja o mogućnosti sinteze polimerne mreže PNiPAAm-a metodom radijacione hemije objavili su Nagaoka i saradnici, nakon čega je došlo do povećanog interesovanja istraživača za ispitivanjem mogućnosti koje ovaj način sinteze nudi. Strauss i

saradnici ispitivali su radiolitičko umrežavanje vodenog rastvora NiPAAm-a. Ispitivanje se sastojalo u uklanjanju određenih reaktivnih vrsta dodavanjem pogodnog hvatača radikala, kako bi se pratio uticaj tačno određene reakcione vrste. Pretpostavka je da se procesi formiranja različitih radikala odvijaju simultano (Strauss P. i sar. 1998; Abd El-Mohdy H.L. i Safrany A. 2008; Nagaoka N. i sar. 1993; Acharya A. i sar. 2003; Chapiro A. 1962). Nastali polimerni radikali reaguju sa radikalima na istom ili različitom polimernom lancu, formirajući tako intra- i intermolekulske veze. Upravo formiranje ovih veza je odgovorno za umrežavanje polimerne matrice (Slika 2.7).



**Slika 2.7.** Šematski prikaz formiranja PNiPAAm polimerne mreže.

U slučaju sinteze kopolimera NiPAAm-a i IK, pored raskidanja dvostruke veze u molekulu NiPAAm-a dolazi i do raskidanja dvostruke veze u molekulu IK. Ova dva procesa su dominantna i dalje dolazi do povezivanja monomera, tj. do polimerizacije i umrežavanja (Slika 2.8.).



**Slika 2.8.** Šematski prikaz formiranja P(NiPAAm/IK) polimerne mreže.

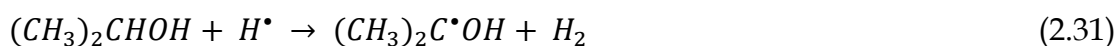
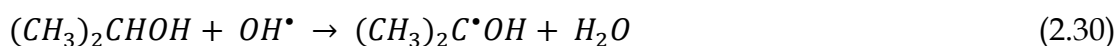
Ispitivanjem mogućnosti metode gama zračenja za sintezu hidrogelova na bazi PNiPAAm-a i IK za kontrolisano otpuštanje lekova bavili su se Tasdelen i saradnici. Sintetisani su kopolimerni hidrogelovi različitih odnosa komonomernih komponenti (NiPAAm/IK: 100:0, 99:1, 98:2 i 97:3), pri brzini doze od 3 K Gy/h do ukupne doze od 48 kGy. Dobijeni rezultati ukazuju da sa porastom udela IK dolazi do porasta kapaciteta bubrenja, difuzionog koeficijenta, dok temperatura faznog prelaza raste od 33 °C za PNiPAAm hidrogel do 36 °C za uzorak sa najvećim udelom IK. Ista grupa istraživača ispitala je uticaj pH-vrednosti na kapacitet bubrenja, i pokazala da porast pH-vrednosti dovodi do porasta ravnotežnog stepena bubrenja (Caykara T. i sar. 2004a; Tasdelen B. i sar. 2004a; Tasdelen B. i sar. 2004b; Tasdelen B. i sar. 2005; Caykara T. i sar. 2004b; Karadag E. i sar. 2001; Abd El-Mohdy H.L. i Safrany A. 2008; Safrany A. i Wojnarovits L. 2003).

#### 2.4.5. Radiolitička sinteza nanokompozitnih sistema

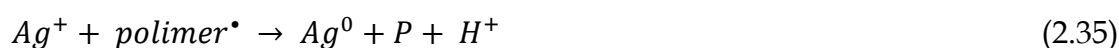
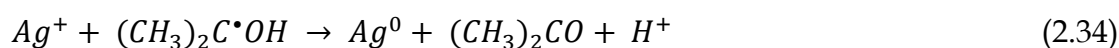
Među brojnim metodama koje se danas koriste za sintezu nanočestica, kao vrlo pogodan pokazao se radiolitički način sinteze kako u rastvoru, tako i u nanokompozitnim materijalima tipa polimer/metal. Ideja o upotrebi zračenja visokih energija (između ostalih i gama zračenja) za sintezu nanočestica i nanokompozitnih sistema razvila se u cilju lakše modifikacije, poboljšanja biokompatibilnosti i homogenije raspodele nanočestica unutar materijala (Krklješ A. doktorska disertacija, 2009). Kačarević-Popović i saradnici u svojim istraživanjima bavili su se razvojem i optimizacijom radiolitičke metode sinteze za kreiranje nanokompozitnih sistema na bazi hidrogelova i nanočestica srebra i zlata sintetisanih za biomedicinsku primenu. Kao hidrogelovi korišćeni su PVP, PVA, PHEMA, IK, EGDMA i PNiPAAm. Utvrđeno je da je izabrana metoda sinteze pogodna kako za sintezu polimernih matrica (hidrogelova), tako i za *in situ* formiranje nanočestica srebra unutar polimernih mreža. Sintetisane nanočestice srebra su stabilne, očekivanog sfernog oblika sa površinski centriranom kubnom (*fcc*) strukturom i prečnikom između 5 i 10 nm. Ispitivanjem otpuštanja jona srebra u fiziološkim uslovima utvrđeno je da su sintetisani sistemi pogodni za upotrebu u medicini, jer omogućavaju kontinuirano otpuštanje srebra u dužem vremenskom periodu. Pod dejstvom gama zračenja, Radosavljević i saradnici uspešno su sintetisali i nanočestice zlata u prisustvu poli(vinil alkohola). Dobijene sferne nanočestice su stabilne u dužem vremenskom periodu, sa prečnikom u opsegu od 2 do 12 nm, bez prisustva aglomerata većih dimenzija (Kačarević Popović Z. i sar. 2010; Kačarević Popović Z. i sar. 2007; Radosavljević A. i sar. 2012).

U ovom radu, radijaciono-hemijskom metodom izvedena je *in situ* sinteza nanočestica srebra unutar umreženih polimernih matrica (hidrogelova), takođe dobijenih pod dejstvom gama zračenja. Proces *in situ* inkorporacije nanočestica srebra u polimernu matricu započinje bubrenjem hidrogelova u rastvoru srebro nitrata određene koncentracije do uspostavljanja ravnoteže. Tako nabubreo sistem se izlaže dejstvu gama zračenja, a s obzirom da se celokupna energija

zračenja apsorbuje u rastvaraču, to za posledicu ima formiranje primarnih proizvoda radiolize vode (Belloni J. i sar. 1998; Henglein A. 1993; Henglein A. i sar. 1998; Naghavi K. i sar. 2010). Formiraju se identični radikali kao i u procesu u kome dolazi do formiranja polimerne mreže. U zavisnosti od sastava reakcionog sistema i podešavanjem eksperimentalnih uslova, moguće je odabrati tačno određene redukujuće vrste, koja će jone metala prevesti u nulto valentno stanje tj. u atome. Hidratirani elektroni i vodonikovi radikali predstavljaju redukujuće vrste, dok hidroksilni radikali imaju snažnu sposobnost oksidacije. Imajući u vidu da je u procesu sinteze nanočestica cilj redukcija jona, oksidujuće reakcione vrste predstavljaju smetnju koja može poremetiti ravnotežu sistema. Iz tog razloga je potrebno ukloniti neželjene vrste iz sistema dodatkom pogodnog hvatača radikala. Za uklanjanje oksidujućih vrsta iz sistema u ovom radu je korišćen 2-propanol koji  $\text{OH}^\bullet$  radikale prevodi u radikale alkohola (Krkleš A. doktorska disertacija, 2009):



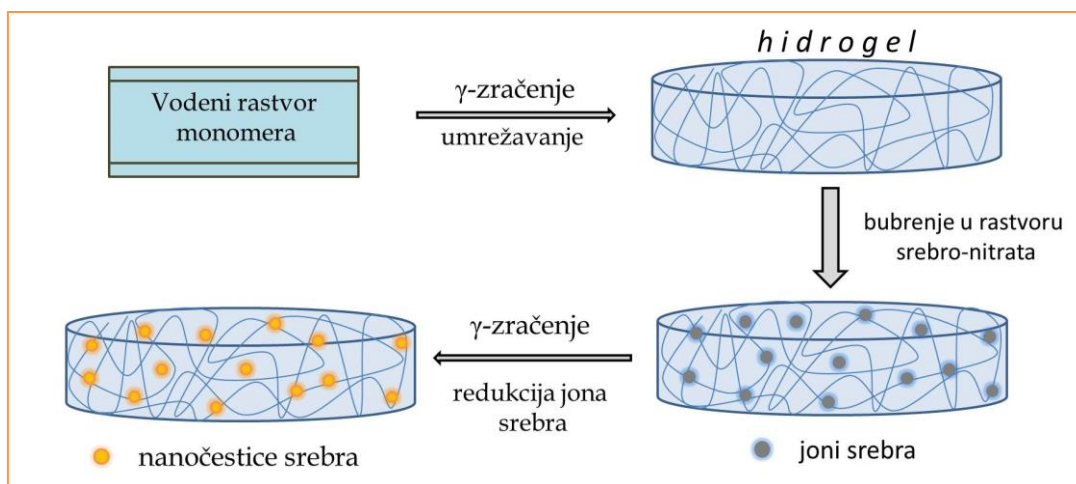
Na osnovu toga, može se zaključiti da se redukcija jona srebra izvodi preko sledećih redukujućih vrsta: hidratiranih elektrona, radikala 2-propanola i polimernih radikala. U tom slučaju, redukcija  $\text{Ag}^+$ -jona se odigrava po sledećim reakcijama:



Među prikazanim reakcijama redukcije jona srebra, najveći broj neutralnih atoma srebra nastaje u reakciji sa hidratiranim elektronima, koji imaju najveći efikasni presek zahvata (jed. 2.33) (Kumar M. i sar. 2005; Mulvaney P. i Henglein A. 1990). Nastali atomi metala pokazuju tendenciju spajanja u oligomere koji zatim prerastaju u veće klastere.



Na veličinu nanočestica se može uticati dodatkom različitih liganada, surfaktanata ili molekula polimera koji poseduju grupe sa velikim afinitetom prema metalima. Ove grupe intereaguju sa atomima metala na površini klastera, sprečavajući na taj način njihovo spajanje i dalji rast, što doprinosi dobijanju nanočestica odgovarajućih dimenzija. Oblik, veličina i raspodela veličina nastalih nanočestica zavise od tipa polimera, vrste rastvarača, pH-vrednosti rastvora i brzine apsorbovane doze (Belloni J. i Mostafavi M. 2001; Zhang Y. i sar. 2014; Safrany A. i Wojnarovits L. 2003; Krstić J. i sar. 2014b; Strauss P. i sar. 1998; Krklješ A. i sar. 2007b; Lugao A. i Malmonge S.M. 2001). Šematski prikaz procesa sinteze Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita prikazan je na Slici 2.9.



**Slika 2.9.** Šematski prikaz dobijanja nanokompozita metodom gama zračenja.

#### 2.4.6. Prednosti radiolitičke metode

Pored brojnih „klasičnih“ hemijskih metoda sinteze, novija istraživanja bazirana su na ispitivanju potencijala radijaciono-hemijske metode, bilo da se radi o sintezi polimernih matrica ili nanočestica. Već od prvog procesa koji se

dešava prilikom izlaganja sistema dejstvu zračenja visoke energije, tj. od procesa inicijacije, mogu se uočiti brojne prednosti koje ovaj metod ima u odnosu na konvencionalne metode sinteze. S obzirom da je inicijator energija, smatra se da je stupanj inicijacije homogen proces koji je moguće izvesti u širokom opsegu reakcionih uslova. Eksperimentalno je čak pokazano da je kod nekih monomera u čvrstom stanju to i jedini način inicijacije koji je moguće izvesti. Radiolitički metod predstavlja relativno jeftin i brz način sinteze čije je izvođenje lako kontrolisati. Promenom ukupne apsorbovane doze, kao i promenom brzine doze moguće je kreirati materijal željenih fizičko-hemijskih i mehaničkih karakteristika, jer su uticaji ovih parametara na neka osnovna svojstva već teorijski objašnjeni i eksperimentalno ispitani. Uzimajući u obzir sve do sada navedeno, s pravom se može reći da radijaciono-hemijska metoda zaista potpada pod „čiste“ tehnologije (*eng. green technologies*), (Sharma V. i sar. 2009; Krklješ A. doktorska disertacija, 2009) jer omogućava sintezu bez upotrebe dodatnih hemijskih agenasa (umreživači, inicijatori, inhibitori, katalizatori), čime se eliminiše problem njihovog eventualnog uklanjanja na kraju procesa. Takođe, sve više se ispituje i upotreba zračenja visoke energije (naročito gama zračenja) u cilju sinteze kompozitnih i nanokompozitnih materijala, jer se dobija homogen materijal uniformnih karakteristika. Kako je to jedan od osnovnih zahteva koji kompozitni materijali moraju ispuniti kako bi se uočio efekat poboljšanja svojstava, može se reći da je radiolitički metod odgovarajući metod pri sintezi ovih sistema. Takođe je važno naglasiti da se na osnovna svojstva nanočestica (veličinu i raspodelu) može uticati promenom parametara u procesu zračenja (ukupna apsorbovana doza i brzina doze). Sa stanovišta biomedicinske primene, možda i najvažnija prednost ovog načina sinteze jeste mogućnost sinteze i sterilizacije materijala u jednom tehnološkom koraku (Krklješ A. doktorska disertacija, 2009).

## 2.5. Mogućnosti primene Ag/hidrogel nanokompozita

Nanokompozitni sistemi na bazi nanočestica srebra i polimernih matrica (hidrogelova), sintetisani u ovom radu, imaju veliku potencijalnu primenu kao antibakterijski biomaterijali. Upotreba hidrogelova za površinsku dostavu aktivnih supstanci (u ovom slučaju  $\text{Ag}^+$ -jona) dovela je do povećanog interesovanja i ispitivanja mogućnosti njihove primene za dostavu lekova kožnim, oftamološkim, vaginalnim ili rektalnim putem. Pored spoljašnje primene, ovi sistemi se mogu primenjivati i u rekonstruktivnoj hirurgiji, urologiji, i kao ekspanteri tkiva i druge vrste mekotkivnih implanata. Za urološke primene posebno su značajne pH- i temperaturno-osetljive antibakterijske prevlake hidrogelova sa inkorporiranim aktivnim agensima, koje su rezistentne na kolonizaciju bakterija (Galaev I. i Mattison B. 1999; Jovanović Ž. i sar. 2012; Vimala K. i sar. 2009; Boonkaew B. i sar. 2014a; Boonkaew B. i sar. 2014b; Ahearne M. i sar. 2008; Rattanuengsrikul V. i sar. 2009; Wijnhoven S.W.P. i sar. 2009). Ovo svojstvo daje mogućnost prevencije i redukovanja infekcija urinarnog trakta koje su čest problem prilikom upotrebe katetera u bolničkim uslovima (Alshehri S.M. i sar. 2016; Safdar M.D.N. i sar. 2016). S druge strane, pH- i temperaturno-osetljivi antibakterijski nanokompoziti imaju značajnu potencijalnu primenu i u ginekologiji kao inteligentni mikrobicidni sistemi osetljivi na promenu okruženja, za prevenciju seksualno prenosivih bolesti (uključujući i HIV) (Rohan L.C. i sar. 2007; Stanirowski P.J. i sar. 2015). Pored toga, s obzirom da sintetisani hidrogel nanokompoziti imaju potencijalno svojstvo prelaska iz biološki neadhezivnih u adhezivna stanja, mogu da fizičkim odstranjivanjem redukuju sadržaj bakterija na inficiranoj koži dajući dodatno antibakterijsko svojstvo oblogama za rane (Alarcon C.H. i sar. 2005; Shepherd J. i sar. 2010; Zhao T. i sar. 2011). U svetlu trenutnih poteškoća rešavanja problema kliničkih infekcija, razvoj sistema koji odgovaraju na biološke entitete je veoma poželjan zadatak i predstavlja izazov u istraživačkom radu. Pored toga, eskalacija učestalosti bakterijskih infekcija na globalnom nivou, posebno u hroničnim ranama je problem koji zahteva



značajna unapređenja postojećih terapija. Posebnu masovnu grupu hroničnih rana predstavljaju ulceracije dijabetesnih stopala (*eng. diabetic foot ulcer - DFU*). Naime, WHO je ustanovila da je u 2014. godini globalna prevalenca *Dijabetes Mellitus-a* u Evropi oko 9% među odraslima starijim od 18 godina. Ljudska i ekonomska cena ove epidemije je ogromna. Sve ovo rezultuje povećanjem komplikacija dijabetesa. Među njima ulceri dijabetesnih stopala (DFU) obuhvataju 9 miliona dijabetesnih pacijenata u EU i prouzrokuju duže hospitalizacije u odnosu na druge komplikacije dijabetesa. S druge strane, pojava bakterija rezistentnih na antibiotike je dovela do potrebe za novim antimikrobnim vrstama i sredstvima. **Zato su nova antimikrobna rešenja, kao što su sintetisani Ag/poli(N-izopropilakrilamid-ko-itakonska kiselina) nanokompoziti, od velikog značaja kako za pacijente koji boluju od Diabetes Mellitus-a, tako i za druge biomedicinske primene koje su vezane za pojavu bakterijskih infekcija, što je navelo autora ovog rada da se posveti istraživanjima u ovoj oblasti.** Imajući u vidu da ipitivani sistemi do sada nisu bili predmet istraživanja, očekuje se da će rezultati do kojih se došlo u okviru ove doktorske disertacije doprineti proširenju znanja i daljem razvoju ispitanih sistema, sa ciljem da se ubrza put od kliničkih i laboratorijskih istraživanja do primene u konkretnoj kliničkoj praksi.

# *Poglavlje II*

## *Eksperimentalni deo*

### 3. Eksperimentalni deo

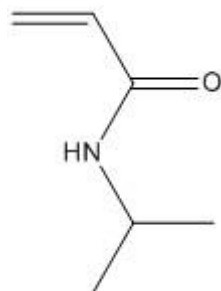
#### 3.1. Materijali

Za sintezu i karakterizaciju ispitivanih sistema korišćeni su sledeći materijali:

- *N*-izopropilakrilamid (*NiPAAm*) (*Sigma Aldrich*)
- itakonska kiselina (*IA*) (*Across Organic*)
- benzen (*J.T. Baker*)
- *n*-heksan (*J.T. Baker*)
- srebro-nitrat (*Merck*)
- 2-propanol (*Merck*)
- toluen (*J.T. Baker*)
- kalijum-hidrogenfosfat (*Kemika*)
- kalijum-dihidrogenfosfat (*Kemika*)
- fosforna kiselina (*Kemika*)
- natrijum-hidroksid (*Sigma Aldrich*)
- natrijum-acetat (*Lachner*)
- sirćetna kiselina (*Zorka Pharma*)
- simulirana telesna tečnost (*SBF rastvor*)
- argon gas (*Messer Tehnogas*)
- destilovana voda (*4D-iz MiliQ sistema*).

*N*-izopropilakrilamid (*NiPAAm*) je derivat akrilamida (Slika 3.1). To je bela kristalna supstanca lako rastvorna u vodi, gde lako i brzo podleže reakcijama polimerizacije preko slobodnih radikala što daje mogućnost dobijanja proizvoda velike molarne mase (Pelton R. 2000). U ovom radu korišćen je monomer proizvođača Sigma Aldrich sledećih karakteristika:

- bruto formula:  $C_6H_{11}NO$
- molarna masa: 113,16 g/mol
- temperatura topljenja: 33,18 °C
- stepen čistoće: 99%

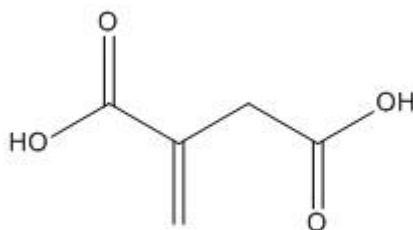


**Slika 3.1.** Strukturna formula *N*-izopropilakrilamida.

Pre upotrebe NiPAAm je prekrystalisan u smeši *n*-heksan/benzen (75/35), a zatim osušen u vakuumu do konstantne mase. Prinos monomera bio je  $83 \pm 5\%$ .

*Itakonska kiselina (IK)* je nezasićena dikarbonska organska kiselina rastvorna u vodi. Ima dvostruku vezu u konjugovanom položaju u odnosu na karboksilnu grupu i metilensku grupu koja se aktivira drugom karboksilnom grupom (Slika 3.2). Zahvaljujući specifičnoj strukturi itakonska kiselina i njeni derivati mogu da učestvuju u reakcijama polimerizacije, kopolimerizacije i polikondenzacije. Dobija se fermentacijom ugljenih hidrata. Prilikom sinteze korišćena je itakonska kiselina firme Across Organic sledećih karakteristika:

- bruto formula:  $C_5H_6O_4$
- molarna masa: 130,10 g/mol
- temperatura topljenja: 167 °C
- konstante disocijacije:  $pK_{a1}=3,85$  i  $pK_{a2}= 5,44$
- stepen čistoće: p.a.



**Slika 3.2.** Strukturna formula itakonske kiseline.

*Simulirana telesna tečnost (SBF)* sadrži neorganske jone u koncentraciji koja odgovara krvnoj plazmi čoveka. SBF ili Kokubo rastvor je pripreman od supstanci koje su date u Tabeli 3.1. Supstance su najpre osušene na temperaturi od 50 °C, u trajanju od 12 h, a zatim su rastvorene u prečišćenoj destilovanoj vodi uz stalno mešanje, na temperaturi od 36,5 ± 0,5 °C, prema redosledu datom u Tabeli 3.1. Na samom kraju pripreme rastvora, titracijom 1M HCl, podešena je pH-vrednost rastvora na 7,40 (Kokubo T. i sar. 1990).

**Tabela 3.1.** Reagensi za pripremanje SBF rastvora (pH=7,40).

Redni broj	Reagens	Potrebne količine za 250 mL SBF-a
1	4D Voda	187,5 mL
2	NaCl	1,9990 g
3	NaHCO <sub>3</sub>	0,0875 g
4	KCl	0,0560 g
5	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0,0570 g
6	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0762 g
7	1M HCl	10 mL
8	CaCl <sub>2</sub>	0,0695 g
9	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,0177 g
10	(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>	1,5143 g
11	1M HCl	

### 3.2. Sinteza hidrogelova i nanokompozita

U ovom radu sintetisane su homo- i kopolimerne matrice hidrogelova na bazi *N*-izopropilakrilamida (NiPAAm) i itakonske kiseline (IK), kao i nanokompozitni sistemi (hidrogel nanokompoziti) sintetisanih polimernih matrica i nanočestica srebra. Za pripremu rastvora korišćena je voda dobijena prečišćavanjem destilovane vode pomoću Milli-Q Water sistema (Milipore Corporations) koja po čistoći odgovara četiri puta destilovanoj vodi. Rastvori su, radi uklanjanja kiseonika, zasićeni argonom (Ar) visoke čistoće (99,5%) proizvođača Messer Tehnogas. Svi sistemi su izlagani dejstvu gama zračenja na kobaltnom izvoru <sup>60</sup>Co.

### 3.2.1. Sinteza polimernih matrica (hidrogelova)

Sintetisane su dve serije polimernih matrica (hidrogelova) na bazi *N*-izopropilakrilamida (NiPAAm) i itakonske kiseline (IK).

Prva serija je obuhvatila sintezu homopolimernih matrica *N*-izopropilakrilamida (NiPAAm) u koncentracijama 5 mas.%, 10 mas.% i 15 mas.%. Umrežavanje polimerne matrice je izvedeno dejstvom gama zračenja pri brzini doze od 0,5 kGy/h, do ukupno apsorbovane doze koja je iznosila 25 kGy.

Druga serija je obuhvatila sintezu kopolimernih hidrogelova *N*-izopropilakrilamida i itakonske kiseline (P(NiPAAm/IK)) u sledećim masenim odnosima: 100/0,0; 98,5/1,5; 97,0/3,0 i 95,5/4,5, gde prvi broj predstavlja maseni udeo NiPAAm-a, a drugi maseni udeo IK. Uzorci su pripremljeni tako što je u 10 mas.% vodeni rastvor NiPAAm-a dodavana određena masa IK kako bi se dobili uzorci željenih masenih odnosa. Umrežavanje polimerne matrice je izvedeno pod dejstvom gama zračenja pri brzini doze od 0,5 kGy/h, do ukupno apsorbovane doze koja je iznosila 50 kGy. Veća doza zračenja u drugoj seriji uzoraka je odabrana kako bi se obezbedilo dobijanje polimernih mreža poboljšanih svojstava, s obzirom da je u ovoj seriji izvedena kopolimerizacija sa IK, koja svojom hidrofilnošću pogoršava mehanička svojstva.

Sinteza uzoraka se sastojala od pripreme vodenih rastvora monomera određene koncentracije ili kopolimernih rastvora željenih masenih odnosa. Rastvori su, radi uklanjanja kiseonika, produvavani argonom u trajanju od 30 minuta, a zatim izliveni u posebno pripremljene kalupe (dve staklene ploče, međusobno razdvojene gumenim crevom debljine 4 mm). Ovako pripremljeni kalupi izloženi su dejstvu gama zračenja na sobnoj temperaturi. Dobijeni hidrogelovi su potpuno transparentni, a po završetku reakcije su potopljeni u vodu radi uklanjanja neproreagovanih materija, pri čemu je voda menjana svakodnevno tokom 7 dana.

### 3.2.2. Sinteza nanokompozita

Priprema nanokompozitnih sistema izvedena je *in situ* metodom redukcije jona srebra u polimernoj matrici. Kserogelovi, pripremljeni po gore opisanoj proceduri i osušeni do konstantne mase, su potopljeni u rastvor srebra nitrata određene koncentracije, ostavljeni da bubre do ravnotežnog stanja, a zatim izloženi dejstvu gama zračenja. Bubljenje u rastvoru srebra nitrata je izvedeno u zatvorenim ćelijama u mraku na sobnoj temperaturi i u trajanju od 48 h. Svaki od tri sintetisana homopolimerna uzorka (PNiPAAm hidrogel) je korišćen kao matrica za sintezu nanokompozita sa tri različite polazne koncentracije srebra nitrata,  $5 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-2}$  i  $5 \times 10^{-2}$  mol/dm<sup>3</sup> (tj. 5 mM, 10 mM i 50 mM). Nakon toga, sintetisani su i nanokompoziti kopolimernih matrica (P(NiPAAm/IK)) pri čemu je početna koncentracija srebra nitrata iznosila  $1 \times 10^{-2}$  mol/dm<sup>3</sup>. Na osnovu početne koncentracije jona srebra izračunate su ukupne doze zračenja potrebne za kompletnu redukciju Ag<sup>+</sup>-jona (Tabela 3.2).

*Tabela 3.2. Koncentracije srebra nitrata i apsorbovane doze potrebne za redukciju Ag<sup>+</sup>-jona.*

<i><math>c(\text{AgNO}_3) \times 10^3,</math> mol/dm<sup>3</sup></i>	<i>Apsorbovana doza, kGy</i>
<b>5</b>	<b>9</b>
<b>10</b>	<b>18</b>
<b>50</b>	<b>90</b>

Dobijeni hidrogel nanokompoziti su transparentni, žute do braon boje u zavisnosti od koncentracije nanočestica unutar polimerne matrice.

### 3.3. Karakterizacija hidrogelova i nanokompozita

*Određivanje mase neprореаgоvаlih materija* – U cilju određivanja neprореаgоvаlih materija, uzorci sintetisanih hidrogelova su potopljeni u vodu na sobnoj temperaturi. Zamena i prikupljanje vode je trajalo sedam dana nakon čega su gelovi izvađeni da se, na sobnoj temperaturi, osuše do konstantne mase.

Prikupljena voda je u erlenmajeru uparena do suva na 60 °C, a sadržaj neproreagovalih materija je izračunat iz razlike masa erlenmajera pre i posle uparavanja.

*Određivanje udela gel faze u polimernim matricama* - Nakon završenog procesa sinteze, disk hidrogela prečnika 10 mm i debljine 4 mm je isečen i ostavljen da se osuši na sobnoj temperaturi do konstantne mase. Izmerena mu je masa i nakon toga je potopljen u destilovanu vodu radi uklanjanja neproreagovalih materija. Voda je menjana svakodnevno u periodu od sedam dana, posle čega su diskovi izvađeni, na isti način osušeni i izmereni. Maseni udeo gel faze je određen prema sledećoj jednačini:

$$W_g \% = \frac{m_{k2}}{m_{k1}} * 100 \quad (3.1)$$

gde su  $m_{k2}$  i  $m_{k1}$  mase kserogelova posle i pre procesa ekstrakcije, redom.

*Određivanje udela IK u kopolimernim matricama* - Elementarna analiza kopolimernih matrica izvedena je na uređaju *LECO Elemental Analyzer CHNS-628*. Uzorci su ispitani u potpuno suvom stanju (kserogel), a kao rezultat dobijeni su podaci o sadržaju C i N. Na osnovu procenata sadržaja ovih elemenata izračunat je udeo svake komonomerne komponente.

*Određivanje gustine sintetisanih uzoraka* - Gustina kserogelova je određena piknometrom, pri čemu je kao nerastvarač korišćen toluen. Vrednost gustine kserogelova je izračunata prema sledećoj jednačini:

$$\rho_{xg} = \frac{m_k \cdot \rho_T}{m_1 + m - m_2} \quad (3.2)$$

gde je  $m_k$  masa kserogela,  $m_1$  masa piknometra napunjenog toluenom,  $m_2$  masa piknometra sa toluenom i uzorkom, a  $\rho_T$  gustina toluena ( $\rho_T = 0,87 \text{ g/cm}^3$ ).

### 3.3.1. Fizičko-hemijska karakterizacija hidrogelova i nanokompozita

*Kinetika bubrenja* - Bubrenje uzoraka je praćeno u destilovanoj vodi i rastvoru SBF-a. Svi procesi bubrenja su izvedeni na isti način: uzorci kserogelova su pre početka eksperimenta mereni, potapani u 50 ml medijuma za bubrenje i zatim u pravilnim vremenskim intervalima vađeni iz medijuma i ponovo mereni.



Proces je ponavljan do postizanja konstantne mase, tj. do stanja ravnoteže. Step en bubrenja ( $SD$ ) i ravnotežni step en bubrenja ( $SD_{eq}$ ) su izračunati korišćenjem jednačine 2.1 date u teorijskom delu. Proces je praćen gravimetrijski na dve temperature (25 °C i 37 °C). Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna merenja.

*Temperaturna osetljivost* - Temperatura faznog prelaza, kao osnovna karakteristika temperaturno osetljivih sistema, je određena gravimetrijski. Hidrogelovi su bubreni u vodi u temperaturnom opsegu između 12 i 58 °C, sa korakom od 3 °C. Uzorci su ostavljeni da bubre do ravnoteže, nakon čega je korišćenjem jednačine 2.1 izračunat ravnotežni step en bubrenja za svaku temperaturu u merenom opsegu. Diferenciranjem krivih bubrenja dobijena je tačna vrednost temperature na kojoj dolazi do promene zapremine, odnosno temperatura faznog prelaza za svaki uzorak.

*Kinetika kontrakcije* - Kontrakcija sintetisanih sistema praćena je u destilovanoj vodi na 48 °C. Uzorci koji su prethodno nabubreni do ravnoteže su potopljeni u destilovanu vodu na temperaturi od 48 °C, a zatim su u određenim vremenskim intervalima (na svaka 3 minuta) vađeni i merene su im mase. Na osnovu ovih podataka izračunat je step en kontrakcije i kinetička konstanta kontrakcije.

*pH osetljivost* - U cilju ispitivanja pH osetljivosti kopolimernih hidrogelova i odgovarajućih nanokompozita, proces bubrenja je praćen u puferskim rastvorima različitih pH-vrednosti: pH=2,2 ( $H_3PO_4/KH_2PO_4$ ), pH=4,5 ( $CH_3COOH/CH_3COONa$ ) i pH=6,8 ( $NaOH/KH_2PO_4$ ). Proces bubrenja kserogelova je praćen gravimetrijski na temperaturama od 25 °C i 37 °C, a dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna merenja.

### 3.3.2. Morfološke karakteristike hidrogelova i nanokompozita

*Skenirajuća elektronska mikroskopija* - Unutrašnja morfologija sintetisanih sistema je ispitana snimanjem poprečnih preseka uzoraka metodom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM analiza) na uređaju *JEOL JSM-6610LV*. U

procesu pripreme uzorci su nabubreni u vodi na 25 °C do stanja ravnoteže, zamrznuti na temperaturi od -20 °C u trajanju od dva dana, a zatim liofilizovani na uređaju *Martin Christ Freeze-dryer Alpha 1-2 LDplus*. Proces liofilizacije je izveden na temperaturi od -32 °C, pri vakuumu od 0,310 mbar u trajanju od 48 h. Pre snimanja uzorci su potopljeni u tečni azot, presečeni, nakon čega su poprečni preseki uzoraka napareni slojem zlata (oko 15 nm) u *LEICA SCD005* neparivaču.

*Mikro-kompjuterizovana topografija ( $\mu$ -CT)* - Ispitivanje poroznosti i unutrašnje morfologije sintetisanih sistema rađeno je na uređaju *X-ray Micro-CT SkyScan 1173*. Snimana je unutrašnjost uzoraka koji su prethodno nabubreni u vodi na 25 °C, a zatim liofilizovani na način opisan u pripremi uzoraka za SEM analizu.

### 3.3.3. Karakteristike nanočestica srebra

*Spektroskopija u ultraljubičastoj i vidljivoj oblasti spektra (UV-Vis)* - Apsorpcioni spektri nanokompozita su snimljeni na *Thermo Fisher Scientific Evolution 600 UV-Vis spektrofotometru*, u opsegu talasnih dužina 300-800 nm. Snimanje je izvršeno direktnim postavljanjem uzorka (uzorci u nabubrelom stanju, debljine između 0,1 mm - 0,5 mm) na optički put svetlosnog snopa.

*Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)* - Snimanje uzoraka je izvedeno na instrumentu *JEOL 100CX* (radni napon 100 kV). Kserogelovi su samleveni u kugličnom mlinu, nakon čega su dispergovani u vodi i nakapavani na bakarne gridove prevučene slojem ugljenika.

### 3.3.4. Interakcije između nanočestica i polimerne matrice

*Infracrvena spektroskopija sa Fourier-ovom transformacijom (FTIR)* - U ovom radu urađena je FTIR analiza sintetisanih polimernih matrica i odgovarajućih nanokompozita. Sprašeni uzorci su pomešani sa kalijum bromidom (KBr, Sigma-Aldrich, Nemačka) u odnosu 1:100, a zatim presovani kako bi se dobile KBr pločice. Snimanja su izvedena na instrumentima *Bomem MB 100*

*Spektrofotometar i Thermo Electron Corporation Nicolet 380 Spektrofotometar.* Obrada i dalja analiza spektara izvedena je u softverskim paketima WinBomem i Origin Microcal 8.0.

*Difrakcija rendgenskih zraka (XRD)* - Mikrostrukturna analiza kserogelova za Ag/PNiPAAm i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozitne sisteme ispitana je difrakcijom rendgenskih zraka (Cu  $K_{\alpha 1}$  zračenje) na *Bruker D8 Advance difraktometru*. Snimanje difraktograma je izvedeno u  $2\theta$  opsegu od  $10^{\circ}$ - $85^{\circ}$ , sa vremenom ekspozicije od 10 s i korakom od  $0,05^{\circ}$ .

*Fotoelektronska spektroskopija rendgenskih zraka (XPS)* - XPS analiza je izvedena snimanjem spektara na instrumentu *SPECS Systems* sa *XP50M* izvorom X-zračenja za *Focus 500* i *PHOIBOS 100/150* analizatorom. Korišćeno je  $K_{\alpha}$  zračenje aluminijuma energije 1486,74 eV na 12,5 kV i 32 mA. Sva merenja su sprovedena u opsegu pritiska od  $3 \times 10^{-8}$  -  $2 \times 10^{-9}$  mbar sa konstantnom PAS energijom od 40 eV u FAT režimu rada. Pomeranja spektralnih linija korigovana su pomoću referentne vrednosti C 1s nivoa od 284,5 eV. Kako bi se izbegli efekti kontaminacije uzorka u kontaktu sa spoljašnjom sredinom, XPS analizi prethodilo je izlaganje uzorka snopu jona Ar energije 2 kV i 76  $\mu$ A u trajanju od 10 s. Dobijeni spektri su obrađivani pomoću *SpecsLab data analysis* i *CasaXPS* softverskih paketa. Na osnovu položaja spektralnih maksimuma identifikovani su elektronski nivoi prisutnih elemenata i moguća jedinjenja koja ti elementi grade koristeći baze podataka NIST.

### 3.3.5. Mehanička svojstva hidrogelova i nanokompozita

Mehanička svojstva sintetisanih sistema su ispitana u statičkim i dinamičkim uslovima.

Merenja u statičkim uslovima su izvedena na termo-mehaničkom analizatoru *TMA Q400 EM*. Hidrogelovi u ravnotežnom nabubrelom stanju (prečnika 6 mm i debljine 3 mm) su najpre temperirani na  $37^{\circ}\text{C}$ , a zatim izloženi dejstvu sile kompresijom u cilju dobijanja zavisnosti napon-deformacija. Primenjena sila bila je u opsegu od 0,005 do 0,8 N, sa korakom od 0,04 N/min.

Mehanička svojstva hidrogelova u dinamičkom modu su praćena na mehaničkom spektrometru *Rheometrics 605*. Korišćeni su uzorci prečnika 25 mm i debljine 4 mm, prethodno nabubrela do stanja ravnoteže u destilovanoj vodi na sobnoj temperaturi. Uzorci su izlagani konstantnoj deformaciji na smicanje od 25%, pri promeni frekvencije u intervalu od 0,1 do 100 rad/s.

### 3.3.6. Biomedicinski potencijal sintetisanih nanokompozita

*Otpušanje Ag<sup>+</sup>-jona u in vitro uslovima* - Oslobođanje Ag<sup>+</sup>-jona iz hidrogel nanokompozita praćeno je u rastvoru fosfatnog pufera (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) pH- vrednosti 7,4 i na temperaturi 37 °C. Uzorci nanokompozita su, nakon pripreme, u nabubrelom stanju potopljeni u 10 ml rastvora pufera, koji je periodično menjan u određenim vremenskim intervalima u cilju postizanja maksimalnog gradijenta koncentracije. Vremenski intervali promene rastvora pufera nisu bili isti svakog dana. U toku prvog dana, kada se očekuje najveće oslobođanje jona, promena rastvora pufera je bila na svaka dva sata, dok je naredna tri dana rastvor menjan nakon četiri sata. Proces otpuštanja je praćen 4 dana. Pre određivanja koncentracije jona srebra u svaku bočicu je dodato po dve kapi rastvora smeše HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O u odnosu 1:1, kako bi se reakcija oksidacije nanočestica srebra odigrala u potpunosti. Količina otpuštenih jona srebra u rastvorima je merena *Philips PYU UNICAM SP9* atomskim apsorpcionim spektrometrom.

*Antimikrobna svojstva određena difuzionom test metodom* - Za ispitivanje antibakterijskih svojstava Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozitnih hidrogelova korišćen je agar difuzioni test. Petri šolje koje su sadržale 2% hranljivog agara kao osnovnu podlogu su ohlađene do čvrstog stanja, a zatim je nanet sloj top agara koncentracije 0,7%. Suspenzija (208 ml) soja bakterija *Escherichia coli* (ATTC 25922) i *Staphylococcus aureus* (ATTC 25923) starosti 18 h je pomešan sa 15 ml top agara. Nakon očvršćavanja, na površinu su postavljeni diskovi hidrogelova (prečnika 8 mm i debljine 4 mm). Petri šolje su zatim inkubirane na

37 °C u periodu od 48 h, nakon čega su određene zone inhibicije merenjem prečnika u mm.

*Antimikrobna svojstva određena metodom merenja optičke gustine* - Ispitivanje antibakterijskih svojstava metodom merenja optičke gustine (OD metoda) je izvedeno na dve bakterije (*Escherichia coli*, ATTC 25922 i *Staphylococcus aureus*, ATTC 25923). Bakterije su zasejane u ploču sa 24 bunara u po 1ml RPMI medijuma sledećeg sastava: 5% FBS (*eng. Fetal Bovine Serum - FBS*), 1% glutamata, 1% Na piruvata, 4,5 g/L glukoze. Bakterije su zasejane u 3 različite koncentracije: 500000, 100000 i 20000 CFU/ml. Svaka koncentracija bakterija je tretirana istom serijom nanokompozita (Ag/P(NiPAAm/IK)) i odgovarajućim hidrogelovima (P(NiPAAm/IK)). Takođe, za svaki par nanokompozit - hidrogel, ispitan je i kontrolni uzorak koji predstavlja bakterije u medijumu, čiji je vijabilitet (tj. procenat preživljavanja) arbitrarno postavljen na 100%. Ostali vijabiliteti su izraženi kao relativan odnos tj. promena u odnosu na kontrolni vijabilitet. Vijabilitet je određen posle 24 h merenjem intenziteta zamućenja na *TECAN Sunrise* čitaču za mikrotitar ploče na talasnoj dužini od 405 nm. Ukoliko ispitivani uzorak pokazuje antibakterijsku aktivnost zamućenje je manje, a time i intenzitet apsorbance u odnosu na kontrolni uzorak gde se bakterije nesmetano razmnožavaju.

*Citotoksičnost nanokompozita* - Za ispitivanje citotoksičnog efekta korišćena je HaCaT ćelijska linija (zdravi humani keratinociti), dobijena kao poklon od Prof. Andra Jorga, odeljenje za biofiziku, istraživačkog centra Borstel, Leibniz-centar za medicinu i bionauke, Borstel, Nemačka. Nakon odmrzavanja, ćelije su pasażirane tokom 7 dana u vlažnoj atmosferi u inkubatoru na 37 °C i atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>. Za gajenje ćelijske linije korišćen je DMEM medijum (*eng. Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM*), obogaćen sa 10% FBS, 4 g/L glukoze, L-glutaminom (2 mM) i 5000 U/ml penicilina, 5 mg/ml streptomicina. Nakon pripreme, ćelijske linije su zasejane u ploče sa 24 bunara (150000 po bunaru), inkubirane tokom 24 h, nakon čega je medijum odliven, a ćelije tretirane uzorcima nanokompozita i hidrogelova. Inkubacija tj. trajanje tretmana je

iznosilo 24 h, a svi eksperimenti su izvedeni u duplikatu. Pored toga, svaki eksperiment je sadržao i svoju kontrolu - ćelije bez matriksa, koje su se nalazile pod optimalnim uslovima, samo u medijumu. Nakon 24 h inkubacije vijabilitet ćelija je određen primenom Kristal Violet testa. Test je dobio naziv po boji koja se koristi (rastvor Kristal Violet boje u PBS-u u odnosu 1:10). Princip ove metode se zasniva na činjenici da žive ćelije vezuju boju, pa se vijabilitet (tj. procenat preživelih ćelija) određuje na osnovu promene intenziteta boje.

# *Poglavlje III*

## *Rezultati i diskusija*

#### **4. Procena efikasnosti izabrane radijaciono-hemijske metode sinteze**

U ovom radu kao polimerne matrice korišćeni su poli(*N*-izopropilakriamid) (PNiPAAm) i poli(*N*-izopropilakriamid-*ko*-itakonska kiselina) (P(NiPAAm/IK)) hidrogelovi. Sinteza homo- i kopolimernih matrica izvedena je reakcijama polimerizacije i umrežavanja pod dejstvom zračenja visoke energije (gama zračenjem na kobaltnom izvoru  $^{60}\text{Co}$ ). Kako bi se utvrdila efikasnost izabrane metode sinteze i struktura sintetisanih polimernih matrica na bazi NiPAAm-a i IK, određen je procenat neproreagovalih materija, udeo gel faze u polimernim matricama i udeo IK u kopolimernim hidrogelovima.

##### **4.1. Određivanje mase neproreagovalih materija**

Masa neproreagovalih materija je određena za sve uzorke. Rezultati ukazuju na to da je uspešnost sinteze potpuna, jer su uparavanjem vode nakon procesa ekstrakcije dobijene nemerljive mase ostataka, što znači da nema neproreagovalih materija ni u jednom slučaju.

##### **4.2. Određivanje udela gel faze u polimernim matricama**

Udeo gel faze u polimernim matricama je jedno od najvažnijih svojstava na osnovu koga može se proceniti efikasnost upotrebljene metode. Dobijeni rezultati se kreću od 97,3% za homopolimernu matricu 10 mas.% PNiPAAm-a do 94,9% za kopolimernu matricu P(NiPAAm/IK) u odnosu 95,5/4,5 (Tabela 4.1).



Tabela 4.1. Udeo gel faze u polimernim matricama.

<i>P</i> NiPAAm, %	W <sub>g</sub> , %
5	95,5
10	97,3
15	96,8
<i>P</i> (NiPAAm/IK)	W <sub>g</sub> , %
100/0,0	97,3
98,5/1,5	96,8
97,0/3,0	95,3
95,5/4,5	94,9

Kao što se iz Tabele 4.1 može videti, najveća vrednost udela gel faze je dobijena za homopolimernu matricu PNiPAAm-a koncentracije 10 mas.%, što je i bio jedan od razloga zašto je za kopolimerizaciju sa IK odabrana upravo ova koncentracija. S obzirom da se radi o kopolimeru hidrofilnog karaktera, a u skladu sa saznanjima iz literature, očekivalo se smanjenje udela gel faze u kopolimernim uzorcima, što je eksperimentalno i potvrđeno. Odabir PNiPAAm-a sa najvećim udelom gel faze omogućava održavanje udela gela na najvišem mogućem nivou za dati sistem.

### 4.3. Udeo itakonske kiseline u polimernim matricama

Metodom elementarne analize određen je sadržaj C i N u odnosu na početnu masu kserogelova P(NiPAAm/IK). Na osnovu sadržaja ovih elementa izračunat je udeo IK kao komonomerne komponente, a dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 4.2 (Allı A. i Hazer B. 2008).

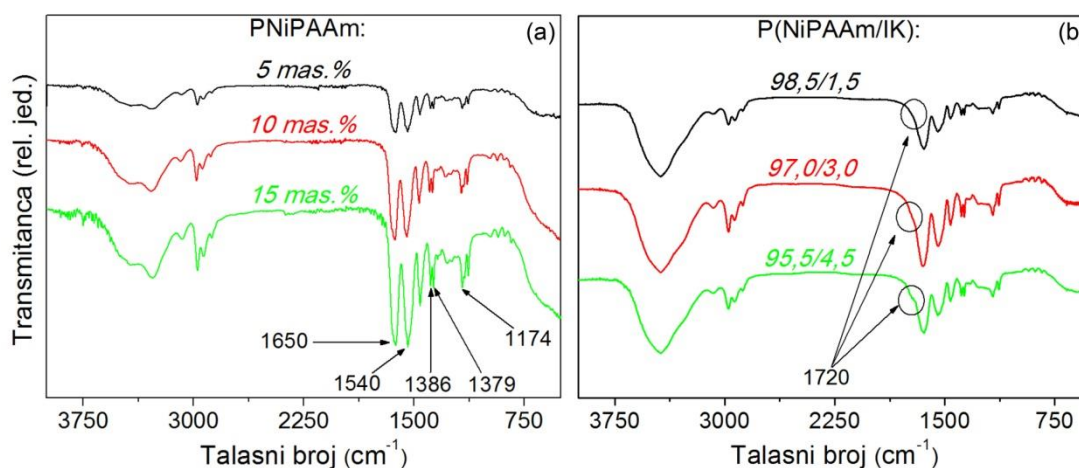
**Tabela 4.2.** Sadržaj itakonske kiseline u P(NiPAAm/IK) hidrogelovima određen elementarnom analizom.

P(NiPAAm/IK)	Elementarna analiza		IK, mas. %	
	N, %	C, %	inicijalna smeša	gel
100/0,0	10,96	56,55	0,0	0,0
98,5/1,5	10,68	55,58	1,5	1,42
97,0/3,0	10,50	55,32	3,0	2,90
95,5/4,5	10,34	55,23	4,5	4,42

Rezultati prikazanih analiza su potvrdili da je izabrana metoda sinteze polimernih matrica pod dejstvom gama zračenja odgovarajuća, jer daje visoke prinose pri željenom odnosu komonomernih komponenti i bez neproreagovanih materija.

#### 4.4. Infracrvena spektroskopija sa Fourier-ovom transformacijom

Korišćenjem metode infracrvene spektroskopije sa Fourier-ovom transformacijom analizirane su homo- i kopolimerne matrice (hidrogelovi) različitog sastava, a dobijeni spektri su prikazani na Slici 4.1.



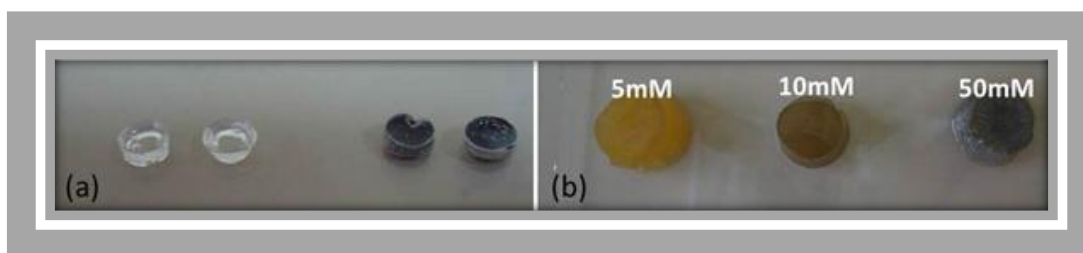
**Slika 4.1.** FTIR spektri homopolimernih (a) i kopolimernih (b) hidrogelova.

Prikazani FTIR spektri svih ispitivanih polimernih matrica su međusobno slični. Pikovi karakteristični za vinilnu grupu PNiPAAm-a (1410, 993, 916 i 918  $\text{cm}^{-1}$ ) na prikazanim spektrima se ne uočavaju, što znači da pri procesu umrežavanja dolazi do raskidanja dvostruke veze. Karakteristična amidna traka I i amidna traka II za NiPAAm koje potiču od C=O istezanja u molekulu se javljaju oko 1650  $\text{cm}^{-1}$  i 1540  $\text{cm}^{-1}$ , redom. Dve tipične trake C-H vibracija skoro istih intenziteta oko 1386 i 1379  $\text{cm}^{-1}$  potiču od vibracija istezanja C-H veze iz  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  grupe. Traka oko 1174  $\text{cm}^{-1}$  potiče od amidne trake III, a široki pik u oblasti od 3700-3100  $\text{cm}^{-1}$  od N-H vibracije istezanja molekula NiPAAm-a (Slika 4.1 (a)). Spektri P(NiPAAm/IK) (Slika 4.1 (b)) pokazuju široku traku u oblasti od 3700-3100  $\text{cm}^{-1}$  što odgovara O-H vibracijama istezanja karboksilne grupe, dok pik na 1720  $\text{cm}^{-1}$  potiče od tipične vibracije karbonilne grupe iz itakonske kiseline (Aixiang Q. i sar. 2007; Milašinović N. i sar. 2012; Jovančić P. i sar. 2015; Liu M. i sar. 2005; Ling Y. i Lu M. 2009). Na osnovu prikazanih FTIR spektara, odnosno na osnovu prisustva i položaja pikova karakterističnih za komonomerne komponente, može se zaključiti da su homo- i kopolimerne matrice NiPAAm-a i IK uspešno sintetisane.

## 5. Optička svojstva sintetisanih sistema

### 5.1. Apsorpcioni spektri nanokompozita

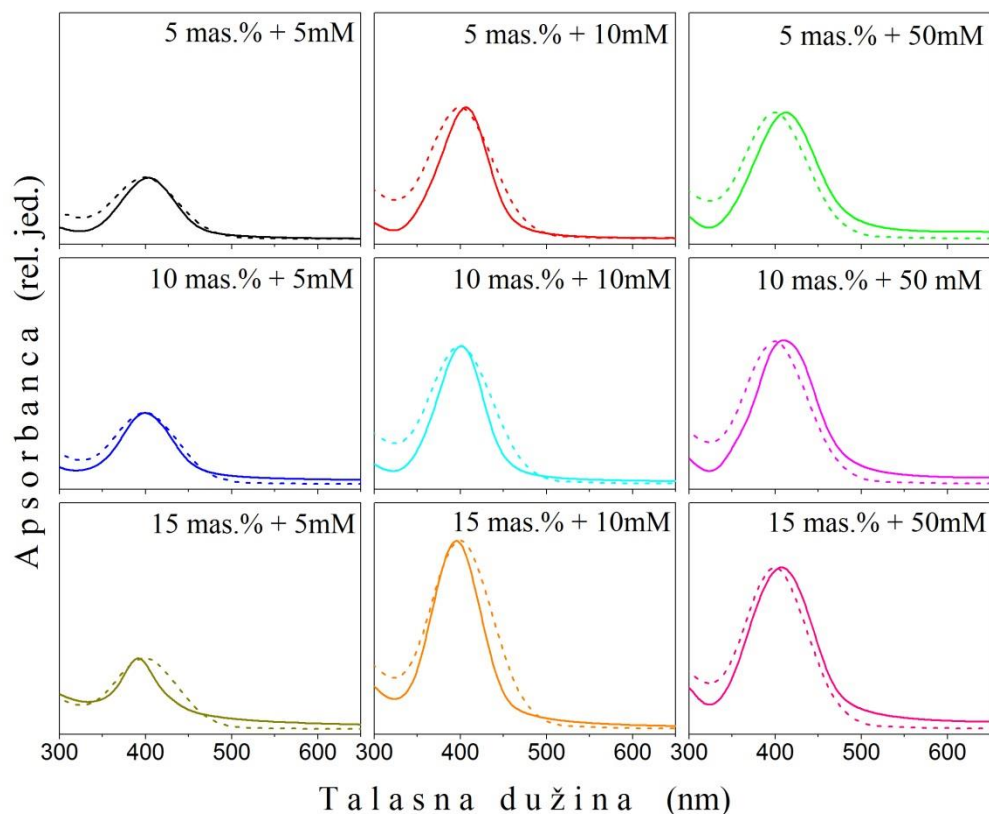
Prva potvrda prisustva nanočestica srebra unutar polimerne mreže je pojava žutog do braon obojenja nakon izlaganja sistema dejstvu gama zračenja, pri čemu intenzitet samog obojenja zavisi od koncentracije inkorporiranih nanočestica. Slika 5.1 prikazuje izgled nanokompozita nakon redukcije jona srebra. Uzorak bez srebra je transparentan, dok nanokompoziti daju različite nijanse obojenja u zavisnosti od koncentracije nanočestica srebra unutar polimerne matrice.



**Slika 5.1.** Izgled uzoraka: PNiPAAm i Ag/PNiPAAm kserogelovi (a) i različite nijanse obojenja Ag/PNiPAAm nanokompozita u zavisnosti od koncentracije  $\text{AgNO}_3$  (mM) (b).

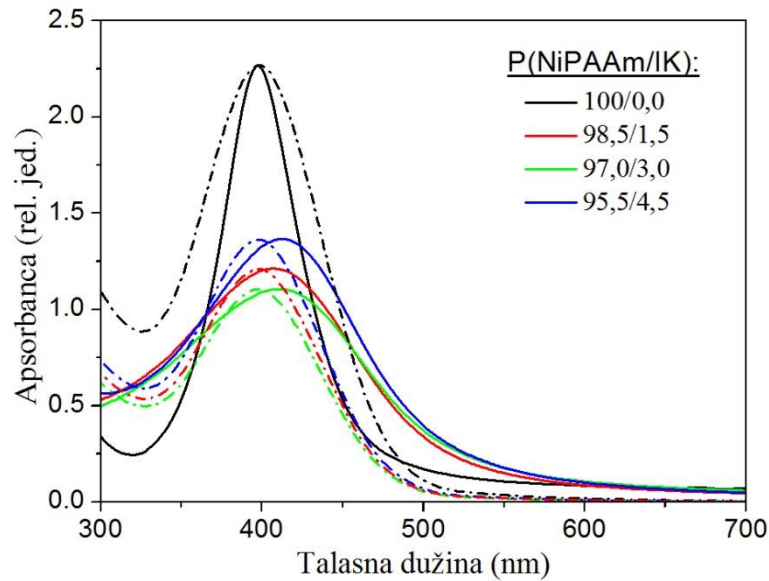
Pojava obojenja je vizuelna metoda kojom se detektuje da se u polimernoj matrici nalaze čestice nanometarskih dimenzija. Međutim, s obzirom da svojstva nanočestica zavise i od oblika, veličine, koncentracije, specifične površine i rastvorljivosti, to je ove parametre potrebno eksperimentalno odrediti. U tu svrhu se koriste različite eksperimentalne metode, a jedna od njih, koja pruža zadovoljavajući broj informacija, je spektroskopija u ultraljubičastoj i vidljivoj oblasti spektra (UV-Vis). Dobijeni apsorpcioni spektri ispitivanih sistema (Slike 5.2 i 5.3) pokazuju karakteristične apsorpcione trake površinskog plazmona u vidljivoj oblasti spektra, sa jasno izraženim maksimumom u oblasti 390-410 nm, na osnovu čega se može zaključiti da se

radi o sfernim česticama nanometarskih dimenzija (Henglein A. 1993; Kelly K.L. i sar. 2003; Mulvaney P. 1996; Mie G. 1908).



**Slika 5.2.** UV-Vis spektri Ag/PNiPAAm nanokompozita (puna linija) i spektri dobijeni iz MiePlot simulacije (isprekidana linija).

Slika 5.2. prikazuje apsorpcijske spektre homopolimernih nanokompozita, na kojoj je u mas.% prikazana koncentracija PNiPAAm polimerne matrice, a u mM početna koncentracija rastvora srebrno-nitrata koji je korišćen za bubrenje hidrogelova prilikom inkorporacije nanočestica srebra. Na prikazanim spektrima uočava se povećanje intenziteta apsorpcionih traka sa porastom koncentracije nanočestica srebra u polimernoj matrici, dok položaj maksimuma ostaje nepromenjen.



**Slika 5.3.** UV-Vis spektri Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita (puna linija) i spektri dobijeni iz MiePlot simulacije (isprekidana linija).

U slučaju Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita, apsorpcioni spektri kopolimernih uzoraka pokazuju šire apsorpcione trake u odnosu na homopolimerni uzorak Ag/PNiPAAm-a, ukazujući na slabiju stabilizaciju, a samim tim i veću mogućnost aglomeracije i dobijanje šire raspodele veličina nanočestica unutar polimerne matrice (Spasojević J. i sar. 2015a; Spasojević J. i sar. 2015b).

## 5.2. Teorijsko modelovanje apsorpcionih spektara i procena veličine inkorporiranih nanočestica srebra

Na osnovu dobijenih apsorpcionih spektara moguće je eksperimentalno odrediti veličinu inkorporiranih nanočestica srebra. U slučaju kada je veličina nanočestica metala manja od talasne dužine ( $\lambda$ ) upadnog zračenja, vrednost poluprečnika ( $r$ ) može da se odrediti sledeće jednačine:

$$r = \frac{v_f}{\Delta\omega_{1/2}} \quad (5.1)$$

gde je  $v_f$  Fermijeva brzina za srebro ( $1,39 \times 10^8$  m/s) i  $\Delta\omega_{1/2}$  je širina apsorpcione trake na poluvisini u jedinicama ugaone frekvencije (eng. *full width at half*

*maximum* - *FWHM*) (Veenas C. i sar. 2009). Na osnovu dobijenih vrednosti (Tabela 5.1) primećeno je da su čestice najmanjih dimenzija dobijene u homopolimernoj matrici sa najvećom koncentracijom PNiPAAm-a (15 mas.%) koja je bubrena u rastvoru srebra nitrata najmanje koncentracije ( $5 \times 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup>). Ovakav rezultat ukazuje na to da je matrica veće koncentracije bolji stabilizator, kao i na činjenicu da veća koncentracija rastvora srebra nitrata može dovesti do povećanja veličine nanočestica usled povećane mogućnosti aglomeracije. Uvođenje itakonske kiseline u polimernu matricu ima za posledicu dobijanje nanočestica većih dimenzija. Ovaj trend se može objasniti nešto manjim udelom gel faze u polimernoj matrici (Tabela 4.1.) usled uvođenja hidrofilne komponente, što za posledicu ima istežanje polimernih lanaca uz povećanje slobodnog prostora. To dalje dovodi do slabije kontrole rasta i stabilizacije nanočestica srebra. Uticaj hidrofilne komponente na svojstva polimerne matrice je detaljno objašnjen u Poglavlju 7.1.

**Tabela 5.1.** Vrednosti parametara izračunatih iz apsorpcionih spektara.

Matrica	$c(\text{AgNO}_3)$ , mM	$r(\text{UV-Vis})$ , nm	$r(\text{Mie})$ , nm	$c_{\text{HGNC}} \times 10^{11}$ , mol/cm <sup>3</sup>	$S_a$ , m <sup>2</sup> /g	$S_r \times 10^2$ , mg/L
<b>PNiPAAm, %</b>						
5	5	5,1	6,5	4,42	56,4	4,6
	10	4,7	7,9	7,40	60,8	5,3
	50	5,9	7,8	4,86	48,2	3,6
10	5	4,8	6,8	4,21	59,9	5,1
	10	4,5	8,0	6,51	63,1	5,6
	50	5,7	8,1	4,10	50,2	3,9
15	5	3,4	6,7	8,50	83,8	10,2
	10	4,5	6,8	6,25	63,0	5,6
	50	5,8	8,3	3,49	48,8	3,7
<b>P(NiPAAm/IK)</b>						
100/0,0		4,1	8,3	3,90	73,9	7,7
98,5/1,5	10	7,2	7,0	4,87	39,5	2,8
97,0/3,0		8,1	7,8	2,79	35,9	2,5
95,5/4,5		7,7	7,2	2,95	37,4	2,7

Za procenu veličine sintetisanih nanočestica srebra korišćen je računarski program „MiePlot v.3.4”, čiji je algoritam zasnovan na Mie-ovoj teoriji (Mie G.

1908). U okviru proračuna varirana je veličina nanočestica, a na osnovu najboljeg slaganja eksperimentalno i teorijski dobijenih apsorpcionih spektara određena je veličina čestica za svaki uzorak ponaosob. Pored poluprečnika, za primenu je veoma važno znati tačnu vrednost koncentracije nanočestica unutar polimerne matrice, naročito kada se planira biomedicinska primena. Parametar koji se koristi za procenu količine srebra je molarna koncentracija inkorporiranih nanočestica srebra, a određuje se pomoću sledeće jednačine (Zhang W. i sar. 2011):

$$C_{HG\ NC} = \frac{C(AgAAS)/gHG}{Ar(Ag) \cdot \rho(Ag) \cdot V_{sfere}} \quad (5.2)$$

gde je  $c(AgAAS)/gHG$  totalna koncentracija nanočestica srebra određena atomskom apsorpcionom spektroskopijom (rezultati prikazani u Poglavlju 9.1) po gramu hidrogela nabubrelog u vodi,  $Ar(Ag)$  atomska masa srebra,  $\rho(Ag)$  teorijska vrednost gustine srebra kao kompaktnog materijala ( $10,5 \text{ g/cm}^3$ ) i  $V_{sfere}$  izračunata zapremina sferne nanočestice pri čemu je kao poluprečnik korišćena vrednost dobijena jednačinom (5.1).

Specifična površina nanočestica je izračunata korišćenjem jednačine:

$$S. a. = \frac{6}{2r \cdot \rho(Ag)} \quad (5.3)$$

gde je  $r$  poluprečnik nanočestica dobijen jednačinom (5.1), dok je rastvorljivost nanočestica srebra dobijena iz jednačine:

$$S_r = S_{bulk} \times \exp\left(\frac{2\gamma V_m}{RT} r\right) \quad (5.4)$$

gde je  $S_{bulk}$  teorijska rastvorljivost srebra kao kompaktnog materijala ( $0,009 \text{ mg/L}$ ),  $\gamma$  teorijska vrednost površinskog napona nanočestica srebra ( $1 \text{ J/m}^2$ ),  $r$  poluprečnik dobijen jednačinom (5.1),  $R$  univerzalna gasna konstanta ( $8,314 \text{ J/molK}$ ) i  $T$  temperatura (K) (Veenas C. i sar. 2009; Rance A. i sar. 2008; Stepanov A.L. i sar. 1999; Krstić J. i sar. 2014a). Parametri nanočestica dobijeni proračunima i teorijskim modelovanjem iz apsorpcionih spektara prikazani su u Tabeli 5.1.

Kao što je već pomenuto, čestice manjih dimenzija se dobijaju u polimernim matricama veće koncentracije (10 i 15 mas.% PNiPAAm-a), a značajno



povećanje veličine nanočestica se dobija uvođenjem IK u polimernu matricu. Kako čestice manjih dimenzija poseduju veću specifičnu površinu ( $S.a.$ ) i veću rastvorljivost ( $S_r$ ), to se može uočiti da su najveće vrednosti  $S.a.$  i  $S_r$  dobijene za uzorak sa najmanjom vrednošću veličine nanočestica (15 mas.% PNiPAAm sa 10 mM AgNO<sub>3</sub>) (Spasojević J. i sar. 2015a), a najmanje za kopolimerne uzorke P(NiPAAm/IK) u odnosima 97,0/3,0 i 95,5/4,5 (Spasojević J. i sar. 2015b). Samim tim i molarna koncentracija inkorporiranih nanočestica srebra pokazuje sličan trend, pa tako vrednost  $CHGNC$  raste sa smanjenjem veličine nanočestica i sa povećanjem koncentracije polimerne matrice. Dobijeni rezultati imaju očekivani trend koji je u skladu sa teorijskim i literaturnim podacima (Krstić J. i sar. 2014a).

## 6. Fizičko-hemijska svojstva hidrogelova i nanokompozita

U ovom poglavlju prikazani su rezultati detaljne fizičko-hemijske karakterizacije PNiPAAm i P(NiPAAm/IK) hidrogelova, kao i Ag/PNiPAAm i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita. Imajući u vidu potencijalnu primenu sintetisanih sistema, osnovna svojstva koja su neophodna za fizičko-hemijsku karakterizaciju su kapacitet i kinetički parametri bubrenja. Bubrenje je fizičko-hemijski proces koji se može kontrolisati sastavom hidrogelova, stepenom umreženja, kao i uslovima sredine u kojoj se primena planira. Poznavanje i definisanje ovih zavisnosti je preduslov za razvoj sinteze materijala sa unapred definisanim svojstvima. S obzirom da je planirana primena u oblasti biomedicine, sintetisani su sistemi osetljivi na fiziološke parametre, temperaturu i pH-vrednost rastvora.

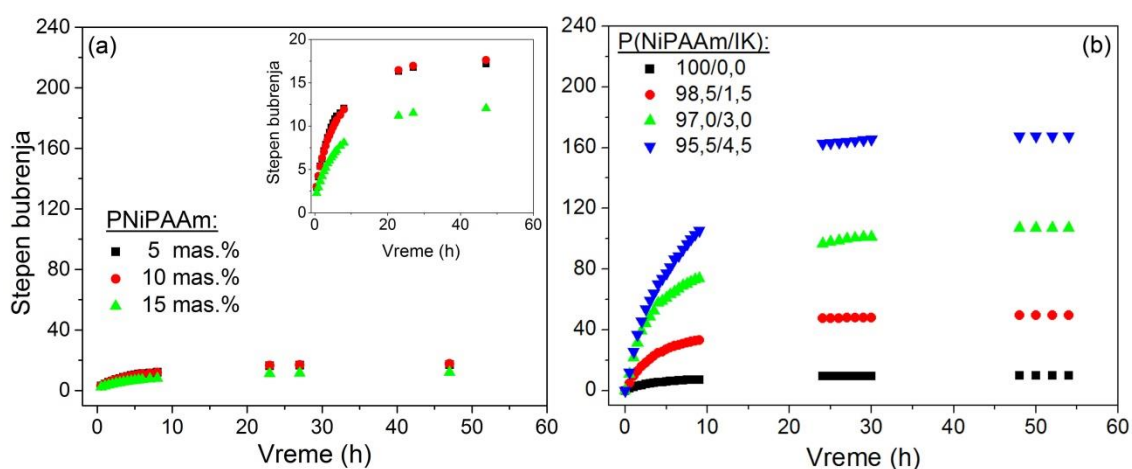
### 6.1. Studija bubrenja i kinetika difuzije

Proces bubrenja hidrogelova i nanokompozita je praćen u vodi, puferima različitih pH-vrednosti (2,2; 4,5; 6,8) i rastvoru SBF-a (pH=7,4). Bubrenje hidrogelova je praćeno na dve temperature, 25 °C i 37 °C, a dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna merenja. Standardna devijacija merenja je bila  $\pm 10\%$  od srednjih vrednosti, što ukazuje na veoma dobru reproduktivnost rezultata.

#### 6.1.1. Bubrenje u vodi

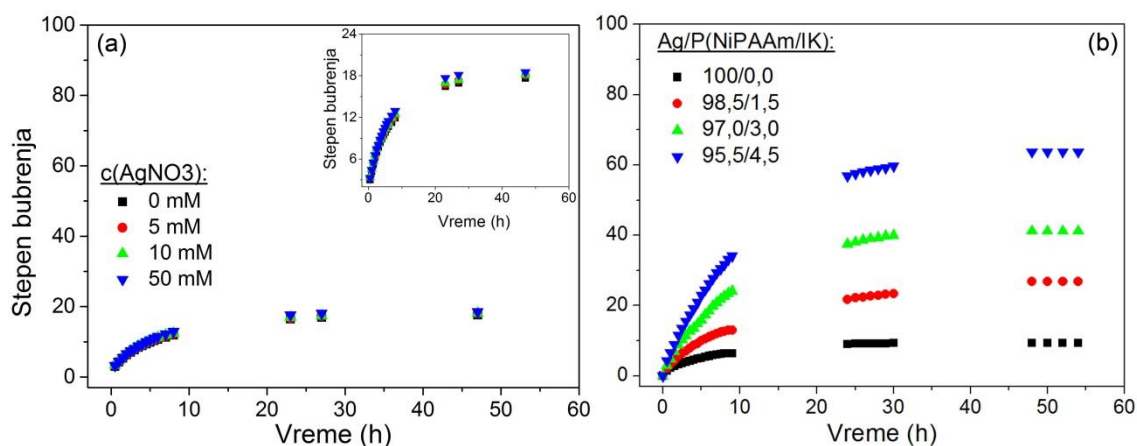
U cilju ispitivanja kinetike bubrenja i difuzionih svojstava polimernih matrica, praćen je proces bubrenja sintetisanih hidrogelova i nanokompozita u vodi. Voda je izabrana kao neutralni medijum kako bi se sprečio uticaj dodatnih jona koji postoje u puferskim rastvorima, a koji bi mogli da utiču na sam proces bubrenja. Polimerne matrice svojim kapacitetom bubrenja, mogućnošću difuzije rastvora unutar mreže i kinetikom difuzije direktno utiču, prvo na

karakteristike nanočestica srebra pri *in situ* sintezi, a zatim i na mogućnost njihovog kontrolisanog otpuštanja. Praćenjem bubrenja u vodi na 25 °C ispitan je uticaj koncentracije polimerne matrice, uticaj udela hidrofilnog komonomera (IK) i na kraju uticaj prisustva nanočestica srebra na kapacitet i kinetiku bubrenja. Na osnovu dobijenih rezultata izračunati su parametri polimernih mreža (Tabela 7.1). Na Slici 6.1 prikazane su krive bubrenja za homopolimerne PNiPAAm i kopolimerne P(NiPAAm/IK) hidrogelove u vodi na 25 °C.



**Slika 6.1.** Krive bubrenja PNiPAAm (a) i P(NiPAAm/IK) (b) hidrogelova u vodi na 25 °C.

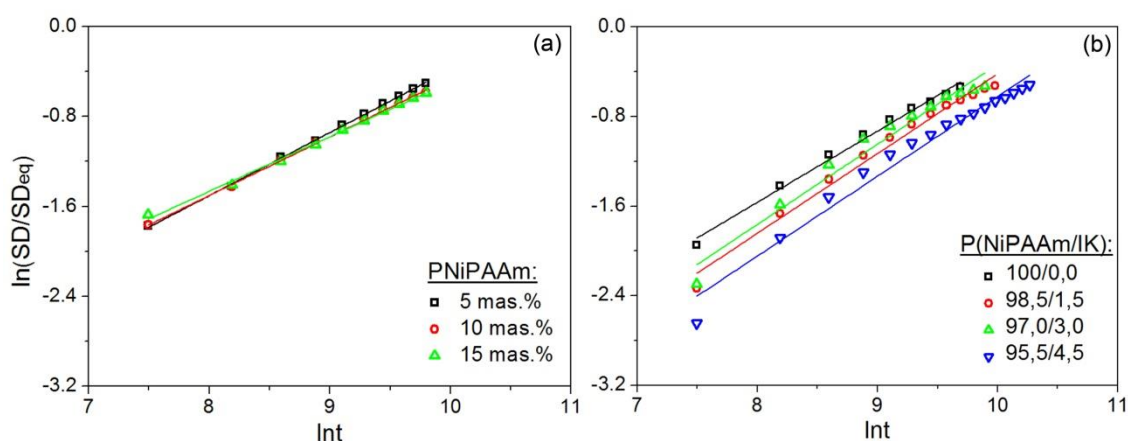
Prikazani rezultati pokazuju veliki uticaj sastava hidrogelova na kapacitet bubrenja. Ova osetljivost je manja u slučaju homopolimernih matrica, pa je tako dobijena mala razlika u stepenu bubrenja 5 mas.% u odnosu na 15 mas.% PNiPAAm hidrogel. Međutim, uvođenje IK kao hidrofilne komponente dovodi do značajnog povećanja kapaciteta bubrenja, pa tako maseni udeo IK od 4,5% u polimernoj matrici dovodi do povećanja stepena bubrenja oko 20 puta. Prisustvo IK na kapacitet bubrenja utiče na dva načina, svojom hidrofilnošću zahvaljujući karboksilnim grupama značajno povećava količinu apsorbovane vode, dok sa druge strane veličinom svog molekula izaziva istežanje polimernih lanaca što takođe vodi većoj apsorpciji (Tasdelen B. i sar. 2004a; Tasdelen B. i sar. 2004b; Tasdelen B. i sar. 2005).



**Slika 6.2.** Krive bubrenja Ag/PNiPAAm (a) i Ag/P(NiPAAm/IK) (b) nanokompozita u vodi na 25 °C.

Na kapacitet bubrenja hidrogelova utiče i prisustvo inkorporiranih nanočestica srebra (Slika 6.2), pri čemu je taj uticaj različit u zavisnosti od sastava hidrogela. Hidrogelovi na bazi PNiPAAm-a pokazuju neznatno povećanje stepena bubrenja sa inkorporacijom nanočestica srebra usled istežanja polimernih lanaca. Međutim, u slučaju kopolimernih hidrogelova NiPAAm-a i IK, nakon inkorporacije nanočestica srebra dolazi do značajnog smanjenja kapaciteta bubrenja. Nanočestice su unutar polimerne matrice stabilisane fizičkim interakcijama (elektrostatičke interakcije) između nanočestica i određenih funkcionalnih grupa polimera, što deluje kao dodatno fizičko umreženje uz istovremeno ograničavanje kretanja polimernih lanaca. Prisustvo IK sa dve karboksilne grupe povećava mogućnost formiranja elektrostatičkog naboja između funkcionalnih grupa i nanočestica srebra, što se ogleda kroz značajno smanjenje vrednosti ravnotežnog stepena bubrenja nanokompozita u odnosu na uzorke hidrogelova bez srebra (Spasojević J. i sar. 2015b).

Za primenu hidrogelova u sistemima za otpuštanje aktivnih supstanci, pored ukupnog kapaciteta bubrenja podjednako važna je i kinetička analiza kojom se može predvideti kinetika otpuštanja. Na Slici 6.3 prikazane su kinetičke krive za homopolimerne i kopolimerne hidrogelove NiPAAm-a i IK pri bubrenju u vodi na 25 °C.



**Slika 6.3.** Zavisnost  $\ln(SD/SD_{eq})$  od  $\ln t$  za PNiPAAm (a) i P(NiPAAm/IK) (b) hidrogelove pri bubrenju u vodi na 25 °C.

Analizom procesa bubrenja u početnom stupnju ( $SD/SD_{eq} < 0,6$ ) i primenom jednačine (2.9) određene su vrednosti kinetičkih parametara (kinetičke konstante  $k$  i karakterističnog eksponenta  $n$ ), dok je koeficijent difuzije  $D$  dobijen primenom modela  $D_{Early}$  (jed. 2.10),  $D_{Late}$  (jed. 2.11) i  $D_{Ettter}$  (jed. 2.12). Vrednosti parametara dobijenih iz procesa bubrenja i kinetičke analize prikazani su u Tabelama 6.1 i 6.2.

**Tabela 6.1.** Kinetički parametri bubrenja PNiPAAm hidrogelova i Ag/PNiPAAm nanokompozita u vodi na 25 °C.

PNiPAAm %	$c(\text{AgNO}_3)$ , mM	$SD_{eq}$	$k \times 10^3$ , 1/s	$n$	$D_{Early}$ , $\text{cm}^2/\text{s}$	$D_{Late}$ , $\text{cm}^2/\text{s}$	$D_{Ettter}$ , $\text{cm}^2/\text{s}$
5		17,6	2,45	0,56	8,24	7,90	7,12
10	/	17,8	3,47	0,52	7,53	6,97	7,71
15		12,3	4,68	0,48	7,21	6,62	7,35
5	5	17,9	4,12	0,51	7,86	7,81	4,06
	10	18,1	3,92	0,51	7,82	7,69	8,34
	50	16,0	4,39	0,51	9,26	8,60	8,33
10	5	18,7	4,22	0,50	7,24	6,47	2,85
	10	18,9	4,49	0,49	7,46	6,55	1,97
	50	18,8	3,51	0,52	7,57	7,60	9,09
15	5	11,8	6,10	0,46	7,24	6,48	7,46
	10	12,4	5,87	0,46	7,14	6,39	7,53
	50	11,7	6,04	0,46	7,10	6,46	8,19

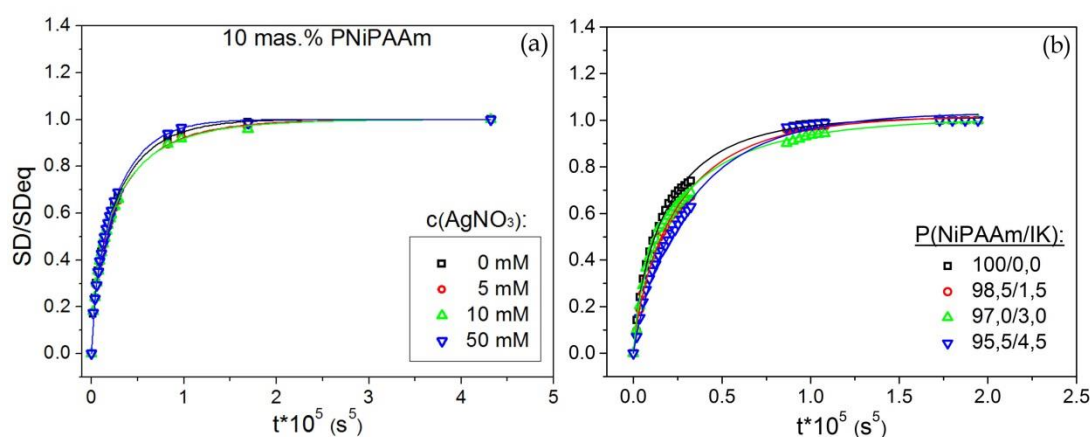
Porast konstante brzine reakcije se uočava pri povećanju koncentracije PNiPAAm-a u polimernoj matrici, kao i usled prisustva nanočestica srebra, tj. kod nanokompozita. U slučaju kada je koncentracija polimera konstantna povećanje koncentracije srebra nema značajan uticaj. Uvođenjem hidrofilne komponente u polimernu matricu dolazi do značajnog smanjenja konstante brzine, pa je tako najmanja vrednost parametra  $k$  dobijena za kopolimerne uzorke sa 4,5 mas.% IK. Karakteristični difuzioni eksponent  $n$  ukazuje na ne-Fick-ovu difuziju za uzorke manje koncentracije polimerne mreže (5 i 10 mas.% PNiPAAm-a) što znači da su u ovim slučajevima uticaji difuzije medijuma i relaksacije polimernih lanaca izjednačeni. Nasuprot tome, za 15 mas.% PNiPAAm hidrogel i Ag/15 mas.% PNiPAAm nanokompozit vrednost eksponenta  $n$  je manja od 0,5 što odgovara Fick-ovom tipu difuzije, što znači da usled velike koncentracije polimera dominira proces relaksacije polimernih lanaca (Can H. i sar. 2005; Milosavljević N. i sar. 2011). U slučaju kopolimernih hidrogelova vrednost karakterističnog eksponenta  $n$  je veća od 0,5 za sve sintetisane uzorke i hidrogelova i nanokompozita, usled prisustva IK koja povećanjem kapaciteta bubrenja dovodi do ponovnog izjednačavanja uticaja difuzije i relaksacije polimernih lanaca.

**Tabela 6.2.** Kinetički parametri bubrenja P(NiPAAm/IK) hidrogelova i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita u vodi na 25 °C.

P(NiPAAm/IK)	$c(\text{AgNO}_3)$ , mM	$SD_{\text{eq}}$	$k \times 10^3$ , 1/s	$n$	$D_{\text{Early}}$ , $\text{cm}^2/\text{s}$	$D_{\text{Late}}$ , $\text{cm}^2/\text{s}$	$D_{\text{Eter}}$ , $\text{cm}^2/\text{s}$
100/0,0	/	9,6	1,30	0,64	4,52	3,96	4,25
98,5/1,5		49,4	0,53	0,71	3,80	3,08	3,74
97,0/3,0		107	0,56	0,72	4,17	3,10	3,91
95,5/4,5		167	0,43	0,71	2,80	2,83	4,60
100/0,0	10	9,3	2,73	0,54	3,38	3,30	4,61
98,5/1,5		26,8	0,61	0,65	1,74	1,78	2,61
97,0/3,0		41,2	0,33	0,72	2,47	2,80	4,27
95,5/4,5		63,7	0,26	0,73	2,09	2,40	3,95

Od tri korišćena teorijska modela procesa bubrenja, najbolje slaganje sa eksperimentalnim podacima je pokazao Etter model (jed. 2.12) koji opisuje proces bubrenja u celom vremenskom periodu ( $0 < SD/SD_{eq} < 1$ ).

Slika 6.4 prikazuje primer primene Etter modela na proces bubrenja u slučaju Ag/PNiPAAm hidrogel nanokompozita i P(NiPAAm/IK) hidrogelova. Dijagrami procesa bubrenja, kinetike bubrenja i modelovanja primenom teorijskih modela za sve sintetisane uzorke prikazane su u Prilogu (PRILOG I – Studija bubrenja i PRILOG II – Aproksimacija procesa bubrenja teorijskim modelima).



**Slika 6.4.** Krive Etter modela pri bubrenju homopolimernih nanokompozita (a) i kopolimernih hidrogelova (b), u vodi na 25 °C.

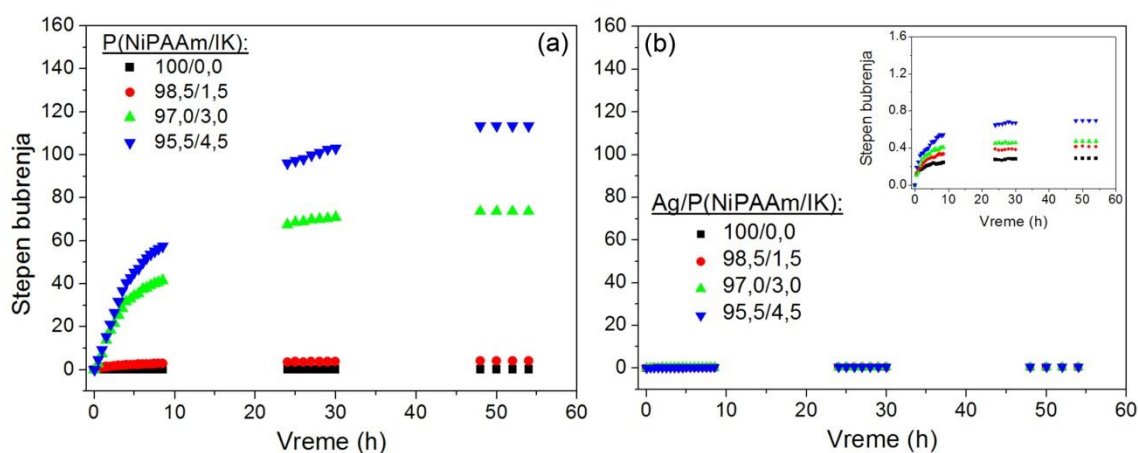
Vrednosti koeficijenta difuzije dobijenih primenom modela prikazane su u Tabelama 6.1 i 6.2. Rezultati pokazuju da ne postoji pravilan trend sa promenom koncentracije polimerne mreže ili koncentracije nanočestica srebra. Najmanja vrednost koeficijenta difuzije ( $D_{Etter}=1,97 \text{ cm}^2/\text{s}$ ) je dobijena za uzorak nanokompozita sa 10 mas.% PNiPAAm-a i 10 mM  $\text{AgNO}_3$ , dok su najveće vrednosti dobijene za uzorke nanokompozita sa najvećim koncentracijama srebra. S obzirom da je cilj rada sinteza nanokompozitnih sistema za kontrolisano otpuštanje nanočestica srebra u dužem vremenskom intervalu, ovakav rezultat je bio još jedan od razloga za odabir 10 mas.% PNiPAAm hidrogela za kopolimerizaciju sa hidrofilnom komponentom i rastvorom srebra

nitrate u koncentraciji od 10 mM. U slučaju P(NiPAAm/IK) hidrogelova i odgovarajućih nanokompozita najmanju vrednost koeficijenta difuzije pokazao je uzorak sa 1,5 mas.% IK (Spasojević J. i sar. 2015b).

### 6.1.2. Temperaturna osetljivost hidrogelova i nanokompozita

Temperaturna osetljivost sintetisanih sistema uslovljena prisustvom *N*-izopropilakrilamida, ispitana je na tri načina: praćenjem procesa bubrenja, procesa kontrakcije i određivanjem temperature faznog prelaza. Sva tri eksperimenta su izvedena za PNiPAAm i P(NiPAAm/IK) hidrogelove i Ag/PNiPAAm i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozite.

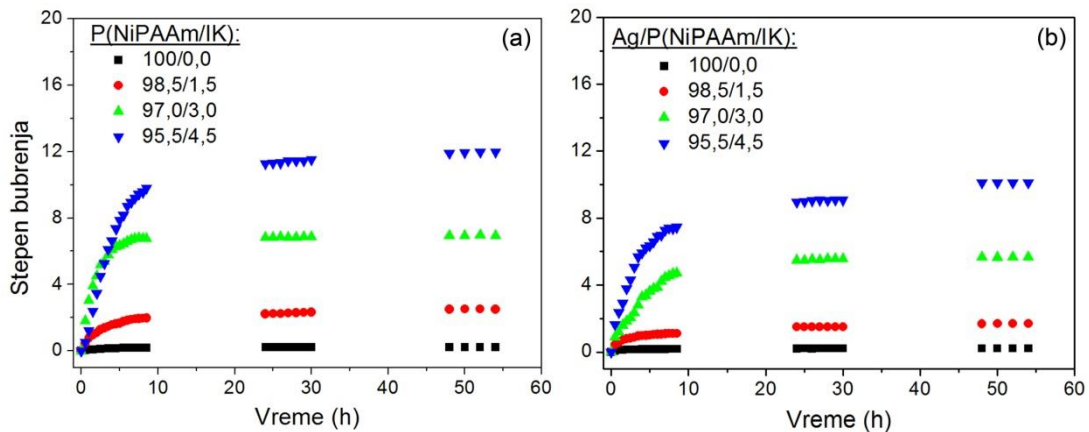
*Proces bubrenja* – Uticaj temperature na proces bubrenja ispitano je u vodi na 37 °C, a dobijene krive bubrenja za kopolimerne uzorke su prikazane na Slici 6.5. S obzirom da je bubrenje praćeno na temperaturi koja je iznad vrednosti temperature faznog prelaza PNiPAAm-a, stepen bubrenja homopolimernih uzoraka je mali zbog potpune kontrakcije PNiPAAm-a. U slučaju kopolimernih hidrogelova, PNiPAAm kao temperaturno osetljiva komponenta je potpuno kontrahovana, pa i u tom slučaju dolazi do smanjenja kapaciteta bubrenja u odnosu na proces bubrenja identičnih uzoraka na sobnoj temperaturi (Caykara T. i sar. 2006a; Dai H. i sar. 2006; de Moura M.R. i sar. 2006).



**Slika 6.5.** Krive bubrenja u vodi na 37 °C za P(NiPAAm/IK) hidrogelove (a) i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozite (b).



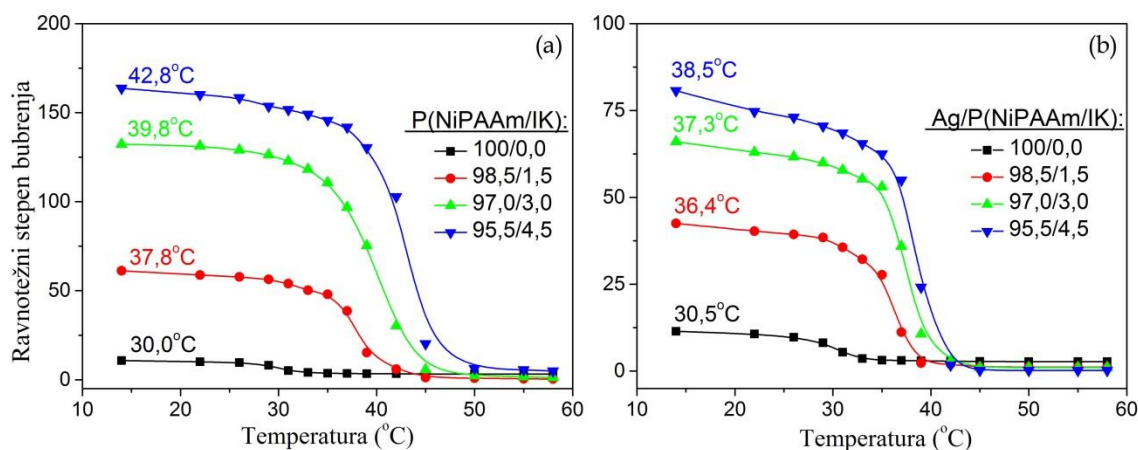
Sa Slike 6.5 se može primetiti da je temperaturna osetljivost jasno izražena u svim sistemima, a naročito u nanokompozitima. Naime, u slučaju nanokompozita postoje dva efekta koja se mogu izdvojiti. Prvi je kontrahovanje termoosetljive komponente, a drugi uticaj nanočestica srebra, izražen kroz elektrostatičke interakcije između nanočestica i određenih polimernih grupa, naročito sa hidrofilnom IK koja nije kontrahovana. Ove interakcije deluju kao dodatno fizičko umreženje, pa je bubrenje u ovim sistemima svedeno na minimum. Imajući u vidu da su sistemi sintetisani sa ciljem primene u biomedicini, ispitan je i kapacitet bubrenja u *simuliranoj telesnoj tečnosti* (SBF) na temperaturi od 37 °C (Slika 6.6).



**Slika 6.6.** Krive bubrenja u rastvoru SBF-a na 37 °C za P(NiPAAm/IK) hidrogelove (a) i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozite (b).

Prikazane krive pokazuju smanjenje kapaciteta bubrenja hidrogelova u odnosu na bubrenje u vodi a 37 °C, usled uticaja jona prisutnih u rastvoru simulirane telesne tečnosti. Međutim, u slučaju nanokompozita primećeno je povećanje kapaciteta bubrenja u odnosu na bubrenje u vodi na istoj temperaturi. Rezultati dobijeni u uslovima potencijalne primene (fiziološki uslovi) dokaz su da sintetisani nanokompoziti poseduju veliki potencijal za planiranu primenu u biomedicini kao antibakterijski sistemi.

Određivanje temperature faznog prelaza (LCST) – Temperatura faznog prelaza za P(NiPAAm/IK) hidrogelove i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozite, određena je praćenjem ravnotežnog stepena bubrenja u temperaturnom opsegu između 12 °C i 58 °C u destilovanoj vodi. Temperaturna osetljivost PNiPAAm-a u opsegu fiziološki važnih temperatura je svojstvo koje hidrogelove ovog tipa čini interesantnim za primenu u biomedicini. Vrednost LCST-a za PNiPAAm se, prema literaturnim podacima, kreće obično u opsegu između 30 °C do 35 °C, što zavisi od mikrostrukturnog uređenja trodimenzionalne strukture polimerne mreže. Na temperaturama ispod LCST dominantan proces je apsorpcija vode usled formiranja vodoničnih veza između molekula vode i hidrofilnih delova polimernog lanca. Iznad LCST slabi uticaj vodoničnih veza, pri čemu preovlađuju interakcije između hidrofobnih segmenata polimernog lanca i dolazi do kontrakcije. Na Slici 6.7 prikazane su zavisnosti ravnotežnog stepena bubrenja hidrogelova i odgovarajućih nanokompozita od temperature, a temperatura faznog prelaza je određena iz prevojne tačke.



**Slika 6.7.** Ravnotežni stepen bubrenja P(NiPAAm/IK) hidrogelova (a) i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita (b) na različitim temperaturama.

Kao što se iz prikazanih rezultata može videti, vrednost LCST za kopolimerne P(NiPAAm/IK) hidrogelove raste od 30,0 °C do 42,8 °C sa porastom udela IK od 0,0 mas.% do 4,5 mas.%. Isti trend je primećen i u slučaju

Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita, dok su vrednosti dobijene za LCST nešto niže, i kreću se u opsegu od 30,5 °C to 38,5 °C. Dobijeni rezultati su očekivani i u skladu su sa podacima iz literature (Chanda M. i Roy S., 2009). Na temperaturama iznad LCST stepen bubrenja raste sa povećanjem udela IK, usled veće poroznosti i postojanja hidrofilnih grupa unutar polimerne matrice. To dalje znači i postojanje većeg broja vodoničnih veza koje je potrebno raskinuti kako bi došlo do faznog prelaza, pa dodatak male količine itakonske kiseline u PNiPAAm lanac pomera LCST ka višim vrednostima (Cortes J. i sar. 2008; Tasdelen B. i sar. 2004; Ramirez-Fuentes Y. i sar. 2008). Inkorporacija nanočestica srebra unutar polimerne mreže daje mogućnost finijeg podešavanja LCST, pri čemu se fazni prelaz odigrava na nižim temperaturama, što je naročito uočljivo kod uzoraka sa većim sadržajem IK (Spasojević J. i sar. 2015b).

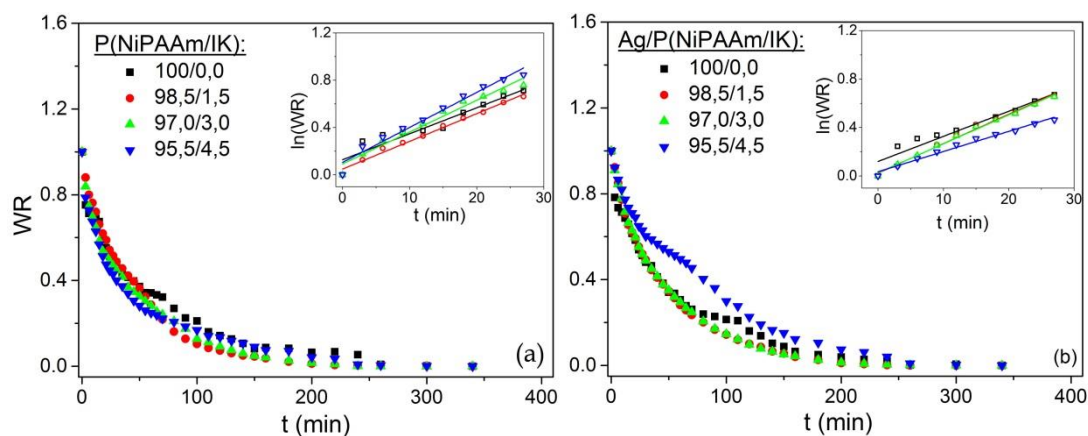
*Kontrakcija* - U cilju ispitivanja uticaja udela IK i prisustva nanočestica srebra na ponašanje hidrogelova i nanokompozita na temperaturama iznad LCST, praćena je kontrakcija u vodi na temperaturi od 48 °C. Sa Slike 6.8 se može videti da je brzina kontrakcije najveća na početku procesa, zatim opada, sve do uspostavljanja ravnotežnog stanja. Proces se može opisati sledećom jednačinom:

$$r_d = -\frac{dm_{ht}}{dt} = k_d(m_{ht} - m_{hk}) \quad (6.1)$$

gde je  $r_d$  brzina kontrakcije,  $k_d$  konstanta brzine, dok su  $m_{ht}$  i  $m_{hk}$  masa hidrogela u trenutku  $t$  i na kraju procesa kontrakcije, redom. Logaritamska zavisnost data jednačinom (6.1) omogućava dobijanje vrednosti konstante brzine kontrakcije  $k_d$  iz nagiba krive:

$$\ln \left[ \frac{m_{ht} - m_{hk}}{m_{hr} - m_{hk}} \right] = -k_d \cdot t \quad (6.2)$$

gde odnos  $(m_{ht} - m_{hk}) / (m_{hr} - m_{hk})$  predstavlja stepen dehidracije na Slici 6.8 označen sa  $WR$ , dok je  $m_{hr}$  masa hidrogela u trenutku  $t=0$  (ravnotežno nabubrelo stanje pre početka procesa kontrakcije).



**Slika 6.8.** Krive kontrakcije za P(NiPAAm/IK) hidrogelove (a) i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozite (b).

Iako su konstante brzine bubrenja za homopolimerne uzorke (PNiPAAm i Ag/PNiPAAm) imale najveću vrednost (Tabela 6.3), prilikom kontrakcije ovi uzorci pokazuju najnižu vrednost konstante brzine. To je posledica formiranja površinskog sloja kada se hidrogel, nabubreo do ravnoteže, uroni u vodu čija je temperatura viša od temperature faznog prelaza za dati uzorak. Formirani površinski sloj predstavlja barijeru molekulima vode da difunduju iz polimerne mreže u okolni rastvor, usled čega dolazi do smanjenja brzine procesa kontrakcije. Uvođenje IK kiseline u polimernu mrežu hidrogela dovodi do povećanja brzine kontrakcije, pri čemu brzina dalje raste sa povećanjem udela IK. Prisustvo hidrofilne komponente dovodi do smanjenja gustine formiranog površinskog sloja što olakšava difuziju molekula vode i povećava brzinu procesa kontrakcije (Liu Y. i sar. 2014; Kaneko Y. i sar. 1995; Zhang X. i Zhuo R., 2000).

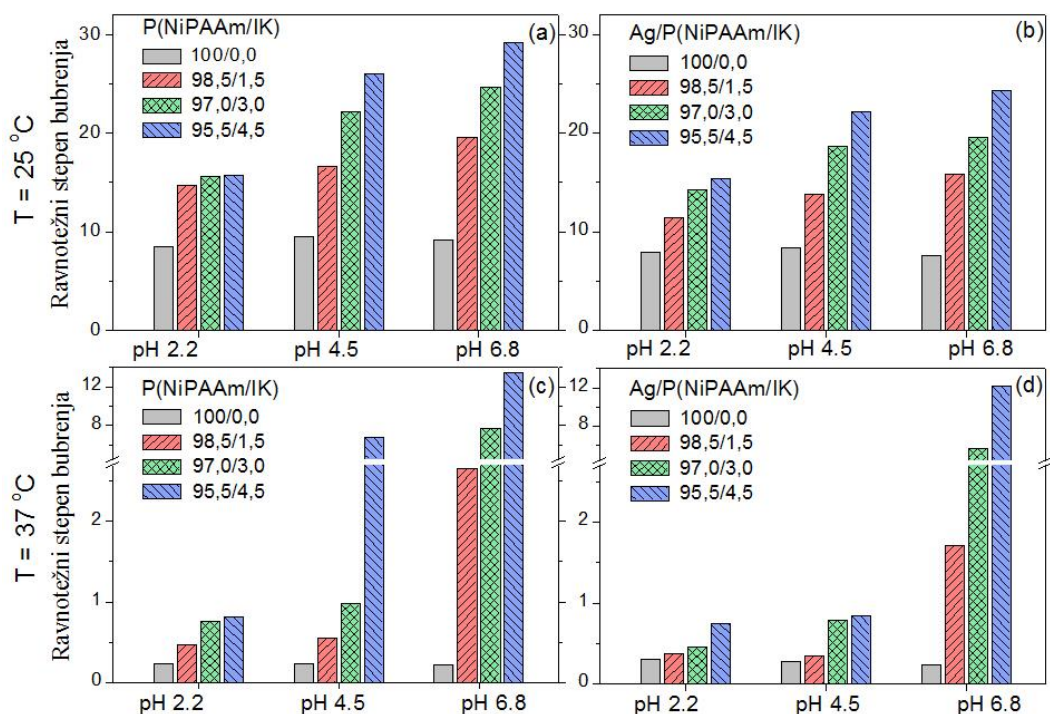
**Tabela 6.3.** Vrednosti konstante brzine kontrakcije za P(NiPAAm/IK) hidrogelove i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozite.

Uzorak	$k_d \times 10^3, 1/min$			
	100/0,0	98,5/1,5	97,0/3,0	95,5/4,5
P(NiPAAm/IK)	22,0	24,3	26,9	29,6
Ag/P(NiPAAm/IK)	20,8	23,4	23,9	16,7

Inkorporacijom nanočestica srebra unutar polimerne matrice postiže se suprotan efekat, pa su tako vrednosti konstanti brzina procesa kontrakcije nanokompozita manje u odnosu na odgovarajuće uzorke hidrogelova. Naime, inkorporirane nanočestice deluju kao dodatni centri fizičkog umreženja, usled elektrostatičkih interakcija, što otežava difuziju molekula vode i dovodi do smanjenja brzine kontrakcije (Spasojević J. i sar. 2015b).

### 6.1.3. pH osetljivost hidrogelova i nanokompozita

U cilju ispitivanja osetljivosti sintetisanih sistema na promenu pH-vrednosti okolnog medijuma, određen je stepen bubrenja P(NiPAAm/IK) hidrogelova i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita na tri pH-vrednosti (2,20; 4,50 i 6,80) na dve temperature, 25 °C i 37 °C (Slika 6.9). pH-vrednosti medijuma za bubrenje su odabrane tako da pokrivaju opseg pH-vrednosti ispod i iznad  $pK_{a1}$  vrednosti itakonske kiseline ( $pK_{a1} = 3,85$ ,  $pK_{a2} = 5,45$ ) (Weast R.C. 1972.).



**Slika 6.9.** Zavisnost ravnotežnog stepena bubrenja od pH-vrednosti okolnog medijuma za P(NiPAAm/IK) hidrogelove (a,c) i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozite (b,d).

Kao što se može videti sa Slike 6.9, promena pH-vrednosti nema značajnog uticaja na homopolimerne uzorke hidrogelova i nanokompozita, jer su vrednosti stepena bubrenja za PNiPAAm i Ag/PNiPAAm veoma bliske pri ispitivanju na istoj temperaturi. Promena stepena bubrenja kod homopolimernih uzoraka je uočena samo na različitim temperaturama, što je očekivano i objašnjeno u prethodnom poglavlju. Uvođenjem IK, sistem postaje pH osetljiv i pokazuje značajno povećanje kapaciteta bubrenja sa povećanjem pH-vrednosti medijuma za bubrenje. Na pH-vrednostima koje su ispod konstanti jonizacije itakonske kiseline (u ovom slučaju  $\text{pH}=2,20$ ), povećanje ravnotežnog stepena bubrenja je posledica umetanja molekula itakonske kiseline koji svojom veličinom izaziva istežanje polimernih lanaca. Značajnije povećanje kapaciteta bubrenja se dešava na  $\text{pH}=4,5$  i  $\text{pH}=6,8$  usled jonizacije karboksilnih grupa IK, kada dolazi do formiranja karboksilnih anjona ( $\text{COO}^-$ ) koji poseduju veću hidrofilitnost od  $\text{COOH}$  grupa. Postojanje negativnog naelektrisanja na susednim atomima dovodi do pojave elektrostatičkih odbojnih sila koje šire polimernu mrežu i povećavaju kapacitet bubrenja (Kalagasidis Krušić M. i sar. 2009; Milašinović N. i sar 2010b). Kao što je i očekivano, najveću pH osetljivost pokazao je sistem sa najvećim udelom IK (4,5 mas.%). Trend pH osetljivosti je isti i kod nanokompozitnih sistema, pa se može zaključiti da prisustvo nanočestica u polimernoj matrici ne utiče na pH osetljivost, već samo na vrednost kapaciteta bubrenja (Spasojević J. i sar. 2015b). Uzimajući u obzir sva ispitivanja kapaciteta bubrenja sintetisanih homo- i kopolimernih hidrogelova, kao i nanokompozita, može se zaključiti da sistemi poseduju izuzetnu termo- i pH-osetljivost koja se može podešavati promenom udela komonomera i inkorporacijom nanočestica srebra, što ove sisteme čini posebno pogodnim za upotrebu u biološkim sistemima u širokom opsegu fiziološki relevantnih parametara.

## 7. Morfologija polimernih matrica i strukturna svojstva nanokompozita

### 7.1. Parametri mreže polimernih matrica

Struktura polimerne mreže se definiše preko sledećih parametara: udeo polimera u stanju posle sinteze ( $v_{2f}$ ), udeo polimera u nabubrelom stanju ( $v_{2s}$ ), gustina kserogela ( $\rho_{xg}$ ), molarna masa između dve tačke umreženja ( $M_c$ ), efektivna gustina umreženja ( $\rho_c$ ) i veličina pora ( $\xi$ ). Vrednosti ovih parametara za homopolimerne hidrogelove PNiPAAm-a (5 mas.%, 10 mas.% i 15 mas.%) i kopolimerne hidrogelove P(NiPAAm/IK) su određene iz studije bubrenja u vodi na 25 °C korišćenjem jednačina od (2.2) do (2.8). Dobijene vrednosti su prikazane u Tabeli 7.1.

Analizom rezultata prikazanih u Tabeli 7.1 jasno se uočava da postoji velika razlika u parametrima mreže sa promenom sastava i koncentracije polimernih matrica. Povećanje koncentracije monomera u homopolimernoj matrici PNiPAAm-a od 5 do 15 mas.% dovodi do povećanja udela polimera u hidrogelovima i nakon procesa sinteze i u nabubrelom stanju. U skladu sa tim je i najveća gustina kserogela dobijena za uzorak najveće koncentracije (15 mas.%). Međutim, vrednosti ostalih parametara nemaju trend u skladu sa koncentracijom polimerne matrice, pa je tako najmanja vrednost molarne mase između dve tačke umreženja ( $M_c$ ) dobijena za srednju koncentraciju PNiPAAm-a (10 mas.%), što ujedno znači da ima najveću gustinu umreženja i najmanju veličinu pora. Imajući u vidu hidrofilnost IK, koja svojim udelom dovodi do povećanja kapaciteta bubrenja i veličina pora, a samim tim i slabljenja polimerne mreže, kao komonomerna komponenta u P(NiPAAm/IK) uzorcima izabran je upravo 10 mas.% PNiPAAm, u cilju dobijanja kopolimera zadovoljavajućih strukturnih i mehaničkih svojstava.

Vrednosti strukturnih parametara kopolimernih hidrogelova P(NiPAAm/IK) ukazuju da dodatak IK kao hidrofilne komponente ima veliki uticaj na svojstva polimerne matrice. Dobijeni rezultati imaju očekivani trend i u skladu su sa

rezultatima bubrenja i podacima iz literature (Milašinović i sar. 2010a; Caykara T. i sar. 2006b; Kalagasidis Krušić M. i sar. 2009; Sen M. i sar. 1999; Caykara T. i sar. 2006a). Iz Tabele 7.1 se može uočiti da vrednosti molarne mase između dve tačke umreženja i veličina pora rastu sa povećanjem udela itakonske kiseline, dok u isto vreme, očekivano, opada gustina umreženja.

**Tabela 7.1.** Vrednosti strukturnih parametara mreže za homopolimerne (PNiPAAm) i kopolimerne (P(NiPAAm/IK)) hidrogelove u vodi na 25 °C.

Matrica	$v_{2r}$	$v_{2s}$	$\rho_{xg}$ g/cm <sup>3</sup>	$M_c$ kg/mol	$\rho_c$	$\xi$ , nm
<b>PNiPAAm, %</b>						
5	0,038	0,073	0,764	57,1	1,98	1,26
10	0,082	0,104	0,858	51,6	2,20	1,07
15	0,131	0,120	0,865	63,0	1,79	1,31
<b>P(NiPAAm/IK)</b>						
100/0,0	0,132	0,103	0,901	101	1,11	1,5
98,5/1,5	0,133	0,022	0,892	663	0,17	6,4
97,0/3,0	0,137	0,011	0,887	941	0,12	9,7
95,5/4,5	0,138	0,007	0,889	998	0,11	11,6

S obzirom da sintetisani sistemi imaju potencijalnu biomedicinsku primenu, strukturni parametri su izračunati i na temperaturi od 37 °C, a njihove vrednosti predstavljene u Tabeli 7.2. Ujedno, ova temperatura predstavlja upravo temperaturu na kojoj se izvode testovi *in vitro* otpuštanja jona srebra i testovi ispitivanja antimikrobnog potencijala sintetisanih sistema.

**Tabela 7.2.** Vrednosti strukturnih parametara mreže za kopolimerne P(NiPAAm/IK) hidrogelove u vodi na 37 °C.

P(NiPAAm/IK)	$v_{2r}$	$v_{2s}$	$\rho_{xg}$ , g/cm <sup>3</sup>	$\xi$ , nm
100/0,0	0,131	0,817	0,901	0,75
98,5/1,5	0,133	0,209	0,892	3,02
97,0/3,0	0,137	0,015	0,887	8,59
95,5/4,5	0,139	0,010	0,889	10,14

Očekivano, uočava se značajno smanjenje vrednosti izračunatih parametara usled kontrahovanja PNiPAAm-a kao termoosetljive komponente u

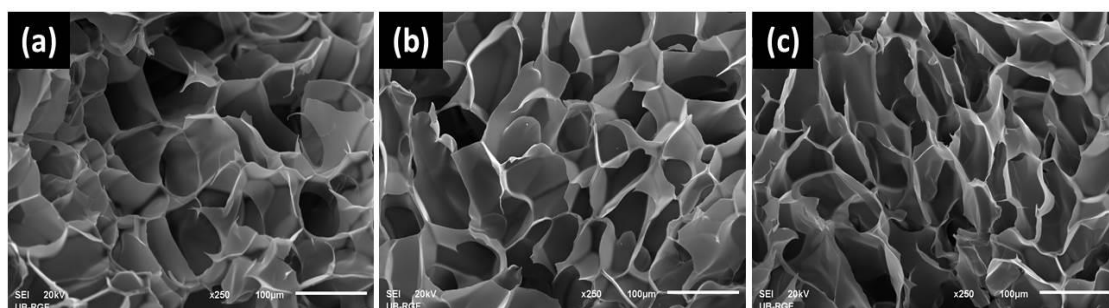


polimernim matricama, što je u saglasnosti sa rezultatima bubrenja. Međutim, trend je ostao isti kao pri bubrenju na 25 °C, pa tako sa porastom udela IK dolazi do povećanja molarne mase između dve tačke umreženja ( $M_c$ ) i veličine pora ( $\xi$ ), uz istovremeno smanjenje stepena umreženja ( $\rho_c$ ) (Spasojević J. i sar. 2015b).

## 7.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Unutrašnja morfologija sintetisanih hidrogelova i hidrogel nanokompozita ispitana je SEM analizom poprečnog preseka liofilizovanih uzoraka. Dobijene mikrografije su potvrdile poroznu strukturu i sličnu morfologiju svih sintetisanih sistema.

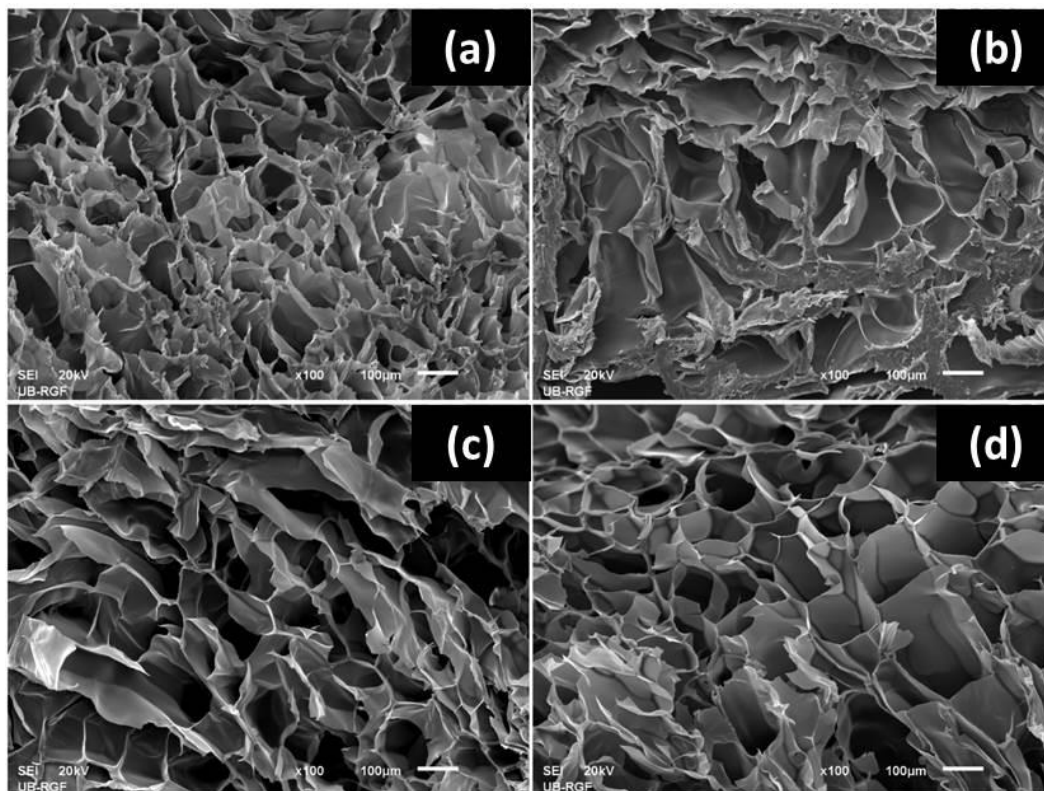
Slika 7.1 prikazuje morfologiju homopolimernih uzoraka PNiPAAm-a različite koncentracije polimerne mreže (od 5 mas.% do 15 mas.%, pri čemu se uočava blago smanjenje veličine pora kod uzorka sa najvećom koncentracijom PNiPAAm-a (Slika 7.1(c)). Ovakav rezultat je u skladu sa rezultatima dobijenim ispitivanjem procesa bubrenja, gde je značajnije smanjenje vrednosti stepena bubrenja (Tabela 6.1) uočeno za uzorak sa najvećom koncentracijom PNiPAAm-a u polimernoj mreži (15 mas.% PNiPAAm).



**Slika 7.1.** SEM mikrografije PNiPAAm hidrogelova: 5 mas.% (a), 10 mas.% (b) i 15 mas.% (c).

Kako bi se ispitao uticaj prisustva nanočestica srebra na unutrašnju morfologiju hidrogelova, SEM analiza je izvedena i za uzorke nanokompozita. Na Slici 7.2

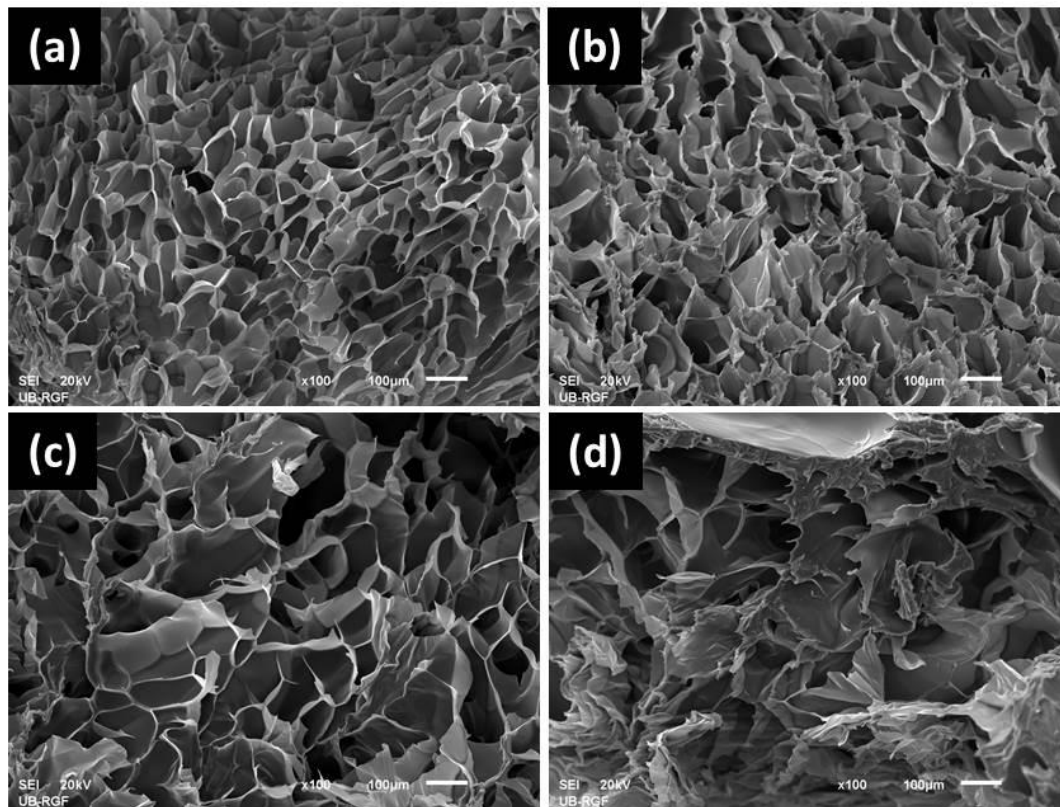
prikazane su SEM mikrografije 10 mas.% PNiPAAm hidrogela i odgovarajućih nanokompozitnih sistema (10 mas.% PNiPAAm-a sa 5, 10 i 50 mM  $\text{AgNO}_3$ ). Prisustvo nanočestica srebra, kao i njihov uticaj na polimernu mrežu se, usled ograničenosti metode uslovljene rezolucijom samog uređaja, na prikazanim mikrografijama ne uočava (Spasojević J. i sar. 2015a).



**Slika 7.2.** SEM mikrografije 10 mas.% PNiPAAm hidrogela (a), i nanokompozita na bazi 10 mas.% PNiPAAm-a sa 5mM (b), 10mM (c) i 50 mM  $\text{AgNO}_3$  (d).

S druge strane, SEM analiza kopolimernih hidrogelova P(NiPAAm/IK) pokazala je jasnu razliku u veličini pora između uzoraka sa različitim sadržajem itakonske kiseline (Slika 7.3). Prikazane mikrografije su pokazale da se na poroznost hidrogelova najviše može uticati promenom sastava kopolimernih hidrogelova, odnosno udelom IK. Najveće pore dobijene su za uzorke sa najvećim sadržajem itakonske kiseline, što je očekivano i u saglasnosti sa podacima u literaturi (Milašinović i sar. 2010a; Caykara T. i sar. 2006b;

Kalagasidis Krušić M. i sar. 2009; Sen M. i sar. 1999; Caykara T. i sar. 2006a; Spasojević J. i sar. 2015b).

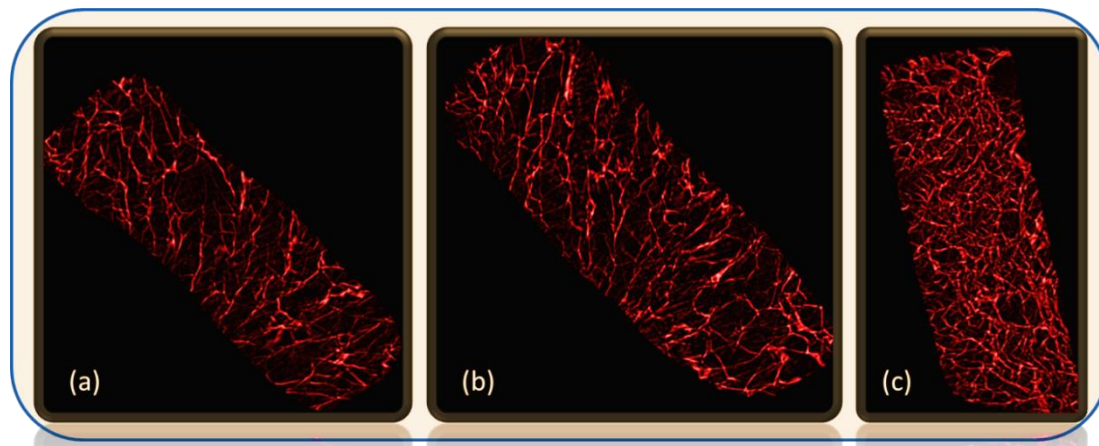


**Slika 7.3.** SEM mikrografije P(NiPAAm/IK) hidrogelova: 100/0,0 (a), 98,5/1,5 (b), 97,0/3,0 (c) i 95,5/4,5 (d).

### 7.3. Mikro-kompjuterizovana topografija ( $\mu$ -CT)

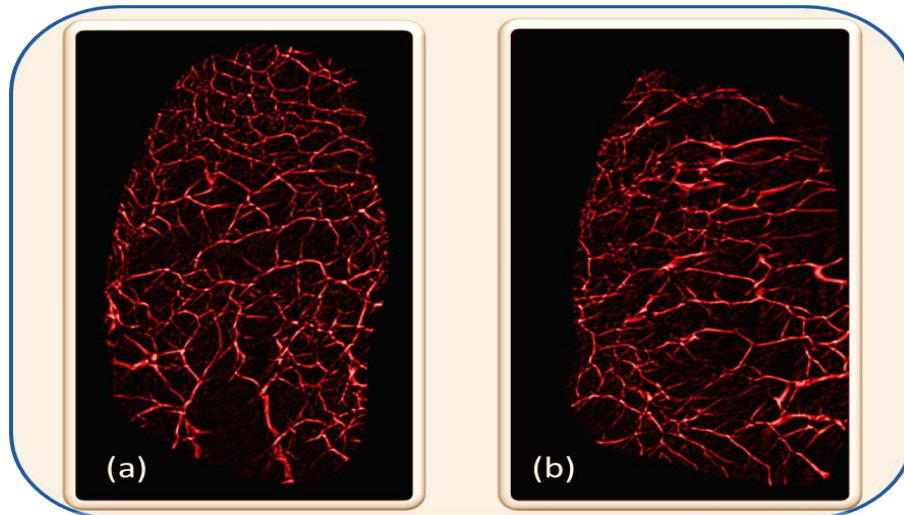
Mikro-kompjuterizovana topografija urađena je za homopolimerne hidrogelove PNiPAAm-a koncentracija 5 mas.%, 10 mas.% i 15 mas.%, kopolimerne hidrogelove P(NiPAAm/IK) i nanokompozitne sisteme na bazi kopolimernih hidrogelova P(NiPAAm/IK) sa 10 mM AgNO<sub>3</sub>. Analiza se zasniva na skeniranju uzorka određene zapremine u odnosu na koju se dobija procenat polimerne mreže, poroznost i veličina pora (Marsich E. i sar. 2013). Usled ograničenja metode koja su vezana za rezoluciju samog uređaja, veličine pora dobijene na ovaj način se ne mogu uzeti kao apsolutne vrednosti, već se

mogu iskoristiti za poređenje sistema različitih koncentracija ili različitog sastava.



**Slika 7.4.** Uticaj koncentracije polimerne matrice na morfologiju PNiPAAm-a: 5 mas.% (a), 10 mas.% (b) i 15 mas.% (c).

Poređenjem dobijenih rezultata ispitan je uticaj koncentracije polimerne matrice (mas.% PNiPAAm), udela itakonske kiseline, kao i uticaj prisustva nanočestica srebra na osnovne parametre određene  $\mu$ -CT analizom, a dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 7.3. Kao što se na osnovu Slike 7.4 može videti, u slučaju homopolimera PNiPAAm-a sa porastom koncentracije monomera povećava se procenat polimerne mreže, dok u isto vreme opada poroznost. Vrednosti dobijene za 5 mas.% i 10 mas.% PNiPAAm su slične, dok je značajno smanjenje primećeno tek pri koncentraciji od 15 mas.% (Tabela 7.3), što je u skladu sa rezultatima bubrenja, gde je značajno smanjenje kapaciteta bubrenja takođe primećeno tek pri ovoj koncentraciji.



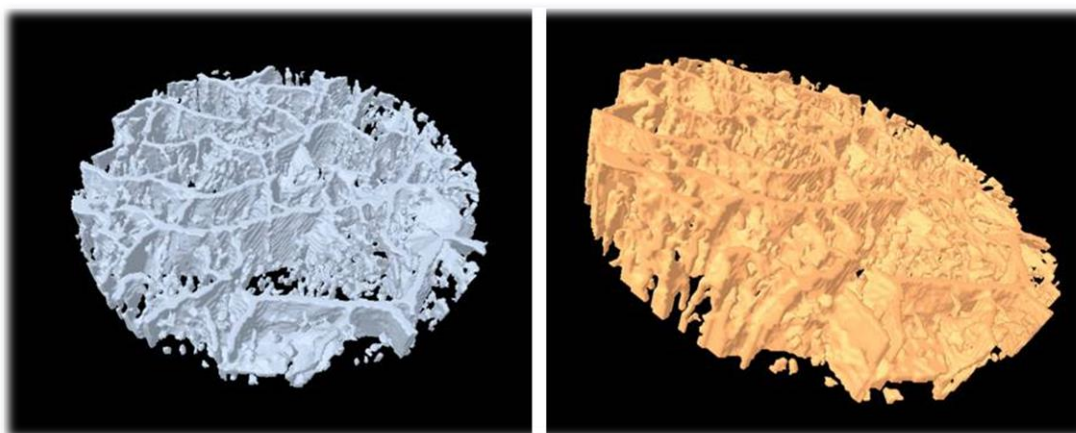
**Slika 7.5.** Uticaj udela IK na morfologiju kopolimernih matrica:  
P(NiPAAm/IK): 98,5/1,5 (a) i 95,5/4,5 (b).

Kao i SEM analiza, i  $\mu$ -CT metoda je pokazala da se na poroznost hidrogelova najviše može uticati kopolimerizacijom NiPAAm-a sa itakonskom kiselinom. Rezultati skeniranja su pokazali da sa porastom udela itakonske kiseline dolazi do značajnog povećanja poroznosti, dok se ujedno procenat polimerne mreže u ispitivanoj zapremini smanjuje (Slika 7.5 i Tabela 7.3). Vrednosti veličine pora za ispitivane hidrogelove pokazale su očekivani trend, pri čemu je najmanja vrednost dobijena za 15 mas.% PNiPAAm, a najveća za kopolimer P(NiPAAm/IK) u odnosu 95,5/4,5.

Tabela 7.3. Vrednosti parametara dobijenih mikro-kompjuterizovanom topografijom.

Matrica	Procenat mreže, %	Poroznost, %	Veličina pora $\times 10^2$ , mm
<b>PNiPAAm, %</b>			
5	18,4	81,6	2,77
10	18,7	81,3	2,98
15	33,8	66,2	2,42
<b>P(NiPAAm/IK)</b>			
100/0,0	19,5	80,5	3,15
98,5/1,5	15,1	84,9	4,51
97,0/3,0	10,3	89,7	6,70
95,5/4,5	7,8	92,2	6,73
<b>Ag/P(NiPAAm/IK)</b>			
100/0,0	27,5	72,5	1,95
98,5/1,5	19,9	80,1	2,98
97,0/3,0	17,6	82,4	3,64
95,5/4,5	16,8	83,2	4,12

U slučaju nanokompozita, inkorporirane nanočestice srebra deluju kao dodatno fizičko umreženje, i na taj način utiču na vrednosti merenih parametara, pri čemu dolazi do povećanja procenta polimerne mreže uz istovremeno smanjenje veličine pora. U ovom slučaju vrednosti procenata polimerne mreže obuhvataju i specifičnu površinu nanočestica, jer prilikom skeniranja ne postoji način da se razlikuju površina mreže od površine koja potiče od nanočestica.



Slika 7.6. Reprezentativni primeri 3D rekonstrukcije 10 mas.% PNiPAAm-a dobijene mikro kompjuterizovanom topografijom ( $\mu$ -CT).

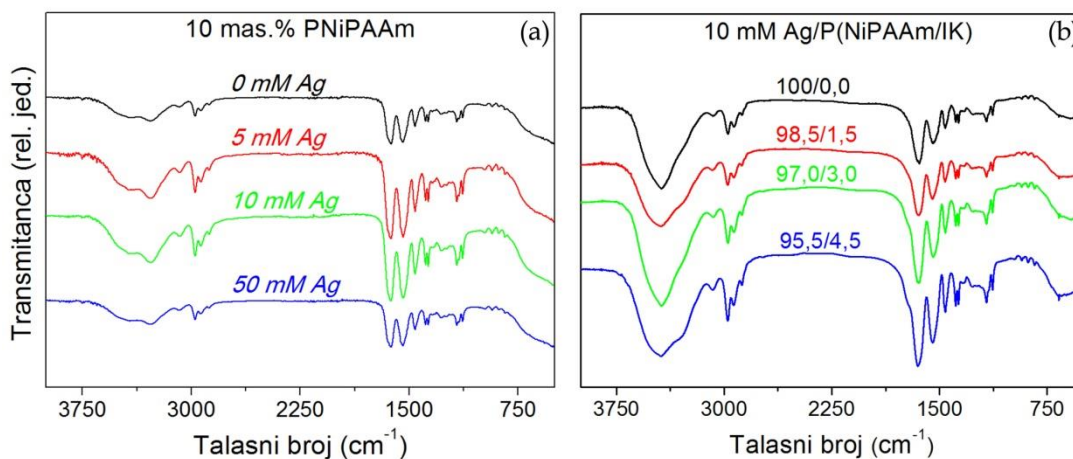


Na Slici 7.6. prikazani su primeri 3D rekonstrukcije određenog dela uzorka homopolimera PNiPAAm-a koncentracije 10 mas.%, koja pruža uvid u unutrašnju morfologiju polimerne matrice.

Mikro-CT analizom je utvrđeno da veličina pora ima očekivani trend, koji je u skladu sa rezultatima dobijenim SEM analizom, kao i da se isti trend može uočiti i za ostala dva parametra koji su određeni, poroznost i procenat polimerne mreže.

#### 7.4. Analiza nanokompozita infracrvenom spektroskopijom sa Furie-ovom transformacijom

Interakcija između inkorporiranih nanočestica srebra i polimerne matrice ispitana je primenom infracrvene spektroskopije sa Fourier-ovom transformacijom. Ispitani su uzorci homopolimernih Ag/PNiPAAm i kopolimernih Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita.



**Slika 7.7.** FTIR spektri nanokompozita: Ag/PNiPAAm (a) i Ag/P(NiPAAm/IK) (b).

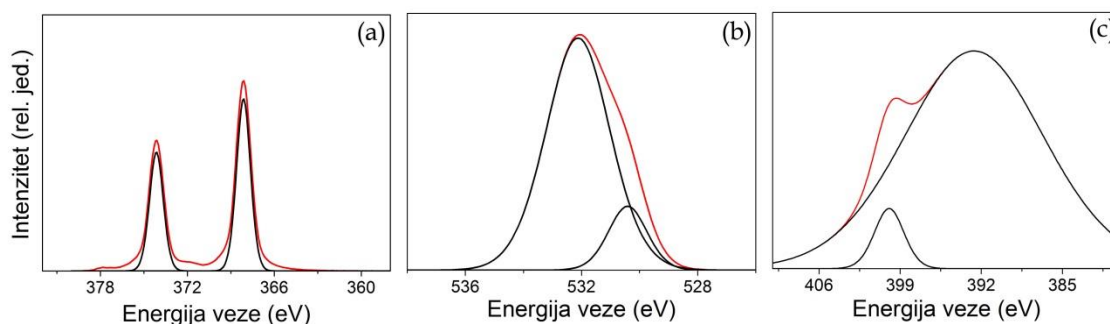
Analizom dobijenih FTIR spektara uočavaju se karakteristične trake za homopolimerne i kopolimerne hidrogelove na bazi *N*-izopropilakrilamida i itakonske kiseline, opisane u Poglavlju 4.4. Na spektrima nije uočena pojava dodatnih pikova koji bi se mogli pripisati prisustvu nanočestica srebra, pa se

može zaključiti da je stabilizacija čestica postignuta isključivo fizičkim interakcijama. Detaljnija analiza načina stabilizacije nanočestica je ispitana metodom fotoelektronske spektroskopije (XPS).

### 7.5. Fotoelektronska spektroskopija X zraka (XPS)

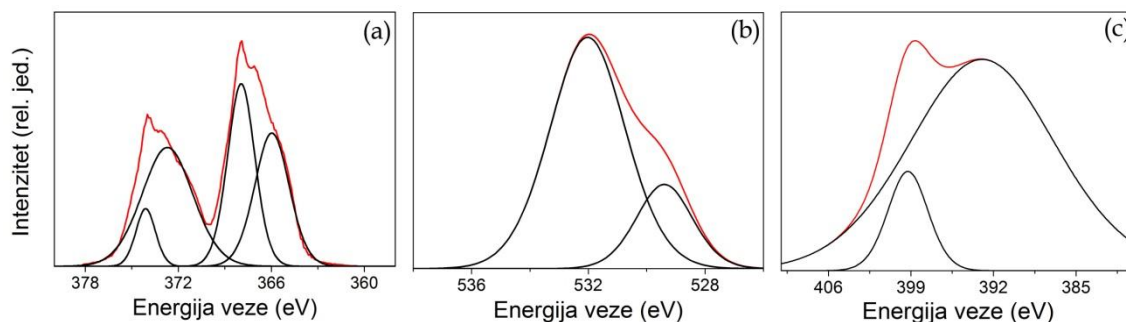
Fotoelektronska spektroskopija X zraka je metoda koja pruža detaljan uvid u način stabilizacije nanočestica srebra, ispitujući površinske interakcije između nanočestica i različitih atoma iz molekula polimera. XPS spektri se dobijaju ozračivanjem materijala snopom rendgenskog zračenja, uz istovremeno merenje kinetičke energije i broja elektrona koji se emituju iz površinskog sloja materijala koji se analizira, debljine od 1 do 10 nm. S obzirom da je energija veze valentnih elektrona karakteristična za svaki element i da postoji kao tablična vrednost, poređenjem fotoelektronske emisije dobijene XPS analizom za ispitivani sistem, može se identifikovati određeni element ili interakcija između hemijskih jedinjenja.

U ovom radu ispitivanja metodom fotoelektronske spektroskopije X zracima su izvedena za nanokompozitne sisteme sa najmanjim i najvećim sadržajem PNiPAAm-a i srebro-nitrata: 5 mas.% PNiPAAm sa 5 mM  $\text{AgNO}_3$  i 15 mas.% PNiPAAm sa 50 mM  $\text{AgNO}_3$ , redom. Na prikazanim spektrima (Slike 7.8 i 7.9) crvena linija predstavlja originalni spektar, dok je crna linija dobijena metodom dekonvolucije Gausovom raspodelom (Spasojević J. i sar. 2015a).



**Slika 7.8.** XPS spektri za Ag3d (a), O1s (b) i N1s (c) u Ag/PNiPAAm nanokompozitima (5 mas.% PNiPAAm sa 5 mM  $\text{AgNO}_3$ ).





**Slika 7.9.** XPS spektri za Ag3d (a), O1s (b) i N1s (c) u Ag/PNiPAAm nanokompozitima (15 mas.% PNiPAAm sa 50 mM AgNO<sub>3</sub>).

Slike 7.8 (a) i 7.9 (a) prikazuju XPS spektar srebra fitovan metodom dekonvolucije na dva pika u slučaju uzorka 5 mas.% PNiPAAm sa 5 mM srebro-nitrata i na četiri pika u slučaju 15 mas.% PNiPAAm sa 50 mM srebro-nitrata. Pri analizi poređen je položaj maksimuma energije veze (*eng. binding energy - BE*) sa tabličnim vrednostima za Ag 3d<sub>3/2</sub> i Ag 3d<sub>5/2</sub> (NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database). Teorijske vrednosti za kompaktni materijal (*eng. bulk*) iznose 374,27 eV za 3d<sub>3/2</sub> i 368,40 eV za 3d<sub>5/2</sub>. Vrednosti energije veze na kojima se javljaju maksimumi za 5 mas.% PNiPAAm sa 5 mM srebro-nitrata pokazuju blago smanjenje i iznose 374,15 eV za 3d<sub>3/2</sub> i 368,13 eV za 3d<sub>5/2</sub>. Uzorak sa većom koncentracijom mreže i većom koncentracijom srebro-nitrata daje nešto složeniju sliku, pa se tako uočavaju sledeći pikovi: 374,12 eV i 372,70 eV za 3d<sub>3/2</sub> i 367,96 eV i 365,95 eV za 3d<sub>5/2</sub>. Može se zaključiti da u oba slučaja dolazi do negativnog pomeraja u odnosu na tablične vrednosti, kao i da pomeraj raste sa porastom koncentracije srebro-nitrata i koncentracije PNiPAAm-a. Ovi rezultati ukazuju na postojanje interakcije između nanočestica srebra i polimerne matrice koja ima ulogu stabilizatora. Literaturni podaci pokazuju da negativan pomeraj dobijen za nanočestice srebra znači da se nanočestice ponašaju kao elektron akceptori, te da se transfer elektrona odigrava sa molekula polimera na nanočestice (Li H.J. i sar. 2012). Treba napomenuti da i proces oksidacije srebra može dati sličan efekat, jer je vrednost BE srebro oksida (AgO) vrlo bliska vrednostima dobijenim za ispitivane uzorke (367,40 eV za Ag 3d<sub>5/2</sub> i 373,90 eV za Ag 3d<sub>3/2</sub>) (Fragala M.E. i sar. 1999). Da bi

se utvrdilo da li u uzorcima ima tragova oksida urađena je XRD analiza, a dobijeni rezultati su prikazani u sledećem poglavlju.

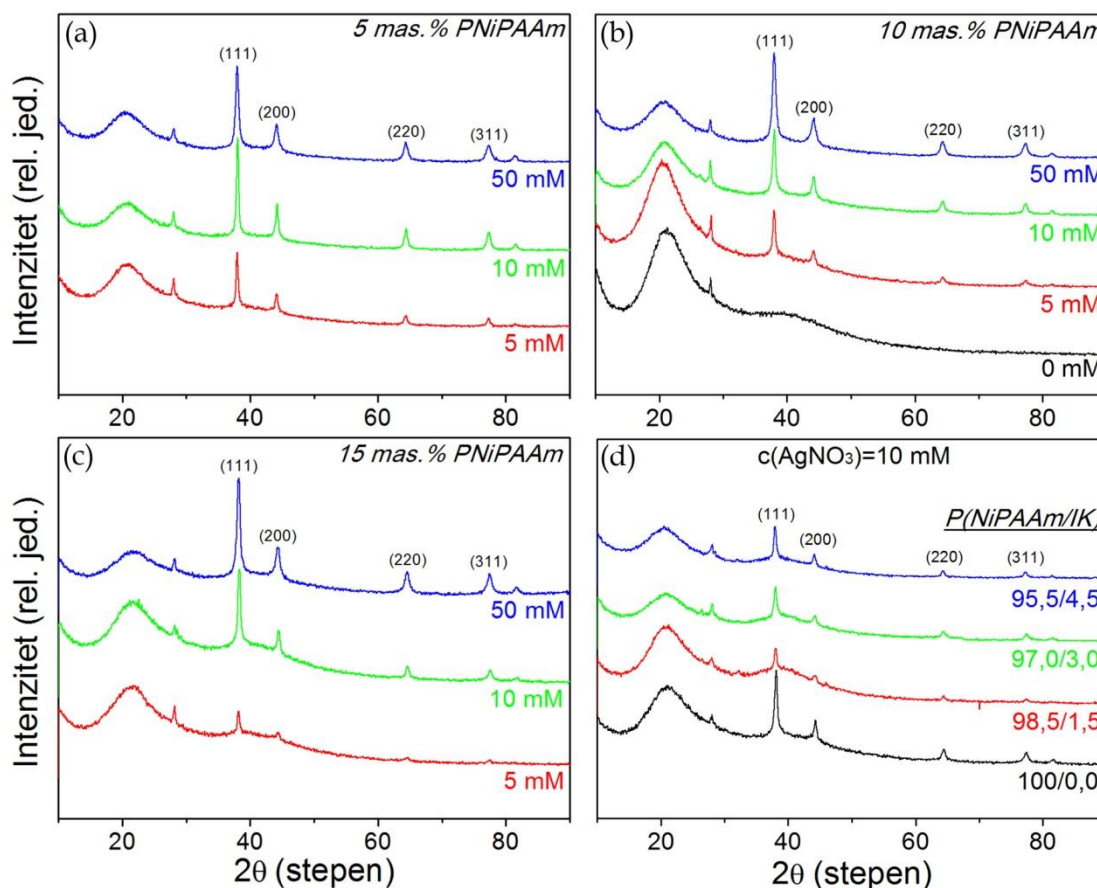
U literaturi je poznato da se stabilizacija nanočestica srebra uglavnom odvija preko atoma kiseonika, azota i sumpora koji imaju značajan afinitet prema elementarnom srebru ( $\text{Ag}^0$ ) i jonima srebra ( $\text{Ag}^+$ ). Atomi ovih elemenata stabilišu srebro formiranjem različitih koordinacionih, jon-jon, dipol-dipol i drugih interakcija (Tolstov A.L. i Lebedev E.V. 2012). Kako bi se detaljno razjasnila donorsko-akceptorska veza između molekula polimera i nanočestica srebra, ispitan je nivo energije veze za atom kiseonika (O1s) i atom azota (N1s). Slike 7.8 (b) i 7.9 (b) prikazuju XPS spektar kiseonika O1s koji je metodom dekonvolucije razdvojen na dva karakteristična pika više i niže energije veze. Za uzorak 5 mas.% PNiPAAm sa 5 mM srebro-nitrata maksimumi su na 532,12 eV i 530,41 eV, a za uzorak 15 mas.% PNiPAAm sa 50 mM srebro-nitrata na 532,03 eV i 529,39 eV. Tablična vrednost za kiseonik karbonilne grupe O1s iznosi 531,50 eV (Crist B.V. 2000). Uporednom analizom uočava se povećanje vrednosti za BE i to +0,62 eV za uzorak sa manjom i +0,53 eV za uzorak sa većom koncentracijom polimerne matrice i nanočestica srebra. Ovakav rezultat upućuje na to da se atom kiseonika ponaša kao elektron donor što je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima (Dong Y. i sar. 2007). Komponenta u spektru kiseonika na nižoj vrednosti BE potiče od atoma kiseonika koji ne učestvuju u stabilizaciji nanočestica.

Analizom XPS spektra za atom azota N1s (Slika 7.8 (c) i 7.9 (c)) potvrđeno je postojanje pika na 399,95 eV za uzorak 5 mas.% PNiPAAm sa 5 mM srebro-nitrata, kao i pik na 399,26 eV za uzorak 15 mas.% PNiPAAm sa 50 mM srebro-nitrata. Teorijska vrednost BE za N1s u amidnoj grupi iznosi 399,96 eV (Crist B.V. 2000). Na osnovu toga se može zaključiti da vrednost BE za uzorak sa nižom koncentracijom polimerne matrice i nanočestica srebra potiče verovatno od azota koji ne učestvuje u stabilizaciji nanočestica. S druge strane, negativni pomeraj od -0,70 eV za uzorak veće koncentracije polimerne matrice i nanočestica srebra je nešto teže objasniti. Prema istraživanjima nekih autora,

ovaj fenomen se može objasniti formiranjem vodoničnih veza između polimernih lanaca (Tolstov A.L. i Lebedev E.V. 2012). S obzirom da je analiza XPS spektra pokazala da se atomi kiseonika ponašaju kao donori, atomi srebra kao akceptori, kao rezultat ovakve interakcije dolazi do pojave pozitivnog i negativnog naelektrisanja. Nanočestice srebra, koje poseduju reaktivne atome na površini, postaju bogate elektronima, što ih u nekom narednom procesu može učiniti pogodnim donorima. Iako se na osnovu XPS spektra azota ne može odrediti tačna uloga atoma azota, usled konstantnog transfera naelektrisanja između atoma kiseonika i atoma srebra, na atomima azota dolazi do narušavanja elektronske gustine, što dovodi do zaključka da se ovi atomi kroz različite elektron transfer reakcije moraju vratiti u stanje ravnoteže (Li J. i sar. 2009). Na osnovu svih ovih zapažanja, može se zaključiti da se stabilizacija nanočestica odigrava kroz neprestani transfer elektrona, pri čemu se vrednost hemijskog potencijala, odnosno Fermijeve energije mora održavati konstantnim u svim nanokompozitnim sistemima.

#### **7.6. Mikrostrukturalna analiza difrakcijom rendgenskih zraka (XRD)**

Mikrostrukturalna analiza kserogelova za Ag/PNiPAAm i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozite izvedena je metodom difrakcije X-zraka (XRD). Na osnovu dobijenih difrakcionih spektara, identifikacija kristalnih faza i odgovarajućih parametara elementarne ćelije ostvarena je poređenjem položaja i intenziteta detektovanih difrakcionih maksimuma sa odgovarajućim referentnim JCPDS difraktogramima makroskopskih kristala (JCPDS File No. 89-3722).



**Slika 7.10.** Difraktogrami Ag/PNiPAAm i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita.

Strukturalna analiza nanokompozita predstavlja važnu metodu karakterisanja, ako se uzme u obzir da srebro ima sposobnost oksidacije, formirajući na taj način okside ili sulfide, što uslovljava neželjena svojstva nanokompozita. Na Slici 7.10 (a,b i c) prikazani su difraktogrami za nanokompozite PNiPAAm-a koncentracije 5 mas.%, 10 mas.% i 15 mas.% sa tri koncentracije srebra 5, 10 i 50 mM  $\text{AgNO}_3$ , dok su difraktogrami nanokompozitnih sistema na bazi kopolimernih matrica P(NiPAAm/IK) i nanočestica srebra prikazani na Slici 7.10 (d). Na osnovu difraktograma se može uočiti da svi nanokompozitni uzorci imaju jasno definisane oštre pikove koji se javljaju kao posledica postojanja uređenih kristalnih domena. Maksimumi difrakcije se nalaze na položajima ugla  $2\theta$ :  $38^\circ$ ,  $44,2^\circ$ ,  $64,4^\circ$ ,  $77,6^\circ$  i  $81,6^\circ$  i odgovaraju Bragg-ovim refleksijama sa kristalnih ravni (111), (200), (220) i (311). Ovako indeksirane kristalne ravni

pripisane su površinski centriranoj kubnoj (*face-centred cubic* - *fcc*) strukturi nanočestica srebra (Khan M.A.M. i sar. 2011; Krklješ A. doktorska disertacija 2009). Odsustvo pikova za srebro-oksidi i srebro-sulfid ukazuju na postojanje čistog srebra, dok intenzivan pik (111) znači visok stepen kristaliničnosti. Takođe, može se primetiti da odnos intenziteta pika koji potiče od polimera ( $I_{polim}$ ,  $2\theta=28^\circ$ ) i pika koji potiče od kristalne ravni (111) ( $I_{111}$ ) opada sa povećanjem koncentracije srebra. Difraktogram prikazan na Slici 7.10 (b) pokazuje XRD spektar kserogela PNiPAAm-a, bez nanočestica srebra, na osnovu koga se uočava široki pik sa maksimumom difrakcije na uglu difrakcije  $2\theta=28^\circ$ . Veličina kristalita određena je primenom Debay-Sherrer-ove jednačine (Murali K.R. i sar. 2010; Mote V.D. i sar. 2012; Peppas N. i Merrill E. 1976):

$$D_{Sch} = \frac{k_c \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos\theta} \quad (7.1)$$

gde je  $k_c$  konstanta kubne strukture (0,9),  $\lambda$  talasna dužina X-zraka (0,1541 nm),  $\beta$  poluširina difrakcionog maksimuma i  $\theta$  ugao difrakcije. Vrednosti dobijenih veličina kristalita nanočestica srebra ( $D_{sch}$ ), izračunati na osnovu poluširine pikova koji odgovaraju Bragg-ovim refleksijama sa kristalnih ravni (111), (200), (220) i (311), prikazane su u Tabeli 7.4. U cilju detaljne mikrostrukturne analize inkorporiranih nanočestica srebra, kao i uticaja polimerne matrice na karakteristike nanočestica, određeni su sledeći parametri: veličina kristalita primenom Williamson-Hall i modifikovane Williamson-Hall metode ( $D_{WH}$  i  $D_{WHM}$ ), deformacija kristalita ( $\epsilon$ ), vrednost površinskog napona ( $\sigma$ ), međuravansko rastojanje ( $d$ ), parametar rešetke ( $a$ ) i gustina dislokacija ( $\delta_D$ ). Veličina kristalita korišćenjem Williamson-Hall i modifikovane Williamson-Hall metode je izračunati na osnovu poluširine pikova koji odgovaraju Bragg-ovim refleksijama sa kristalnih ravni (111), (200), (220) i (311), dok su vrednosti ostalih parametara izračunate na osnovu poluširine pika (111).

Deformacija kristalita je parametar koji uzima u obzir nesavršenosti unutar polimerne matrice i pruža informacije o tome da li su inkorporirane nanočestice izložene dejstvu određene vrste napona. Ovaj parametar utiče na širinu difrakcionog maksimuma, što je naročito značajano i uočljivo za nanočestice

manje od 100 nm. U zavisnosti od svojstava polimerne matrice, nanočestice mogu biti izložene kompresiji ili istezanju. Pod pretpostavkom da su veličina kristalita i deformacija kojoj su izložene međusobno zavisni parametri, kao i da zajedno utiču na širenje difrakcionog maksimuma, vrednosti ovih parametara su određeni primenom Williamson-Hall-ove jednačine (Mote V.D. i sar. 2012; Biju V. i sar. 2008; Paul R. i sar. 2012):

$$\beta \cos \theta = \frac{k_c \cdot \lambda}{D_{WH}} + 4\epsilon \sin \theta \quad (7.2)$$

odakle se veličina kristalita ( $D_{WH}$ ) određuje iz odsečka, a vrednost deformacije ( $\epsilon$ ) iz nagiba krive zavisnosti  $\beta \cos \theta$  od  $\sin \theta$ .

Pored deformacije, značajno je odrediti i vrednost površinskog napona ( $\sigma$ ) koji se javlja u kristalima tokom procesa rasta i kome su nanočestice izložene, a može se odrediti primenom modifikovane Williamson-Hall-ove metode predstavljene sledećom jednačinom (Mazhdi M. i sar. 2012):

$$\beta \cos \theta = \frac{k\lambda}{D_{WHM}} + \frac{4\sigma \sin \theta}{Y} \quad (7.3)$$

gde je  $Y$  teorijska vrednost Jungovog modula elastičnosti za srebro ( $Y_{Ag}=83$  GPa), dok su vrednosti površinskog napona ( $\sigma$ ) i veličina kristalita ( $D_{WHM}$ ) dobijeni iz nagiba i odsečka krive zavisnosti  $\beta \cos \theta$  u odnosu na  $\sin \theta$ , redom.

Međuravansko rastojanje ( $d$ ), parametar kristalne rešetke ( $a$ ) i gustina dislokacija ( $\delta_D$ ) su izračunati pomoću jednačina (7.4), (7.5) i (7.6) redom (Khan M.A.M. i sar. 2011; Venkata Subbaiah Y.P. i sar. 2006; Theivasanthi T. i Alagar M. 2012):

$$d = \frac{k \cdot \lambda}{2 \cdot \sin \theta} \quad (7.4)$$

$$a = d(h^2 + k^2 + l^2)^{1/2} \quad (7.5)$$

$$\delta_D = \frac{15\beta \cos \theta}{4aD_{Sch}} \quad (7.6)$$

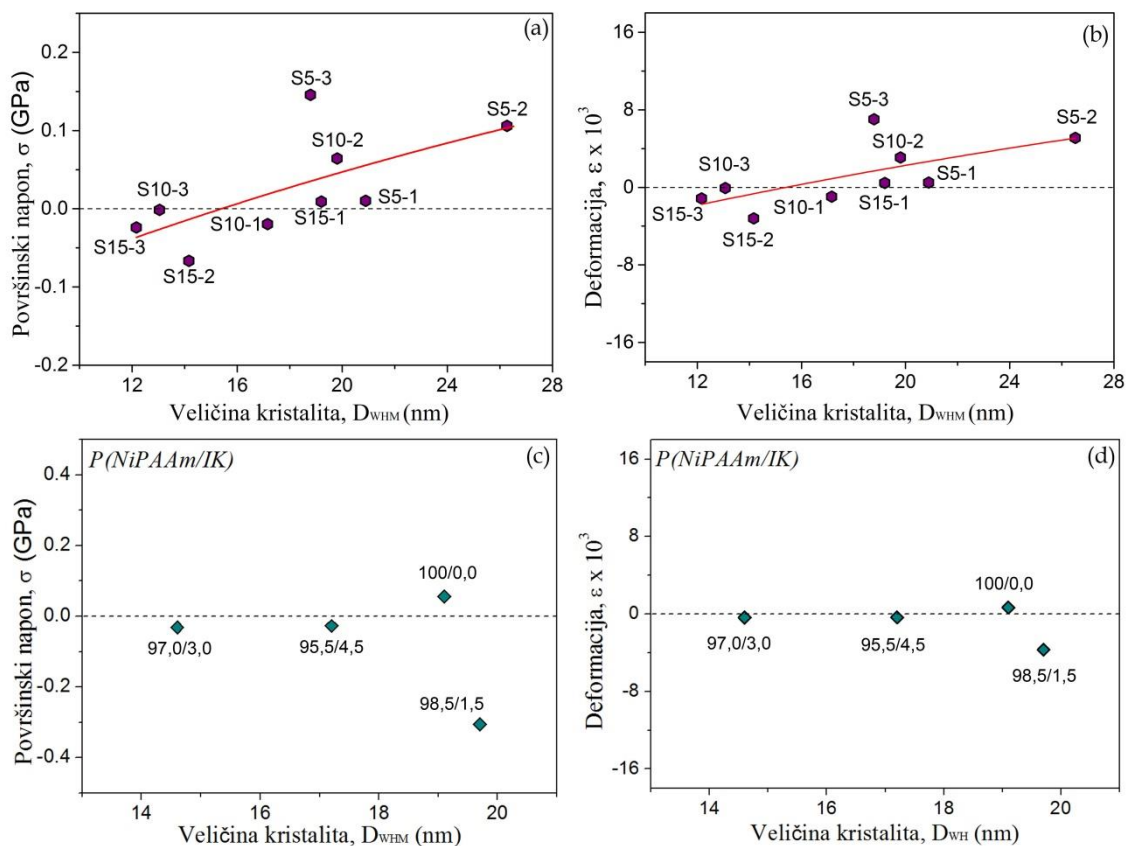
gde su  $h$ ,  $k$  i  $l$  su Milerovi indeksi određene kristalografske ravni. Dobijeni rezultati za sve sintetisane homo- i kopolimerne nanokompozite su prikazani u Tabeli 7.4 i na Slikama 7.11 i 7.12.

Prema rezultatima prikazanim u Tabeli 7.4 veličina kristalita,  $D_{Sch}$ , se smanjuje sa povećanjem koncentracije polimerne matrice koja u većim koncentracijama bolje stabilizira nanočestice i kontroliše rast kristala.

**Tabela 7.4.** Vrednosti parametara dobijenih XRD analizom.

<i>matrica</i>	$c(\text{AgNO}_3)$ , <i>mM</i>	<i>oznaka</i> <i>uzorka</i>	$D_{Sch}$ , <i>nm</i>	$a$ , <i>nm</i>	$d$ , <i>nm</i>
<b>PNiPAAm, %</b>					
<b>5</b>	5	S5-1	20,6	0,4098	0,213
	10	S5-2	18,4	0,4088	0,212
	50	S5-3	13,2	0,4097	0,213
<b>10</b>	5	S10-1	18,4	0,4089	0,237
	10	S10-2	16,5	0,4098	0,237
	50	S10-3	13,1	0,4096	0,237
<b>15</b>	5	S15-1	18,7	0,4082	0,212
	10	S15-2	16,8	0,4076	0,211
	50	S15-3	12,8	0,4082	0,212
<b>P(NiPAAm/IK)</b>					
<b>100/0,0</b>			16,5	0,4090	0,236
<b>98,5/1,5</b>	10	/	21,0	0,4094	0,237
<b>97,0/3,0</b>			16,0	0,4095	0,238
<b>95,5/4,5</b>			18,7	0,4100	0,237

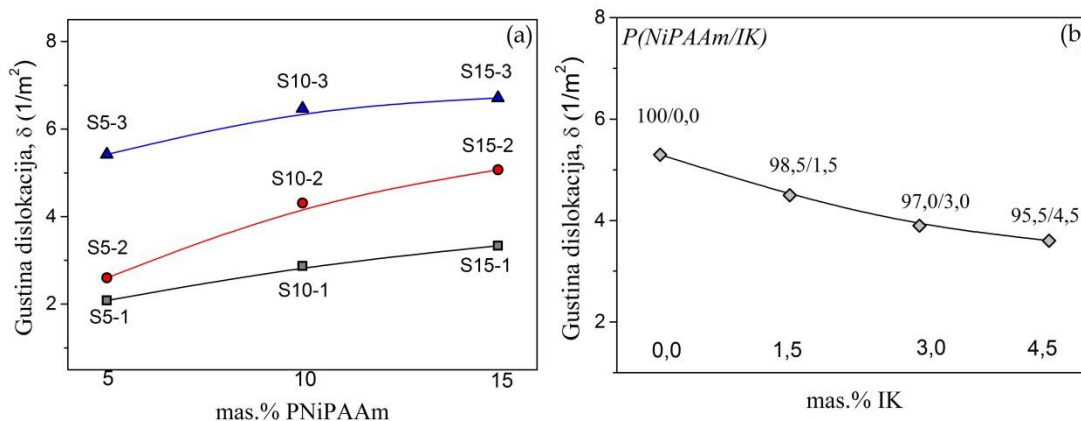
Isti efekat se uočava i sa porastom koncentracije nanočestica srebra, pa je tako najmanja vrednost veličine kristalita dobijena za polimernu matricu najveće koncentracije sa najvećom koncentracijom srebra (uzorak S15-3). Odstupanje prametra kristalne rešetke ( $a$ ) i međuravanskog rastojanja ( $d$ ) od tabličnih vrednosti za kompaktni materijal ( $a_0=0,4086$  i  $d_0=0,2355$  prema referentnom JCPDS difraktogramu za makroskopski kristal - JCPDS File No. 89-3722) ukazuju da su nanočestice izložene površinskom naponu što uzrokuje deformacije istezanja i kompresije, kao što je grafički prikazano na Slici 7.11.



**Slika 7.11.** Vrednosti površinskog napona i deformacije za nanokompozitne uzorke homopolimera (a i b) i kopolimera (c i d).

Na osnovu rezultata, može se uočiti da koncentracija monomera značajno utiče na vrednosti prikazanih parametara. Naime, u polimernim matricama manje koncentracije (5 mas.% PNiPAAm), vrednosti parametra rešetke pokazuju veće vrednosti u odnosu na tabličnu vrednost ( $a_0$ ), ukazujući da su u ovim uzorcima nanočestice izložene naponu koji izaziva istezanje kristalita ( $\sigma > 0$  i  $\epsilon > 0$ ). Suprotno tome, u polimernim matricama veće koncentracije (15 mas.% PNiPAAm) nanočestice pokazuju negativnu vrednost deformacije, što ukazuje da su izložene kompresiji ( $\sigma < 0$  i  $\epsilon < 0$ ) (Spasojević J. i sar. 2015a). Isti rezultat dobijen je i za kopolimerne uzorke sa IK, iako je koncentracija polimerne matrice (tj. procenat polimerne mreže, Tabela 7.3) u ovim uzorcima najmanja. Moguće objašnjenje ovakvog rezultata bi moglo biti prisustvo hidrofilnih grupa a samim tim i mogućnost većeg broja elektrostatičkih interakcija nego što je to slučaj u homopolimernim uzorcima PNiPAAm-a.





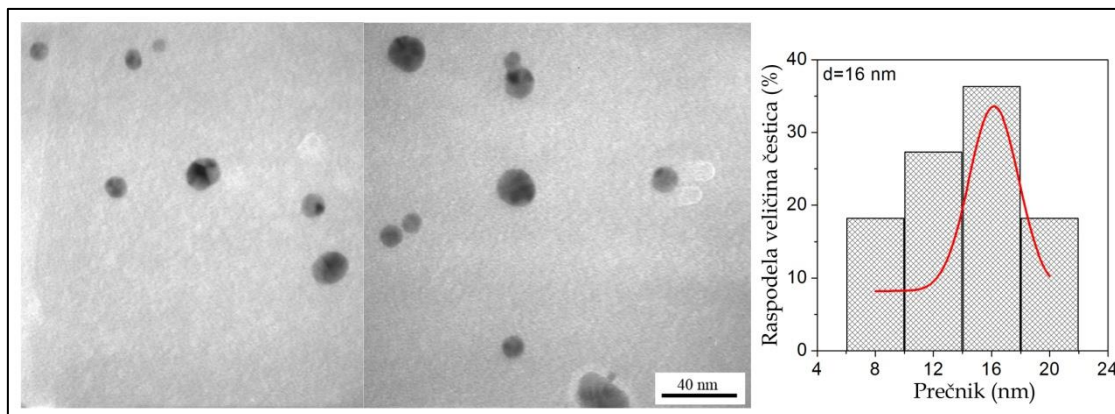
**Slika 7.12.** Gustina dislokacija za nanokompozitne uzorke homopolimera (a) i kopolimera (b).

Slika 7.12 prikazuje zavisnost gustine dislokacija od sastava i koncentracije polimerne matrice. Gustina dislokacija je parametar koji pruža informacije o nesavršenostima u nanokristalima srebra, pa su najveće vrednosti očekivano dobijene za uzorke sa većom koncentracijom polimerne matrice i većom koncentracijom nanočestica srebra.

## 7.7. Morfologija nanočestica srebra

### *Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM analiza)*

Jedna od najzastupljenijih metoda ispitivanja morfologije i raspodele veličina nanočestica jeste transmisiona elektronska mikroskopija. Na Slici 7.13 date su TEM mikrografije Ag nanočestica inkorporiranih u PNiPAAm hidrogel. Dobijeni rezultati pokazuju da su sintetisane nanočestice srebra sfernog oblika, da ne formiraju veće agregate i da im je uska raspodela veličina. Veličina nanočestica se, prema prikazanom histogramu, kreće u opsegu od 6 nm do 22 nm, pri čemu je srednja vrednost prečnika oko 16 nm.

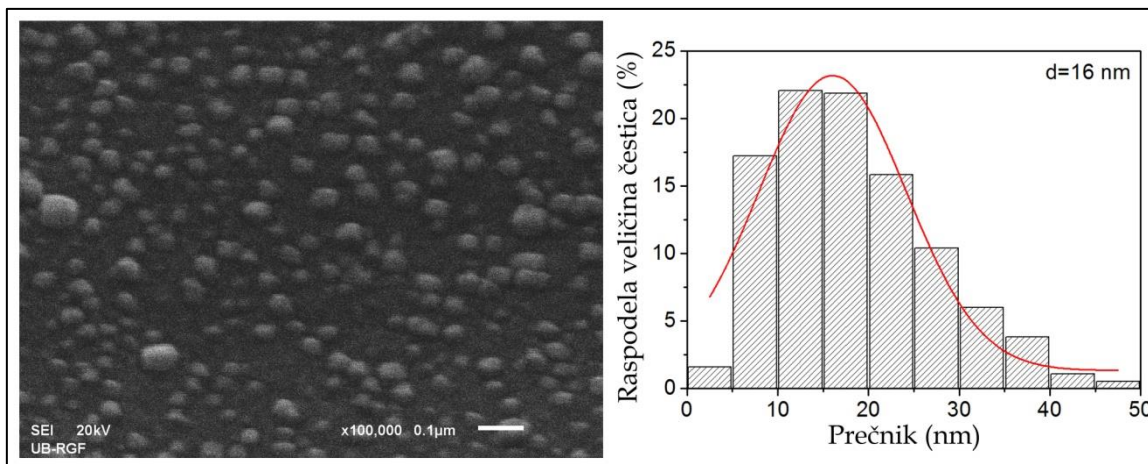


**Slika 7.13.** TEM mikrografija i raspodela veličine nanočestica srebra u 10 mM AgNO<sub>3</sub>/10 mas.% PNiPAAm nanokompozitu.

Rezultati dobijeni TEM analizom su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim modelovanjem UV-Vis spektara i XRD analizom.

#### *Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM analiza)*

SEM analiza nanokompozitnih sistema takođe je iskorišćena kako bi se ispitala morfologija i odredila veličina nanočestica srebra. Na Slici 7.14 prikazana je SEM mikrografija nanočestica srebra inkorporiranih u homopolimernu matricu PNiPAAm-a. Prilikom određivanja veličine nanočestica srebra, od vrednosti prečnika je oduzeta debljina sloja zlata koji je dobijen neparavanjem u procesu pripreme uzoraka za snimanje, a koji je iznosio oko 15 nm.



**Slika 7.14.** SEM mikrografija Ag(10mM)/10 mas.% PNiPAAm nanokompozita (a) i histogram raspodele veličine inkorporiranih nanočestica srebra (b).

Dobijeni rezultati pokazuju da su sintetisane čestice sfernog oblika, dok je srednja veličina određena iz raspodele veličina prikazanih na histogramu 16 nm, što je u skladu sa prethodno dobijenim rezultatima (Spasojević J. i sar. 2015a).

## 8. Mehanička svojstva hidrogelova i nanokompozita

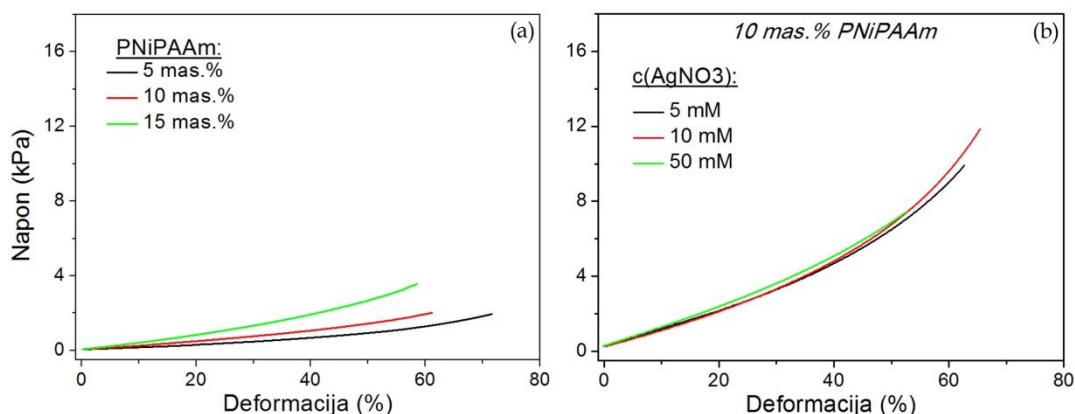
Kao što je već ranije napomenuto, uslov da bi hidrogelovi mogli biti primenjivani kao biomaterijali jeste postojanje odgovarajućih mehaničkih svojstava (Ratner B. i Hoffman A. 1976). Kada se hidrogelovi koriste kao nosači aktivnih supstanci, oni moraju imati stabilnu formu i postojanu strukturu. Ispitivanjem postojećih, kao i podešavanjem određenih mehaničkih svojstava moguće je sintetisati sistem željenih svojstava i u isto vreme proširiti opseg primene. U ovom radu ispitivana su mehanička svojstva sintetisanih hidrogelova i nanokompozita u statičkom i u dinamičkom režimu rada.

### 8.1. Ispitivanja u statičkom režimu rada

Mehanička svojstva u statičkom režimu rada ispitana su na termo-mehaničkom analizatoru u uslovima potencijalne primene ( $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , uzorci u nabubrelom stanju) pri čemu je primenjena sila kompresije. Ispitivanja su izvedena za sve sintetisane sisteme, PNiPAAm i P(NiPAAm/IK) hidrogelove i Ag/PNiPAAm i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozite. Parametri koji su izračunati na osnovu zavisnosti napon-deformacija su modul kompresibilnosti ( $E_c$ ), Jungov modul elastičnosti ( $E_y$ ), napon kidanja ( $\sigma_{fc}$ ) i deformacija pri kidanju ( $\varepsilon_{fc}$ ) (Ratner B i Hoffman A. 1976; Haraguchi K. i Li H.J. 2006; Nakayama A. i sar. 2004; Gong P.J. i sar. 2003). Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 8.1, a krive napon-deformacija na Slikama 8.1 i 8.2. Slika 8.1 prikazuje zavisnost napon-deformacija za PNiPAAm hidrogel i Ag/PNiPAAm nanokompozite, dok su na Slici 8.2 prikazane krive napon-deformacija za kopolimerne P(NiPAAm/IK) hidrogelove i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozite. Vrednost modula kompresibilnosti je određena iz nagiba početnog linearnog dela krive napon-deformacija, dok je modul elastičnosti izračunat prema sledećoj jednačini (Jovanović S. i Jeremić K. 2007):

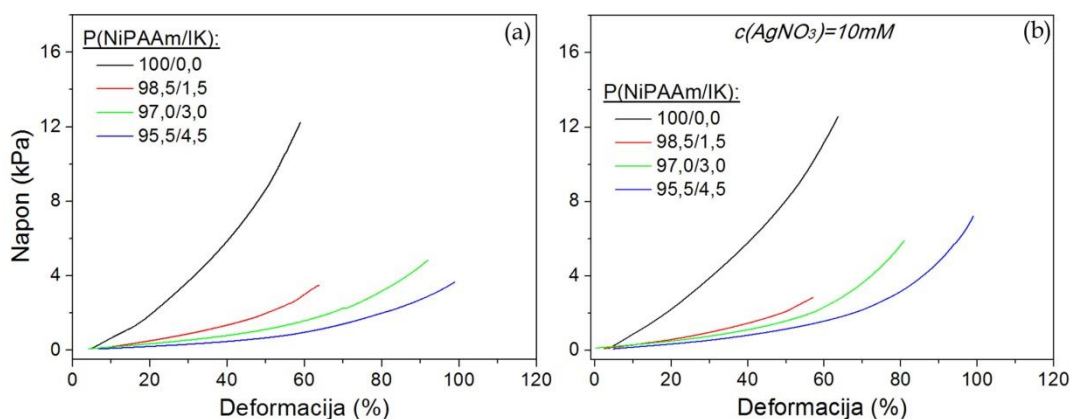
$$E_y = 3E_c(1 - 2\mu) \quad (8.1)$$

gde je  $\mu$  Poasonov koeficijent ( $\mu=0,3$  za hidrogelove blizu LCST-a).



**Slika 8.1.** Zavisnost napon-deformacija za PNiPAAm hidrogelove (a) i Ag/PNiPAAm nanokompozite (b).

Iz prikazanih rezultata je utvrđeno da koncentracija PNiPAAm-a u polimernoj matrici značajno utiče na mehanička svojstva, pa tako matrica najveće koncentracije (15 mas.%) pokazuje višestruko povećanje modula kompresibilnosti, uz istovremenu sposobnost da za istu silu primenjenu na sve uzorke pretrpi najmanju deformaciju. Pored koncentracije monomera u polimernoj matrici, na mehanička svojstva se može uticati i kopolimerizacijom, a uticaj udela IK je prikazan na Slici 8.2 (a). Prikazane zavisnosti napona od deformacije jasno pokazuju da uvođenje IK kao hidrofilne komponente značajno slabi mehanička svojstva, što je verifikovano kroz izračunate parametre (Tabela 8.1). U odnosu na uzorak bez IK (100/0,0), hidrogel sa najviše IK (95,5/4,5) ima 10 puta manji modul kompresibilnosti, dok pri primeni iste sile trpi daleko veću deformaciju. Ukoliko se na ova dva uzorka primeni sila od 2 kPa hidrogel 100/0,0 će pretrpeti deformaciju od 20%, dok će se za istu silu hidrogel 95,5/4,5 deformisati 80%. Imajući u vidu planiranu primenu, ispitan je uticaj prisustva nanočestica srebra na mehanička svojstva hidrogelova (Slike 8.1 (b) i 8.2 (b)).



**Slika 8.2.** . Uticaj udela IK (a) i prisustva nanočestica (b) na zavisnost napon-deformacija.

Rezultati prikazani u Tabeli 8.1 ukazuju da inkorporacija nanočestica srebra poboljšava mehanička svojstva materijala, pa su tako najveće vrednosti modula kompresibilnosti dobijene za nanokompozitne sisteme. Zahvaljujući različitim

vrstama veza koje grade sa delovima polimernog lanca, nanočestice doprinose stabilnosti matrice jer deluju kao dodatno umreženje. Sila potrebna da dođe do pucanja mreže (napon kidanja,  $\sigma_{fc}$ ) je najveća za uzorak Ag/100/0, dok je za skoro potpunu deformaciju (99%) uzorka nanokompozita Ag/95,5/4,5 potrebna dva puta veća sila nego za isti uzorak bez nanočestica srebra. Dobijeni rezultati ukazuju da prisustvo nanočestica srebra unutar polimerne matrice deluje kao ojačanje, što je još jedna od značajnih karakteristika ovog sistema.

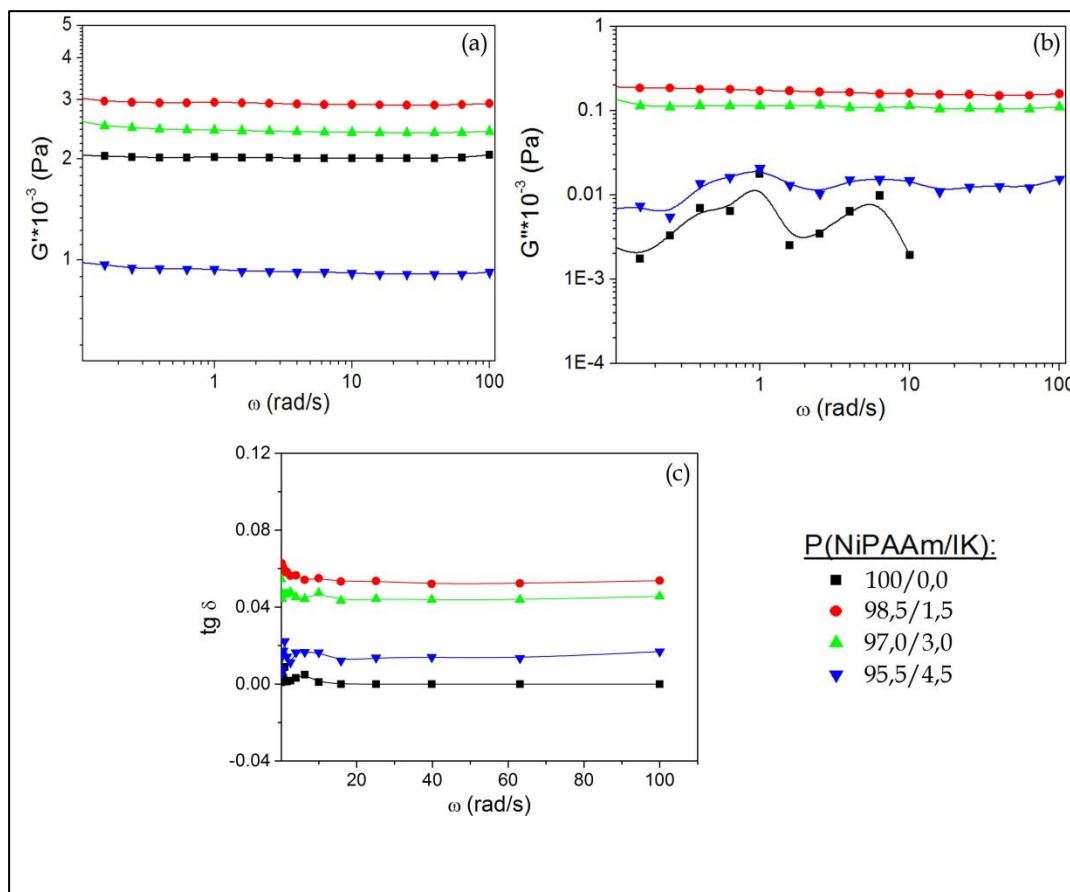
**Tabela 8.1.** Karakteristični parametri dobijeni mehaničkom analizom u statičkom režimu.

Matrica	$c(\text{AgNO}_3)$ , mM	$E_c$ , kPa	$E_y$ , kPa	$\sigma_{fc}$ , kPa	$\varepsilon_{fc}$ , %
<b>PNiPAAm, %</b>					
5	/	1,2	1,4	1,9	71,7
10		2,0	2,4	2,0	61,2
15		3,4	4,1	3,6	58,5
10	5	9,4	11,3	9,9	62,7
	10	9,1	10,9	11,9	65,3
	50	10,3	12,3	7,5	52,6
<b>P(NiPAAm/IK)</b>					
100/0,0	/	10,8	13,0	12,2	58,9
98,5/1,5		2,2	2,6	3,4	62,0
97,0/3,0		1,7	2,0	4,8	91,6
95,5/4,5		1,1	1,3	3,7	98,7
<b>Ag/P(NiPAAm/IK)</b>					
100/0,0	10	12,5	15,0	12,6	63,8
98,5/1,5		2,8	3,4	2,8	57,0
97,0/3,0		2,0	2,4	5,9	81,2
95,5/4,5		1,8	2,2	7,5	99,7

Rezultati statičke analize mehaničkih svojstava sintetisanih sistema pokazuju da na mehanička svojstva utiču koncentracija polimerne matrice, udeo kopolimerne komponente, kao i prisustvo nanočestica (Spasojević J. i sar. 2015b). Pažljivim odabirom komponenti polimerne matrice u kombinaciji sa odgovarajućom koncentracijom nanočestica moguće je postići optimalan odnos između elastičnosti, mekoće i odsustva mehaničke iritacije po okolno tkivo što je zahtev koji hidrogelovi moraju ispuniti kada se koriste u *in vivo* uslovima.

## 8.2. Ispitivanja u dinamičkom režimu rada

Dinamičko-mehanička analiza (DMA) sintetisanih P(NiPAAm/IK) kopolimernih hidrogelova u nabubrelom stanju izvedena je u linearnoj viskoelastičnoj oblasti i pri tome je određen modul sačuvane ( $G'$ ) i izgubljene energije ( $G''$ ), kao i faktor prigušenja ( $tg\delta=G''/G'$ ) u funkciji ugaone brzine ( $\omega$ ). Zavisnosti  $G'$ ,  $G''$  i  $tg\delta$  od ugaone brzine su prikazane na Slici 8.3, dok su vrednosti dinamičko-mehaničkih parametara ( $G'$ ,  $G''$  i  $tg\delta$ ) prikazane u Tabeli 8.2.



**Slika 8.3.** Zavisnost modula  $G'$  (a),  $G''$  (b) i  $tg\delta$  (c) od ugaone brzine za P(NiPAAm/IK) hidrogelove.

Na osnovu Slike 8.3 se vidi da su moduli  $G'$  i  $G''$  nezavisni od ugaone brzine za sve uzorke, kao i da udeo IK ima značajan uticaj na mehanička svojstva. U slučaju kopolimernih uzorkak, modul sačuvane energije opada kako raste

sadržaj itakonske kiseline, dajući slabija mehanička svojstva hidrogelovima. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa rezultatima bubrenja za kopolimerne hidrogelove na 25 °C. Veća vrednost modula je dobijena za uzorke koji manje bubre (Spasojević J. i sar. 2015b).

*Tabela 8.2. Karakteristični parametri izračunati iz dinamičko-mehaničke analize.*

<i>P(NiPAAm/IK)</i>	<i>G', Pa</i>	<i>G'', Pa</i>	<i>tgδ</i>
<b>100/0,0</b>	2013	2,12	0,0017
<b>98,5/1,5</b>	2919	161,9	0,0599
<b>97,0/3,0</b>	2392	104,4	0,0442
<b>95,5/4,5</b>	917	14,9	0,0168

Iako je studijom bubrenja u vodi na 25 °C utvrđeno da najmanji stepen bubrenja ima homopolimerni PNiPAAm hidrogel, on nije pokazao najveći modul sačuvane energije. Jedno od mogućih objašnjenja može biti delimično krta struktura hidrogelova na bazi čistog PNiPAAm-a. Uvođenje IK u strukturu polimerne mreže povećava elastičnost, a samim tim i otpornost na smicanje. Kao što je ranije i napomenuto, u zavisnosti od potencijalne primene potrebno je postići optimalni sadržaj hidrofilne komponente koji će obezbediti zadovoljavajuću mehaničku otpornost uz istovremeno neophodnu kontrolu difuzije.



## 9. Biomedicinski potencijal Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita

Rezultati prikazani u prethodnim poglavljima pokazuju da je uspešno izvedena sinteza nanokompozita na bazi homo- i kopolimernih matrica kao nosača i nanočestica srebra kao punioca. Potencijalna biomedicinska primena uslovlila je sintezu termo- i pH-oseljivih polimernih matrica, a inkorporirane nanočestice srebra su željenih karakteristika (oblika i veličine), koje se mogu varirati u širokom opsegu.

Međutim, u cilju predviđanja primene u *in vivo* uslovima, potrebno je utvrditi da li sintetisani nanokompoziti imaju očekivani biomedicinski potencijal. U ovom poglavlju, kroz eksperimente otpuštanja srebra i testove antimikrobnog potencijala i citotoksičnosti, biće pokazano da sintetisani sistemi zaista imaju mogućnost biomedicinske primene.

### 9.1. Otpuštanja jona srebra iz Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita u *in vitro* uslovima

Eksperimenti otpuštanja jona srebra u *in vitro* uslovima izvedeni su za Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozite, u rastvoru pufera na pH=7,40 i temperaturi od 37 °C. Dobijeni rezultati su prikazani kao količina otpuštenih jona srebra u jedinicama µg/ml (ppm) po gramu hidrogela i po danu (Tabela 9.1). Nakon četiri dana, uzorci hidrogela su potopljeni u rastvor HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O (1:1) radi potpune oksidacije preostale količine nanočestica srebra. Sabiranjem ove vrednosti sa vrednostima dobijenim prethodna četiri dana određena je totalna koncentracija jona srebra po gramu hidrogela ( $c_{tot}$ ).

**Tabela 9.1.** Kumulativno in vitro oslobađanje  $Ag^+$ -jona iz  $Ag/P(NiPAAm/IK)$  nanokompozita.

Kumulativno oslobođeni $Ag^+$ -joni po masi hidrogela (ppm/g)				
<i>t, dani</i>	100/0,0	98,5/1,5	97,0/3,0	95,5/4,5
<b>1</b>	262	244	173	170
<b>2</b>	306	290	228	210
<b>3</b>	332	326	256	240
<b>4</b>	354	355	281	269
<b><math>C_{tot}</math></b>	591	481	395	344

Na osnovu prikazanih vrednosti, može se videti da najveću vrednost totalne koncentracije jona srebra pokazuje uzorak 100/0,0, a najmanju uzorak sa najvećim udelom IK. Ovakav rezultat ukazuje da količina srebra unutar polimerne matrice ne zavisi od početne zapremine rastvora srebro nitrata koja se nalazi unutar polimerne matrice u trenutku izlaganja dejstvu gama zračenja. Naime, iako ima najmanji stepen bubrenja (a samim tim i najmanju zapreminu rastvora  $AgNO_3$ ), uzorak 100/0,0 pokazuje najveću vrednost totalne koncentracije. Više je razloga zbog kojih je ovakav rezultat očekivan. Uzorak 100/0,0 ima najveći stepen umreženja (Tabele 7.1 i 7.2) kao i najveći procenat mreže u odnosu na zapreminu, što je pokazano  $\mu$ -CT analizom (Tabela 7.3). Sve to je uslovalo dobijanje većeg broja nanočestica manjih dimenzija, najveće specifične površine, a samim tim i najveće rastvorljivosti. Pored totalne koncentracije, uspešno dizajniranje materijala zadovoljavajuće antimikrobne efikasnosti podrazumeva i precizno modelovanje procesa otpuštanja sa vremenom. Slika 9.1 (a) pokazuje da je proces otpuštanja nelinearan, te da se ne može opisati kinetikom prvog reda. Iz tog razloga su za opis procesa otpuštanja jona srebra korišćeni teorijski farmakokinetički modeli: Korsmeyer-Peppas, Higuchi, Hixon-Crowell, Kopcha i Makoid-Banakar model (Aydın R.S.T. i Mehlika P. 2011; Khamanga S.M. i sar. 2009; Sharma R. i sar. 2011; Krstić J. i sar. 2014a).

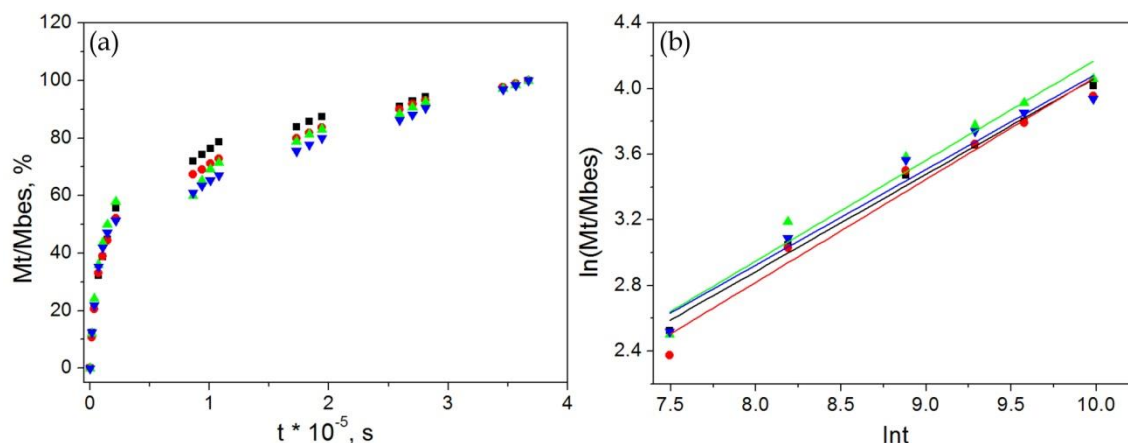
Korsmeyer-Peppas-ov model omogućava određivanje koeficijenta difuzije otpuštanja  $Ag^+$ -jona i može se opisati sledećom jednačinom:

$$\frac{M_t}{M_{bes}} = k_{kp} \cdot t^n \quad (9.1)$$

gde je  $M_t$  količina otpuštenih jona srebra u trenutku  $t$ ,  $M_{bes}$  količina srebra u hidrogelu u stanju ravnoteže,  $k_{kp}$  je Korsmeyer-Peppas-ova konstanta i  $n$  karakteristični eksponent. Logaritmovanjem jednačine 9.1, vrednost eksponenta  $n$  se određuje iz nagiba, dok se iz odsečka određuje  $k_{kp}$ . Za slučaj kada je vrednost eksponenta  $n$  između 0,45 i 0,85, koeficijent difuzije jona srebra se može odrediti korišćenjem jednačine:

$$D_d = \frac{(nagib)^2 \cdot \pi \cdot (\delta)^2}{16} \quad (9.2)$$

gde je  $\delta$  debljina hidrogela.



**Slika 9.1.** Matematičko modelovanje oslobađanja  $Ag^+$ -jona iz

$Ag/P(NiPAAm/IK)$  nanokompozita: kumulativno oslobođeni  $Ag^+$ -joni (a) i određivanje koeficijenta difuzije jona srebra po modelu Korsmeyer-Peppas (b).

Ostali modeli se mogu opisati sledećim jednačinama, Higuchi (jed. 9.3), Hixson-Crowel (jed. 9.4), Kopcha (jed. 9.5) i Makoid-Banakar (jed. 9.6):

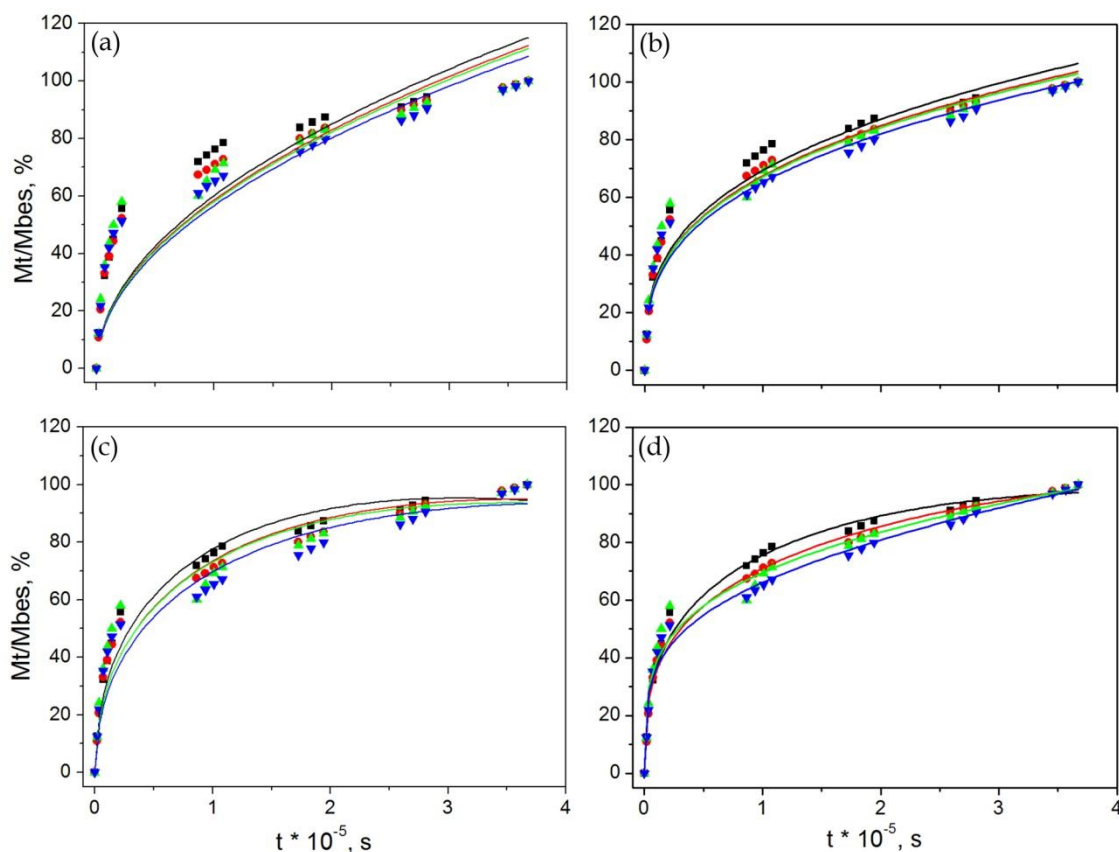
$$\frac{M_t}{M_{bes}} = k_h \cdot t^{1/2} \quad (9.3)$$

$$\left(\frac{M_t}{M_{bes}}\right)^{1/3} = k_{hc} \cdot t \quad (9.4)$$

$$\frac{M_t}{M_{bes}} = A \cdot t^{1/2} + B \cdot t \quad (9.5)$$

$$\frac{M_t}{M_{bes}} = k_{mb} \cdot t^{n_{MB}} \cdot e^{-ct} \quad (9.6)$$

U prikazanim jednačinama parametri  $k_h$ ,  $k_{hc}$  i  $k_{mb}$  su konstante brzine difuzije, dok su  $A$ ,  $B$ ,  $c$  i  $n_{MB}$  karakteristični parametri u prikazanim modelima. Rezultati modelovanja (Slika 9.2) pokazuju da se proces otpuštanja  $Ag^+$ -jona može opisati prikazanim modelima, pri čemu je najbolje slaganje dobijeno primenom Kopcha i Makoid-Banakar modela.



**Slika 9.2.** Matematičko modelovanje oslobađanja  $Ag^+$ -jona iz  $Ag/P(NiPAAm/IK)$  nanokompozita: Higuchi (a), Hixson-Crowel (b), Kopcha (c) i Makoid-Banakar (d).

Vrednosti parametara koji su određeni modelovanjem procesa otpuštanja prikazani su u Tabeli 9.2. Primenom Korsmeyer-Peppas-ovog modela izračunate vrednosti karakterističnog eksponenta  $n$  se kreću od 0,58 do 0,63 (ne Fick-ova difuzija), što znači da su uticaji procesa difuzije i relaksacije polimernih lanaca izjednačeni. Koeficijent difuzije ( $D_d$ ) ima najmanju vrednost za uzorak 100/0,0 i dalje raste sa porastom udela IK. Ovaj rezultat je očekivan

imajući u vidu da se proces otpuštanja ispituje na 37 °C, što je iznad LCST za uzorak Ag/100/0,0. Samim tim, uzorak je u potpuno kontrahovanom stanju, pa je difuzija otežana. Kod kopolimernih uzoraka prisustvo IK dovodi do širenja polimerne mreže pa i vrednost koeficijenta difuzije linearno raste sa porastom udela IK. Hixson-Crowell ( $k_{hc}$ ) model ukazuje kako se oslobađanje  $Ag^+$ -jona menja sa specifičnom površinom i veličinom nanočestica u toku vremena. Primenom Kopcha modela za sve ispitivane uzorke, parametar  $A$  ima daleko veću vrednost u odnosu na parametar  $B$ , te je proces oslobađanja  $Ag^+$ -jona iz nanokompozita difuziono kontrolisan. Makoid-Banakar model na osnovu vrednosti dobijenih parametara pokazuje da vrednost parametra  $n_{MB}$  opada sa porastom udela IK. Manja vrednost parametra  $n_{MB}$  daje brži porast Makoid-Banakar funkcije, i samim tim brže otpuštanje  $Ag^+$ -jona.

Tabela 9.2. Rezultati modelovanja oslobađanja  $Ag^+$ -jona.

Uzorak P(NiPAAm/IK)	Korsmeyer- Peppas		Higuchi	Hixson- Crowel	Kopcha		Makoid- Banakar	
	$k_{kp}$ , %/s <sup>n</sup>	$D_d \times 10^4$ , cm <sup>2</sup> /s	$k_{lv}$ %/s <sup>1/2</sup>	$k_{hc}$ , %/s <sup>1/3</sup>	$A$	$B \times 10^4$	$k_{mb}$ , %/s	$n_{MB}$
100/0,0	0,16	4,97	0,190	1,55	0,34	-3,09	1,52	0,35
98,5/1,5	0,11	5,44	0,186	1,51	0,31	-2,61	1,91	0,32
97,0/3,0	0,14	7,70	0,184	1,49	0,31	-2,66	3,58	0,26
95,5/4,5	0,18	8,45	0,180	1,46	0,29	-2,29	3,51	0,25

## 9.2. Ispitivanje baktericidnog dejstva nanokompozita

Ispitivanje antibakterijskog potencijala Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita je izvedeno difuzionom test metodom i metodom merenja optičke gustine na Gram-negativne (*Escherichia coli* - E.C.) i Gram-pozitivne bakterije (*Staphylococcus aureus* - S.A.).

### 9.2.1. Difuziona test metoda

Uzorci korišćeni u ovom testu su bili dimenzija  $8\pm 1$  mm u prečniku i  $4\pm 1$  mm debljine. S obzirom da se kao podatak nakon *in vitro* otpuštanja  $\text{Ag}^+$ -jona dobija količina srebra po gramu hidrogela u uzorcima nanokompozita (ppm/gHG), uzorci su sintetisani tako da količina srebra u uzorcima u proseku iznosi  $250\pm 15$  ppm. Imajući u vidu da ispitivani sistem Ag/P(NiPAAm/IK) nije do sada proučavan, cilj ovog eksperimenta je bio da se ispita da li srebro otpušteno iz ovih sistema ima baktericidno dejstvo. Količina ili koncentracija srebra u uzorcima odgovara, prema podacima iz literature, koncentracijama koje se koriste za topikalnu primenu za zarastanje rana i lečenje težih oblika infekcija u dijabetologiji (Krstić J. i sar. 2014a; Jain J. i sar. 2009; Harges J. i sar. 2007).



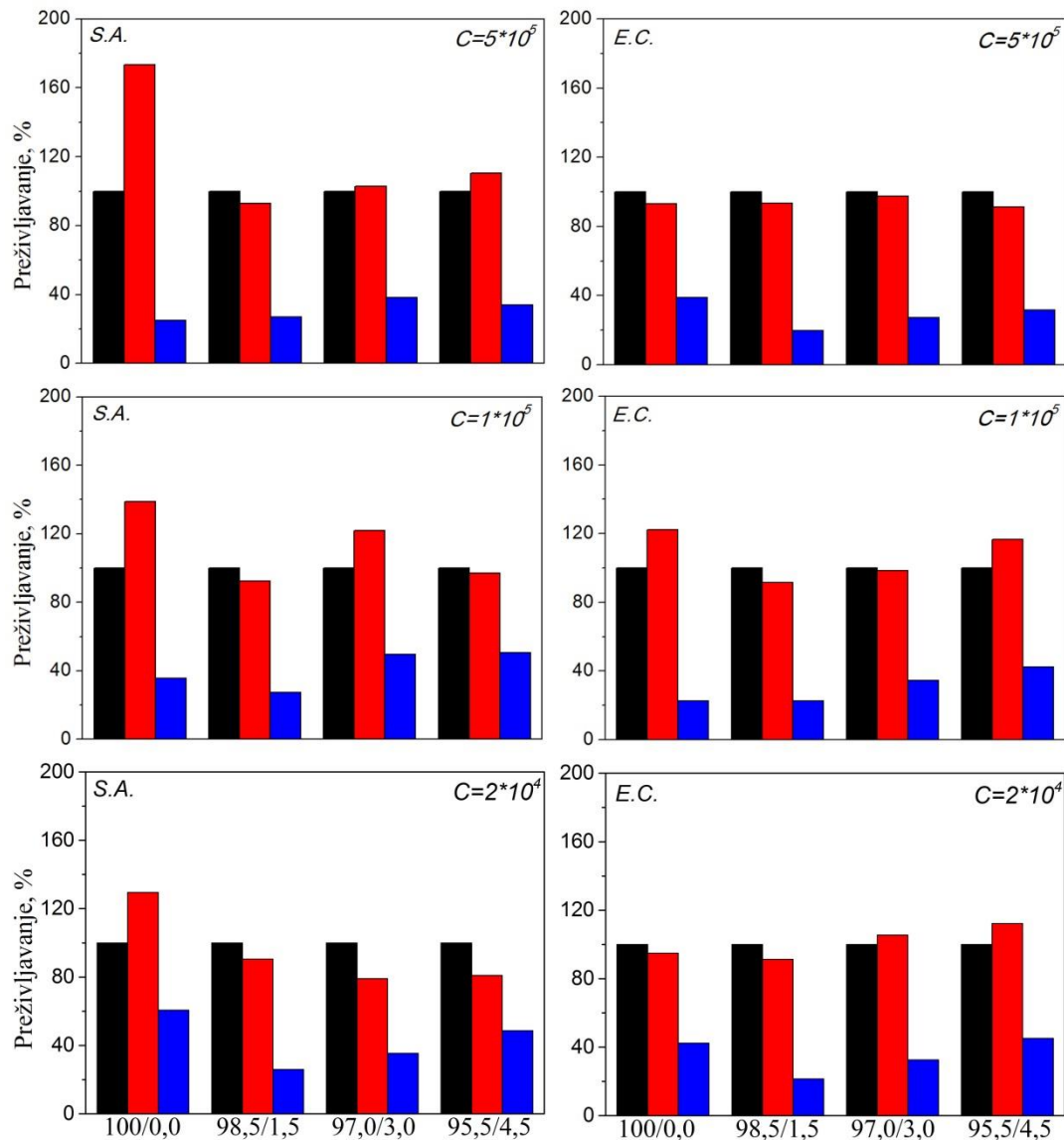
**Slika 9.3.** Antibakterijska aktivnost Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita.

Kao što se može videti sa Slike 9.3 kontrolni uzorci hidrogelova bez srebra (100/0,0 i 95,5/4,5) ne pokazuju zonu inhibicije. Nakon inkubacije od 24 h na 37 °C svi ispitivani nanokompozitni uzorci su pokazali baktericidno dejstvo na obe bakterije, pri čemu je zona inhibicije za *Staphylococcus aureus* (oko 15 mm) nešto veća u odnosu na zonu inhibicije za *Escherichia coli* (oko 13,5 mm) (Spasojević J. i sar. 2015b).

### 9.2.2. Metoda merenja optičke gustine

Nakon što je utvrđeno da Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompoziti pokazuju antibakterijsku aktivnost, sledeći korak je podrazumevao fino podešavanje baktericidnog dejstva u kontaktu sa Gram-negativnim (*Escherichia coli*) i Gram-pozitivnim bakterijama (*Staphylococcus aureus*). U ovu svrhu sintetisani su uzorci koji su sadržali  $10 \pm 3$  ppm Ag<sup>+</sup>-jona, što je prema literaturi, koncentracija koja bi trebalo da pokaže baktericidno dejstvo, a da se pri tome ostane ispod granice citotoksičnosti (Krstić J. i sar. 2014a; Jain J. i sar. 2009; Hardes J. i sar. 2007). Analiza antimikrobne aktivnosti nanokompozita izvedena je određivanjem procenta preživelih bakterija u kontaktu sa uzorcima nanokompozita u trajanju od 24 h, merenjem optičke gustine. Analizirane su tri različite koncentracije za svaki soj bakterija, a rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna merenja.





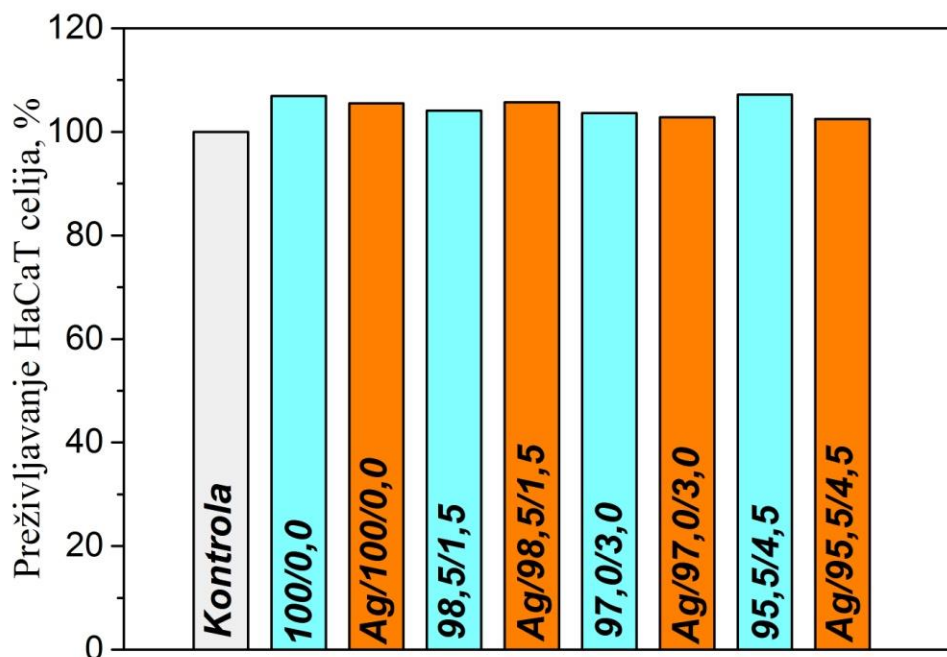
**Slika 9.4.** Procenat preživelih bakterija *S. aureus* i *E. coli* nakon kontakta sa uzorcima hidrogela i nanokompozita (●-kontrola, ●-hidrogel, ●-Ag/hidrogel, dok je sa C označena koncentracija ispitivanih bakterija)

Na Slici 9.4 je prikazan procenat preživelih bakterija nakon kontakta sa P(NiPAAm/IK) hidrogelovima i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozitima. Prisustvo matrica hidrogelova uglavnom ne utiče na procenat preživelih bakterija, osim u slučaju PNiPAAm homopolimerne matrice, gde dolazi do proliferacije *S. aureus* bakterije. Sa prikazanih dijagrama uočeno je da nije bilo značajne razlike pri dejstvu nanokompozita na suspenzije bakterija različitih

koncentracija. Svi uzorci su pokazali jako dobru antibakterijsku aktivnost posle samo 24 h od trenutka izlaganja, tj. dejstvo  $\text{Ag}^+$ -jona iz ispitivanih uzoraka dovelo je do smanjenja preživljavanja bakterija od 20% do 60%. Veći procenat redukcije ostvaren je u slučaju *E.Coli* za sve ispitivane uzorke. Razlog za veću antimikrobnu efikasnost leži u građi i funkcionalnosti ćelijskog zida Gram-negativnih bakterija, kao što je objašnjeno u teorijskom delu. Interesantan rezultat koji se izdvaja jeste da kopolimerni uzorak Ag/P(NiPAAm/IK) u odnosu 98,5/1,5 pokazuje najsnažniji baktericidni efekat za obe bakterije i sve ispitivane koncentracije. Imajući u vidu da ispitivani sistemi do sada nisu sintetisani, ne postoje literaturni podaci sa kojima bi se dobijeni rezultati mogli uporediti. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da svi sintetisani Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozitni sistemi predstavljaju efikasan antimikrobni agens.

### 9.3. Citotoksičnost Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita

Iako su uzorci nanokompozita pokazali zadovoljavajuće baktericidno dejstvo u okviru terapijski dozvoljenih doza, za njihovu potencijalnu primenu je neophodno pokazati da nisu štetni po okolno tkivo. Zbog toga je ispitana citotoksičnost sintetisanih Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita dejstvom na HaCaT ćelijsku liniju (zdravi humani keratinociti). Za izvođenje ovog testa korišćeni su uzorci identični uzorcima na kojima je izvršen test antimikrobne aktivnosti opisan u prethodnom eksperimentu, što znači da je koncentracija jona srebra čije se dejstvo ispituje u svim uzorcima iznosila  $10 \pm 3$  ppm.



**Slika 9.5.** Procenat preživelih HaCaT ćelija pri kontaktu sa uzorcima hidrogelova i nanokompozita.

Na Slici 9.5 su prikazani rezultati preživljavanja keratinocitnih ćelija kože u prisustvu Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita u odnosu na kontrolne uzorke P(NiPAAm/IK) hidrogelove. Na osnovu testa citotoksičnosti može se izvesti zaključak da P(NiPAAm/IK) hidrogelovi i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompoziti ne dovode do smanjenja preživljavanja ispitivanih ćelijskih kultura, što ih čini pogodnim za biomedicinsku primenu u fiziološkim uslovima u okviru sigurnih terapijskih koncentracija.

# *Poglavlje IV*

## *Zaključak*

## 10. Zaključak

U okviru ove doktorske disertacije uspešno su sintetisani nanokompozitni sistemi na bazi polimernih matrica i nanočestica srebra.

U prvom delu, radijaciono-hemijskom metodom pod dejstvom gama zračenja izvedena je sinteza homo- i kopolimernih matrica (hidrogelova) *N*-izopropilakrilamida i itakonske kiseline. Drugi stupanj obuhvatio je *in situ* sintezu nanočestica srebra, koja je izvedena redukcijom jona srebra metodom gama zračenja, unutar prethodno sintetisane polimerne matrice.

Polimerne matrice su karakterisane ispitivanjem kinetike bubrenja pri različitim uslovima, FTIR, SEM,  $\mu$ -CT analizama, kao i detaljnom mehaničkom analizom. Optička svojstva nanokompozita su ispitana UV-Vis metodom i teorijskim modelovanjem, dok je detaljna strukturna karakterizacija nanočestica srebra izvedena primenom XRD, XPS, SEM, TEM, FTIR analizama. Biomedicinski potencijal i mogućnost primene sintetisanih nanokompozitnih sistema, ispitana je određivanjem antibakterijske aktivnosti na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, kao i testom citotoksičnosti prema HaCaT ćelijama kože.

Na osnovu rezultata ispitivanja došlo se sledećih zaključaka:

- Izabrana radijaciono-hemijska metoda sinteze upotrebom gama zračenja je odgovarajuća jer daje visoke prinose sa željenim odnosom komonomernih komponenti i bez neproreagovanih materija, uz mogućnost kontrole veličine i distribucije nanočestica unutar polimernih matrica.
- Apsorpcionim spektrima nanokompozita utvrđeno je da su nanočestice srebra uspešno sintetisane, da su sfernog oblika i da pokazuju karakteristični maksimum plazmonske apsorpcije na oko 400 nm. Primenom kvazi-statičke aproksimacije Mie-ove teorije pokazano je da se veličina nanočestica kreće u opsegu poluprečnika do 10 nm. Sa porastom koncentracije i stepena umreženja polimerne matrice veličina nanočestica opada, dok se istovremeno specifična površina i rastvorljivost nanočestica

---

povećavaju. Uvođenje IK u polimernu matricu utiče na povećanje veličine nanočestica.

- Svi sintetisani sistemi su termo- i pH-osetljivi. Na kapacitet bubrenja i difuzione karakteristike utiču koncentracija monomera, udeo hidrofilne komponente (IK), stepen umreženja, prisustvo nanočestica srebra, kao i pH-vrednost i temperatura okolnog medijuma. Prisustvo IK dovodi do povećanja kapaciteta bubrenja i veličine pora, uz istovremeno smanjenje stepena umreženja. Takođe, sa povećanjem udela IK menja se temperatura faznog prelaza od 30 °C do 42 °C, čime se proširuje opseg primene. S druge strane, inkorporacija nanočestica srebra dovodi do smanjenja kapaciteta bubrenja i temperature faznog prelaza u kopolimernim uzorcima, što pruža mogućnost finog podešavanja ovih parametara.
- Svi uzorci imaju poroznu strukturu i sličnu morfologiju, a veličina pora zavisi od sastava hidrogelova. Na osnovu SEM i mikro-CT analize zaključeno je da sintetisani uzorci pripadaju grupi makroporoznih hidrogelova. Mikroskopskom analizom nanokompozitnih sistema pokazano je da su inkorporirane nanočestice sfernog oblika, sa prečnikom do 16 nm.
- Nanočestice srebra poseduju površinski centriranu kubnu (*fcc*) kristalnu strukturu, što je utvrđeno mikrostrukturnom analizom (XRD). Polimerne matrice većih koncentracija i stepena umreženja bolje stabilišu nanočestice srebra i kontrolišu rast kristala, pa su tako najmanje veličine kristalita dobijene za nanočestice inkorporirane u polimernu matricu najveće koncentracije (15 mas.% PNiPAAm). Takođe treba naglasiti, da povećanje koncentracije polimerne matrice i koncentracije nanočestica srebra dovodi do pojave nesavršenosti u kristalima koji bivaju izloženi sili kompresije, pa je gustina dislokacija najveća upravo u slučaju ovih uzoraka. S druge strane, uvođenje IK u polimernu matricu dovodi do povećanja veličine kristalita.
- Polimerni lanci poseduju sposobnost stabilizacije inkorporiranih nanočestica srebra. Srebro se ponaša kao akceptor elektrona, dok se atom

kiseonika iz polimernih lanaca ponaša kao donor. Stabilizacija inkorporiranih nanočestica srebra se odigrava kroz neprestani transfer elektrona, pri čemu se vrednost hemijskog potencijala, odnosno Fermijeve energije mora održavati konstantnim u svim nanokompozitnim sistemima.

- Ispitivanjem mehaničkih svojstava je pokazano da povećanje koncentracije polimerne matrice, kao i inkorporacija nanočestica srebra dovode do poboljšanja, dok uvođenje hidrofilne komponente uzrokuje lošija mehanička svojstva ispitanih sistema.
- Sintetisani nanokompozitni sistemi mogu biti korišćeni kao sistemi za kontrolisano otpuštanje aktivnih supstanci (u ovom slučaju jona srebra), što je pokazano izvođenjem eksperimenta otpuštanja u fiziološkim *in vitro* uslovima sredine.
- Nanokompoziti su se pokazali kao veoma efkasan baktericidni agens na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, pri čemu su se svi ispitivani uzorci nalazili ispod granice toksičnosti za keratinocitne ćelije kože.
- Imajući u vidu da nanokompozitni sistemi Ag/poli(*N*-izopropilakrilamid-*ko*-itakonska kiselina) sintetisani radijaciono-hemijskom metodom pod dejstvom gama zračenja nisu do sada proučavani, rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji svakako će predstavljati smernice za buduća istraživanja u cilju proširenja znanja i razvoja materijala za kontrolu bakterijskih infekcija u okviru sigurnih terapijskih koncentracija.

## LITERATURA

- Abd El-Mohdy H.L. i Safrany A., Preparation of fast response superabsorbent hydrogels by radiation polymerization and crosslinking of *N*-isopropylacrylamide in solution., *Radiat. Phys. Chem.* **77** (2008) 273–279.
- Acharya A., Mohan H. i Sabharwal S., Radiation chemical studies on thermosensitive *N*-isopropylacrylamide and its polymer in aqueous solutions., *J. Radiat. Res.* **44** (2003) 335-343.
- Adnađević B. i Jovanović J., Novel Approach in Investigation of the Poly(Acrylic Acid) Hydrogel Swelling Kinetics in Water., *J. Appl. Polym. Sci.* **107** (2008) 3579–3587.
- Agnihotri S., Mukherji S. i Mukherji S., Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy., *RSC Adv.* **4** (2014) 3974-3983.
- Ahearne M., Yang Y. i Liu K-K., "Mechanical Characterisation of Hydrogels for Tissue Engineering Applications." u *Topics in Tissue Engineering*, (editori: Ashammakhi N., Reis R. i Chiellini F.) Vol **4**, Poglavlje 12, 2008.
- Ahmed E., Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review., *J. Adv. Res.* **6** (2015) 105-121.
- Aixiang Q., Mangeng L.U., Qunfeng L. i Ping Z., Synthesis and characterization of thermo-sensitive poly (*N*-isopropylacrylamide) hydrogel with fast response rate., *Front. Chem. China*, **2** (2007) 135-139.
- Ajayan P., Schadler L. i Braun P., *Nanocomposites science and technology.*, Wiley - VCH Verlag GmbH & Co., KGaA Weinheim, 2004.
- Akamatsu K., Takei S., Mizuhata M., Kajinami A., Deki S., Takeoka S., Fujii M., Hayashi S. i Yamamoto K., Preparation and characterization of polymer thin films containing silver and silver sulfide nanoparticles., *Thin Solid Films* **359** (2000) 55-60.



- Alarcon C.H., Pennadam S. i Alexander C., Stimuli responsive polymers for biomedical applications., *Chem. Soc. Rev.* **34** (2005) 276–285.
- Allı A. i Hazer B., Poly(*N*-isopropylacrylamide) thermoresponsive cross-linked conjugates containing polymeric soybean oil and/or polypropylene glycol., *Eur. Polym. J.* **44** (2008) 1701–1713.
- Alshehri S., Aldalbahi A., Baker Al-hajji A., Chaudhary A.A., Panhuis M., Alhokbany N., Ahamad T., Development of carboxymethyl cellulose-based hydrogel andnanosilver composite as antimicrobial agents for UTI pathogens., *Carbohydr. Polym.* **138** (2016) 229–236.
- Anseth K., Bowman C. i Brannon-Peppas L., Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination., *Biomaterials* **17** (1996) 1647-1657.
- Arnikar H., Osnovi nuklearne hemije., Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, 1992.
- Aydın R.S.T. i Mehlika P., 5-Fluorouracil Encapsulated Chitosan Nanoparticles for pH-Stimulated Drug Delivery: Evaluation of Controlled Release Kinetics., *J. Nanomater.* Volume **2012**, Article ID 313961, 10 pages.
- Baker B., Murff R. i Milam V., Tailoring the mechanical properties of polyacrylamide-based hydrogels., *Polymer* **51** (2010) 2207-2214.
- Baldock C., De Deene Y., Doran S., Ibbott G., Jirasek A., Lepage M., McAuley K. B., Oldham M. i Schreiner L. J., Polymer gel dosimetry., *Phys. Med. Biol.* **55** (2010) 1–63.
- Banerjee S., Loza K., Meyer-Zaika W., Prymak O. i Epple M., Structural Evolution of Silver Nanoparticles during Wet-Chemical Synthesis., *Chem. Mater.* **26** (2014) 951-957.
- Barret C. i Massalski T., Structure of metals: crystallographic methods, principles and data., Pergamon Press: Oxford, 1980.
- Belloni J., Mostafavi M., Remita H., Marignier J.L. i Delcourt M.O., "Radiation-induced synthesis of mono- and multi-metallic nanocolloids and clusters." u

- Synthesis chemistry and some properties of metal nanoparticles., *New J. Chem.* **22** (1998) 1239-1255.
- Belloni J. i Mostafavi M., "Radiation Chemistry of nanocolloids and clusters" u "Radiation Chemistry: Present status and future trends.", (ed. Jonah C.D. i Rao M.), *Studies in Physical and Theoretical Chemistry*, Elsevier Science, Amsterdam **87** (2001) 411-452.
- Bhattacharya S., Kamal M. i Gupta R., *Polymeric Nanocomposites-Theory and Practice.*, Carl Hanser Verlag, Munich, 2008.
- Biju V., Sugathan N., Vrinda V. i Salini S.L., Estimation of lattice strain in nanocrystalline silver from X-ray diffraction line broadening., *J. Mater. Sci.* **43** (2008) 1175-1179.
- Boonkaew B., Suwanpreuksa P., Cuttle L., Barber P.M. i Supaphol P., Hydrogels Containing Silver Nanoparticles for Burn Wounds Show Antimicrobial Activity Without Cytotoxicity., *J. Appl. Polym. Sci.* **131** (2014a) 40215; DOI: 10.1002/APP.40215.
- Boonkaew B., Barber P.M, Rengpipat S., Supaphol P., Kempf M., He J., John V.T. i Cuttle L., Development and Characterization of a Novel, Antimicrobial, Sterile Hydrogel Dressing for Burn Wounds: Single-Step Production with Gamma Irradiation Creates Silver Nanoparticles and Radical Polymerization., *J. Pharm. Sci-US* **103** (2014b) 3244-3253.
- Brannon-Peppas L. i Peppas N.A., Equilibrium swelling behavior of pH-sensitive hydrogels., *Chem. Eng. Sci.* **46** (1991) 715-722.
- Can H., Denizli B., Kavlak S. i Guner A., Preparation and swelling studies of biocompatible hydrogel systems by using gamma radiation-induced polymerization., *Radiat. Phys. Chem.* **72** (2005) 483-488.
- Caykara T., Dogmus M. i Kantoglu O., Network structure and swelling-shrinking behaviors of pH Sensitive poly(acrylamide-co-itaconic acid) hydrogels., *J. Polym. Sci. Pol. Phys.* **42** (2004a) 2586-2594.

- Caykara T., Effect of Maleic Acid Content on Network Structure and Swelling Properties of Poly(N-isopropylacrylamide-co-maleic acid) Polyelectrolyte Hydrogels., *J. Appl. Polym. Sci.* **92** (2004b) 763–769.
- Caykara T., Kiper S. i Demirel G., Thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide) hydrogels: Synthesis, swelling and interaction with ionic surfactants., *Eur. Polym. J.* **42** (2006a) 348–355.
- Caykara T., Kiper S. i Demirel G., Network parameters and volume phase transition behavior of poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels., *J. Appl. Polym. Sci.* **101** (2006b) 1756–1762.
- Chanda M. i Roy S., Industrial polymers special polymers, specialty polymers and their applications., Boca Raton: CRC Press; 2009.
- Chapiro A., High Polymers. Volume XV: Radiation Chemistry of Polymeric Systems., John Wiley & Sons Inc., 1962.
- Charlesby A., Atomic Radiation and Polymers., Pergamon, Oxford, 1960.
- Cheng D., Yang J. i Zhao Y. Antibacterial materials of silver nanoparticles application in medical appliances and appliances for daily use., *Chin. Med. Equip. J.* **4** (2004) 26–32.
- Chmielewski A.G. i Haji-Saeid M., Radiation technologies: past, present and future., *Radiat. Phys. Chem.* **71** (2004) 16–20.
- Cong H., Li J., Li L i Zheng S., Thermoresponsive gelation behavior of poly (N-isopropylacrylamide)-block-poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly(N-isopropylacrylamide) triblock copolymers., *Eur. Polym. J.* **61** (2014) 23–32.
- Cortes J., Mendizabal E. i Katime I., Effect of comonomer type and concentration on the equilibrium swelling and volume phase transition temperature of N-Isopropylacrylamide-based hydrogels., *J. Appl. Polym. Sci.* **108** (2008) 1792–1796.
- Crist B.V., Handbooks of Monochromatic XPS Spectra, The Elements and Native Oxides., John Wiley & Sons, New York, 2000.

- Dai H., Chen Q., Qin H., Guan Y., Shen D., Hua Y., Tang Y. i Xu J., A Temperature-Responsive Copolymer Hydrogel in Controlled Drug Delivery., *Macromolecules* **39** (2006) 6584-6589.
- De Moura M.R., Aouada F., Guilherme M., Radovanovic E., Rubira A. i Muniz E., Thermo-sensitive IPN hydrogels composed of PNIPAAm gels supported on alginate-Ca<sup>2+</sup> with LCST tailored close to human body temperature., *Polym. Test.* **25** (2006) 961-969.
- Dizaj S.M., Lotfipour F., Barzegar-Jalali M., Hossein Zarrintan M. i Adibkia K., Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles., *Mat. Sci. Eng. C-Bio. S* **44** (2014) 278-284.
- Dong Y., Ma Y., Zhai T., Shen F., Zeng Y., Fu H. i Yao J., Silver Nanoparticles Stabilized by Thermoresponsive Microgel Particles: Synthesis and Evidence of an Electron Donor-Acceptor Effect., *Macromol. Rapid Comm.* **28** (2007) 2339-2345.
- Doty R., Tshikhudo T., Brust M. i Fernig D., Extremely Stable Water-Soluble Ag Nanoparticles., *Chem. Mater.* **17** (2005) 4630-4635.
- Draganić I., Radioaktivni izotopi i zračenja I i II, Naučna knjiga, Beograd, 1968.
- Draganić I.G. i Draganić Z.D., The Radiation Chemistry of Water., Academic Press, New York, 1971.
- Drury J. i Mooney D., Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications., *Biomaterials* **24** (2003) 4337-4351.
- Džunuzović E., Dobijanje nanokompozita na bazi termoplastičnih polimera i uticaj nanočestica oksida titana i gvožđa na njihova svojstva., doktorska disertacija, Tehnološko metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2010.
- Elechiguerra J.L., Burt J.L., Morones J.R., Camacho-Bragado A., Gao X., Lara H.H. i Yacaman M.J., Interaction of silver nanoparticles with HIV-1., *J. Nanobiotechnol.* **3** (2005); doi:10.1186/1477-3155-3-6.
- Erbil C., Yildiz Y. i Uyanik N., Effects of synthesis-solvent composition and initiator concentration on the swelling behaviour of poly(N-

- isopropylacrylamide) P(NIPAAm), poly(NIPAAm-co-dimethyl itaconate), and poly(NIPAAm-co itaconic acid) gels., *Polym. Int.* **49** (2000) 795-800.
- Fauss E., The Silver Nanotechnology Commercial Inventory., University of Virginia, USA, 2008.
- Flory P.J. i Rehner J., Statistical mechanics of cross-linked polymer networks: II, swelling., *J. Chem. Phys.* **11** (1943) 521-526.
- Fox C.L., Silver sulphadiazine, addendum to local therapy, modern treatment., Hoeber Medical Division, New York: Harper and Row, (1967) 1259-1267.
- Fragala M.E., Compagnini G., Malandrino G., Spinella C. i Puglisi O., Silver nanoparticles dispersed in polyimide thin film matrix., *Eur. Phys. J. D.* **9** (1999) 631-633.
- Freestone I., Meeks N., Sax M. i Higgitt C., The Lycurgus cup-A Roman nanotechnology., *Gold. Bull.* **40** (2007) 270-277.
- Gaddy G., Korchev A., McLain J., Slaten B., Steigerwal E. i Mills G., Light-Induced Formation of Silver Particles and Clusters in Crosslinked PVA/PAA Films., *J. Phys. Chem. B* **108** (2004) 14850-14857.
- Galaev I. i Mattiasson B., Smart polymers and what they could do in biotechnology and medicine., *Trends. Biotechnol.* **17** (1999) 335-340.
- Gil E.S. i Hudson S.M., Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates., *Prog. Polym. Sci.* **29** (2004) 1173-1222.
- Gong P.J., Katsuyama Y., Kurokawa T. i Osada Y., Double-network hydrogels with extremely high mechanical strength., *Adv. Mater.* **15** (2003) 1155-1158.
- Grier N., "Silver and its compounds." in "Block SS (3<sup>rd</sup> edition) Antiseptics and Disinfectants", Philadelphia, Lea & Febirger (1977) 375-389.
- Haraguchi K. i Li H.J., Mechanical properties and structure of polymer-clay nanocomposite gels with high clay content., *Macromolecules* **39** (2006) 1898-1905.
- Hardes J., Ahrens H., Gebert C., Streitberger A., Buerger H., Erre M., Gonsel A., Wedemeyer C., Saxler G., Winkelmann W. i Gosheger G., Lack of

- toxicological side-effects in silver-coated megaprotheses in humans., *Biomaterials* **28** (2007) 2869-2875.
- Heilmann A., *Polymer Films with Embedded Metal Nanoparticles.*, Vol **52** Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2003.
- Henglein A., Physicochemical properties of small metal particles in solution: "microelectrode" reactions, chemisorption, composite metal particles, and the atom-to-metal transition., *J. Phys. Chem.* **97** (1993) 5457-5471.
- Henglein A. i Meisel D., Radiolytic Control of the Size of Colloidal Gold Nanoparticles., *Langmuir* **14** (1998) 7392-7396.
- Hennink W.E. i van Nostrum C.F., Novel crosslinking methods to design hydrogels., *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54** (2002) 13-36.
- Hoffman A., Hydrogels for biomedical applications., *Adv. Drug. Deliver. Rev.* **64** (2012) 18-23.
- Hou H., Chen L., He H., Chen L., Zhao Z. i Jin Y., Fine-tuning the LSPR response of gold nanorod-polyaniline core-shell nanoparticles with high photothermal efficiency for cancer cell ablation., *J. Mater. Chem. B* **3** (2015) 5189-5196.
- <http://www.nano.gov/timeline>). United States-National Nanotechnology Initiative (preuzeto jun 2016).
- [http://www3.epa.gov/;](http://www3.epa.gov/) United States Environmental Protection Agency (preuzeto jun 2016).
- Hull D. i Clyne T.W., *An Introduction to Composite Materials.*, (2<sup>nd</sup> edition), Cambridge University Press; Cambridge, 1996.
- Hwang E.T., Lee J.H., Chae Y.J., Kim Y.S., Kim B.C., Sang B. i Gu M.B., Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria., *Small.* **4** (2008) 746-750.
- Inokuti M., Gel formation in polymers resulting from simultaneous crosslinking and scission., *J. Chem. Phys.* **38** (1963) 2999-3005.

- International consensus: *Appropriate use of silver dressings in wounds. An expert working group consensus.*, London: Wounds International, 2012. Available to download from: [www.woundsinternational.com](http://www.woundsinternational.com) (preuzeto jun 2016).
- Jain J., Arora S., Rajwade J.M., Omray P., Khandelwal S. i Paknikar K.M. Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use., *Mol. Pharm.* **6** (2009) 1388-1401.
- Jones M.S., Effect of pH on the lower critical solution temperatures of random copolymers of *N*-isopropylacrylamide and acrylic acid., *Eur. Polym. J.* **35** (1999) 795-801.
- Jovančić P., Vilchez A. i Molina R., Synthesis of Thermo-Sensitive Hydrogels from Free Radical Copolymerization of NIPAAm with MBA Initiated by Atmospheric Plasma Treatment., *Plasma Process. Polym.* 2015, DOI: 10.1002/ppap.201500194.
- Jovanović Ž., Nanokompoziti srebro/poli(*N*-vinil-2-pirolidon) i srebro/alginat dobijeni elektrohemijским postupcima., doktorska disertacija, Tehnološko metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2015.
- Jovanović Ž., Radosavljević A., Šiljegović M., Bibić N., Mišković-Stanković V i Kačarević-Popović Z., Structural and optical characteristics of silver/poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone) nanosystems synthesized by  $\gamma$ -irradiation., *Radiat. Phys. Chem.* **81** (2012) 1720-1728.
- Jovanović S. i Jeremić K., Karakterisanje polimera., Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2007.
- Kačarević-Popović Z., Tomić S., Krklješ A., Mičić M. i Suljovrujić E., Radiolytic synthesis of Ag-poly(BIS-co-HEMA-co-IA) nanocomposites., *Radiat. Phys. Chem.* **76** (2007) 1333-1336.
- Kačarević-Popović Z., Dragašević M., Krklješ A., Popović S., Jovanović Ž, Tomić S. i Mišković-Stanković V., On the Use of Radiation Technology for Nanoscale Engineering of Silver/Hydrogel Based Nanocomposites for Potential Biomedical Application., *The Open Conference Proceedings Journal* **1** (2010) 200-206.

- Kalagasidis Krušić M., Hidrogelovi i kontrolisano otpuštanje lekovitih supstanci., Monografija zadužbine Andrejević, Beograd, 2007.
- Kalagasidis Krušić M., Ilić M. i Filipović J., Swelling behaviour and paracetamol release from poly(N-isopropylacrylamide-itaconic acid) hydrogel., *Polym. Bull.* **63** (2009) 197–211.
- Kaneko Y, Yoshida R, Sakai K, Sakurai Y, Okano T. Temperature-responsive shrinking kinetics of poly (N-isopropylacrylamide) copolymer gels with hydrophilic and hydrophobic comonomers., *J. Membrane Sci.* **101** (1995) 13–22.
- Karadag E., Saraydin D., Sahiner N. i Guven O., Radiation induced acrylamide/citric acid hydrogels and their swelling behaviors., *J. Macromol. Sci. – Pure Appl. Chem.* **A38** (2001) 1105–1121.
- Karthikeyan B., Spectroscopic studies on Ag-polyvinyl alcohol nanocomposite films., *Physica B* **364** (2005) 328–332.
- Kelly K.L., Coronado E., Zhao L.L. i Schatz G., The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment., *J. Phys. Chem. B* **107** (2003) 668–677.
- Khamanga S.M., Parfitt N., Nyamuzhiwa T., Haidula H. i Walker R.B., The Evaluation of Eudragit Microcapsules Manufactured by Solvent Evaporation Using USP Apparatus 1., *Dissolut. Technol.* **16** (2009) 15–22.
- Khan M.A.M., Kumar S., Ahamed M., Alrokayan S.A. i AlSalhi M.S., Structural and thermal studies of silver nanoparticles and electrical transport study of their thin films., *Nanoscale Res. Lett.* **6** (2011) 434.
- Khanna P.K. , Singh N., Charan S., Subbarao V.V.V.S., Gokhale R. i Mulik U.P., Synthesis and characterization of Ag/PVA nanocomposite by chemical reduction method., *Mater. Chem. Phys.* **93** (2005) 117–121.
- Khare A. i Peppas N., Swelling/deswelling of anionic copolymer gels., *Biomaterials* **16** (1995) 559–567.
- Kickelbick G., Concepts for the incorporation of inorganic building blocks into organic polymers on a nanoscale., *Prog. Polym. Sci.* **28** (2003) 83–114.



- Kim D.J., Kang S.M., B Kong., Kim W.J., Paik H.J., Choi H. i Choi I.S., Formation of Thermoresponsive Gold Nanoparticle/PNIPAAm Hybrids by Surface-Initiated, Atom Transfer Radical Polymerization in Aqueous Media., *Macromol. Chem. Phys.* **206** (2005) 1941-1946.
- Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J.H., Park S.J., Lee H.J., Kim S.H, Park Y.K., Park Y.H., Hwang C.Y., Kim Y.K., Lee Y.S., Jeong D.H. i Cho M.H., Antimicrobial effects of silver nanoparticles., *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **3** (2007) 95-101.
- Kirby T., New antibiotic development hailed as game changing., *Lancet. Infect. Dis.* **15** (2015) 271-272.
- Kokubo T., Kushitani H., Sakka S., Kitsugi T. i Yamamuro T., Solutions able to reproduce *in vivo* surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W<sup>3</sup>., *J. Biomed. Mater. Res.* **24** (1990) 721-734.
- Kopeček J., Hydrogels from soft contact lenses and implants to self-assembled nanomaterials., *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **47** (2009) 5929-5946.
- Krklješ A., Marinović-Cincović M., Kačarević-Popović Z. i Nedeljković J., Radiolytic synthesis and characterization of Ag-PVA nanocomposites., *Eur. Polym. J.* **43** (2007a) 2171-2176.
- Krklješ A., Radiolitička sinteza i karakterizacija polimernih nanokompozita na bazi poli(vinil alkohola) i nanočestica srebra i zlata., doktorska disertacija, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu, 2009.
- Krklješ A., Nedeljković J. i Kačarević-Popović Z., Fabrication of Ag-PVA hydrogel nanocomposite by  $\gamma$ -irradiation., *Polym. Bull.* **58** (2007b) 271-279.
- Krstić J., Spasojević J., Radosavljević A., Perić-Grujić A., Djurić M., Kačarević-Popović Z. i Popović S., In vitro silver ion release kinetics from nanosilver/Poly(vinyl alcohol) hydrogels synthesized by gamma irradiation., *J. Appl. Polym. Sci.* **131** (2014a) 40321.
- Krstić J., Spasojević J., Radosavljević A., Šiljegović M., Kačarević-Popović Z., Optical and structural properties of radiolytically *in situ* synthesized silver

- nanoparticles stabilized by chitosan/poly(vinylalcohol) blends., *Radiat. Phys. Chem.* **96** (2014b) 158–166.
- Kumar A., Srivastava A., Galaev I.Y. i Mattiasson B., Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications., *Prog. Polym. Sci.* **32** (2007) 1205-1237.
- Kumar M., Varshney L. i Francis S., Radiolytic formation of Ag clusters in aqueous polyvinyl alcohol solution and hydrogel matrix., *Radiat. Phys. Chem.* **73** (2005) 21-27.
- Lansdown A.B.G. A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices., *Advances in Pharmacological Sciences* **2010** (2010) Article ID 910686.
- Laresea F.F., D'Agostin F., Crosera M., Adami G., Renzi N., Bovenzi M. i Maina G., Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin., *Toxicology* **255** (2009) 33–37.
- Lee S.T., Apai G., Mason M.G., Benbow R. i Hurych Z., Evolution of band structure in gold clusters as studied by photoemission., *Phys. Rev. B* **23** (1981) 505-509.
- Li D., Q. H., Cui Y. i Li J., Fabrication of pH-Responsive Nanocomposites of Gold Nanoparticles/Poly(4-vinylpyridine)., *Chem. Mat.* **19** (2007) 412-417.
- Li H.J., Zhang A.Q., Hu Y., Sui L., Qian D.J. i Chen M., Large-scale synthesis and self-organization of silver nanoparticles with Tween 80 as a reductant and stabilizer., *Nanoscale Res. Lett.* **7** (2012) 1-13.
- Li J., Guo L., Zhang L., Yu C., Yu L., Jiang P., Wei C., Qin F. i Shi J., Donor- $\pi$ -acceptor structure between Ag nanoparticles and azobenzene chromophore and its enhanced third-order optical non-linearity., *Dalton Trans.* **5** (2009) 823-831.
- Ling L.L., Schneider T., Peoples A., Spoering A., Engels I., Conlon B., Mueller A., Schäberle T., Hughes D., Epstein S., Jones M., Lazarides L., Steadman V., Cohen D., Felix C., K. Fetterman A., Millett W., Nitti A., Zullo A., Chen C. i Lewis K., A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance., *Nature* **517** (2015) 455–459.

- Ling Y. i Lu M., Thermo and pH dual responsive Poly(N-isopropylacrylamide-co-itaconic acid) hydrogels., *J. Polym. Res.* **16** (2009) 29-37.
- Liu M., Bian F. i Sheng F., FTIR study on molecular structure of poly(N-isopropylacrylamide) in mixed solvent of methanol and water., *Eur. Pol. J.* **41** (2005) 283-291.
- Liu Y., Cui Y., Wu G. i Liao M., Preparation and properties of fast temperature-responsive soy protein/PNIPAAm IPN hydrogels., *J. Serb. Chem. Soc.* **79** (2014) 211-224.
- Long Y., Wu J., Wang H., Zhang X., Zhao N. i Xu J. Rapid sintering of silver nanoparticles in an electrolyte solution at room temperature and its application to fabricate conductive silver films using polydopamine as adhesive layers., *J. Mat. Chem.* **21** (2011) 4875-4881.
- Lugao A. i Malmonge S.M., Use of radiation in the production of hydrogels., *Nucl. Instrum. Meth. B* **185** (2001) 37-42.
- Luo Y., Zhang K., Wei Q., Liu Z. i Chen Y., Poly(MAA-co-AN) hydrogels with improved mechanical properties for theophylline controlled delivery., *Acta Biomater.* **5** (2009) 316-327.
- Mallick K., Witcomb M. i Scurrrell M., Self-assembly of the metal nanoparticles: Formation of the highly oriented, core-shell type, bimetallic gold-silver film., *J. Nanopart. Res.* **9** (2007) 323-330.
- Marsich E., Bellomo F., Turco G., Travan A., Donati I. i Paoletti S., Nano-composite scaffolds for bone tissue engineering containing silver nanoparticles: preparation, characterization and biological properties., *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **24** (2013) 1799-1807.
- Martins G., Mano J. i Alves N., Dual Responsive Nanostructured Surfaces for Biomedical Applications., *Langmuir* **27** (2011) 8415-8423.
- Mason M.G., Electronic structure of supported small metal clusters., *Phys. Rev. B* **27** (1983) 748-763.
- Maxwell Garnett J.C., Colours in Metal Glasses and in Metallic Films., *Philos. Trans. A, The Royal Society, London*, **203** (1904) 385-420.

- Maxwell Garnett J.C., Colours in Metal Glasses and in Metallic Films., *Philos. Trans. A, The Royal Society, London*, **205** (1906) 237-288.
- Mazhdi M. i Hossein Khani P., Structural characterization of ZnO and ZnO:Mn nanoparticles prepared by reverse micelle method., *Int. J. Nano Dim.* **2** (2012) 233-240.
- Meyvis T., Stubbe B., Van Steenberg M., Hennink W., De Smedt S. i Demeester J., A comparison between the use of dynamic mechanical analysis and oscillatory shear rheometry for the characterisation of hydrogels., *Int. J. Pharm.* **244** (2002) 163-168.
- Mie G., Contributions to the optics of turbid media, particularly of colloidal metal solutions., *Ann. Phys.-New York* **25** (1908) 377-445.
- Milašinović N., Milosavljević N., Filipović J., Knežević-Jugović Z., Kalagasidis Krušić M., Synthesis, characterization and application of poly(*N*-isopropylacrylamide-co-itaconic acid) hydrogels as supports for lipase immobilization., *React. Funct. Polym.* **70** (2010a) 807-814.
- Milašinović N., Sinteza pH- i temperaturno-osetljivih hidrogelova itakonske kiseline kao nosača za imobilizaciju lipaze iz *Candida rugosa*, doktorska disertacija, Tehnološko metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2011.
- Milašinović N., Kalagasidis Krušić M., Knežević-Jugović Z. i Filipović J., Hydrogels of *N*-isopropylacrylamide copolymers with controlled release of a model protein., *Int. J. Pharmaceut.* **383** (2010b) 53-61.
- Milašinović N., Knežević-Jugović Z., Jakovljević Ž., Filipović J. i Kalagasidis Krušić M., Synthesis of *n*-amyl isobutyrate catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized into poly(*N*-isopropylacrylamide-co-itaconic acid) hydrogels., *Chem. Eng. J.* **614** (2012) 181-182.
- Milosavljević N., Milašinović N., Popović I., Filipović J. i Kalagasidis Krušić M., Preparation and characterization of pH-sensitive hydrogels based on chitosan, itaconic acid and methacrylic acid., *Polym. Int.* **60** (2011) 443-452.

- Mohan Y.M., Vimala K., Thomas V., Varaprasad K., Sreedhar B., Bajpai S.K. i Mohana Raju K., Controlling of silver nanoparticles structure by hydrogel networks., *J. Colloid Interf. Sci.* **342** (2010) 73–82.
- Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J., Ramirez J.T. i Yacaman M.J., The bactericidal effect of silver nanoparticles., *Nanotechnology* **16** (2005) 2346–2353.
- Mostafavi M. i Douki T., Radiation Chemistry: From Basics to Applications in Material and Life Sciences., (ed. Mélanie Spothem-Maurizot), EDP Sciences, France, 2008.
- Mote V.D., Purushotham Y. i Dole B.N., Williamson-Hall analysis in estimation of lattice strain in nanometer-sized ZnO particles., *J. Theoretical Applied Physics* **6** (2012) 1-8.
- Mullarney M., Seery T. i Weiss R.A., Drug diffusion in hydrophobically modified N,N-dimethylacrylamide hydrogels., *Polymer* **47** (2006) 3845–3855.
- Mulvaney P., Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles., *Langmuir* **12** (1996) 788-800.
- Mulvaney P. i Henglein A., Long-Lived nonmetallic silver clusters in aqueous solution: a pulse radiolysis study of their formation., *J. Phys. Chem.* **94** (1990) 4182-4188.
- Murali K.R., Kalaivanan A., Perumal S. i Pillai N.N., Sol-gel dip coated CdO:Al films., *J. Alloy. Compd.* **503** (2010) 350–353.
- Murthy P.S.K., Murali Mohan Y., Varaprasad K., Sreedhar B. i Mohana Raju K., First successful design of semi-IPN hydrogel-silver nanocomposites: A facile approach for antibacterial application., *J. Colloid. Interf. Sci.* **318** (2008) 217–224.
- Nagaoka N., Yoshida M., Asano M., Suwa T., Kubota H. i Katakai R., Simultaneously occurring process of radiation-induced polymerization, crosslinking and degradation of N-isopropylacrylamide., *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **35** (1997) 3075–3081.

- Nagaoka N., Agneza S., Yoshida M., Omichi H., Kubota H i Katakai R., Synthesis of Poly(*N*-isopropylacrylamide) Hydrogels by Radiation Polymerization and Cross-Linking., *Macromolecules* **26** (1993) 7386-7388.
- Naghavi K., Saion E., Rezaee K., MatYunus W.M., Influence of dose on particle size of colloidal silver nanoparticles synthesized by gamma radiation., *Radiat. Phys. Chem.* **79** (2010) 1203-1208.
- Nakayama A., Kakugo A., Gong J.P., Osada Y., Takai M., Erata T. i Kawano S., High mechanical strength double-network hydrogel with bacterial cellulose., *Adv. Funct. Mater.* **14** (2004) 1124-1128.
- Navaladian S., Viswanathan B., Varadarajan T. i Viswanath R., A Rapid Synthesis of Oriented Palladium Nanoparticles by UV Irradiation., *Nanoscale Res. Lett.* **4** (2009) 181-186.
- NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database, NIST Standard Reference Database 20, Version 4.1., Available at: <http://srdata.nist.gov/xps/EnergyTypeValSrch.aspx> (preuzeto jun 2016).
- Noguez C., Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The Influence of Shape and Physical Environment., *J. Phys. Chem. C* **111** (2007) 3806-3819.
- Oberdörster G., Maynard A., Donaldson K., Castranova V., Fitzpatrick J., Ausman K., Carter J., Karn B., Kreyling W., Lai D., Olin S., Monteiro-Riviere N., Warheit D. i Yang H., Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy., *Particle. Fibre. Toxicol.* **2** (2005) 8-43.
- Ortega A., Bucio E. i Burillo G., Radiation polymerization and crosslinking of (*N*-isopropylacrylamide) in solution and in solid state., *Polym. Bull.* **58** (2007) 565-573.
- Ozkahraman B., Acar I. i Emik S., Removal of cationic dyes from aqueous solutions with poly (*N*-isopropylacrylamide-co-itaconic acid) hydrogels., *Polym. Bull.* **66** (2011) 551-570.
- Panacek A., Kvitek L., Pucek R., Kolar M., Vecerova R., Pizurova N., Sharma V., Nevecna T. i Zboril R., Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis,

- Characterization and Their Antibacterial Activity., *J. Phys. Chem. B* **110** (2006) 16248-16253.
- Paul R., Dey A., Mukherjee A.K., Sarangi S.N. i Pal A.K., Effect of nanocrystalline silver impregnation on mechanical properties of diamond-like-carbon films by nano-indentation., *Indian J Pure & Appl. Phys.* **50** (2012) 252-259.
- Pelton R., Temperature-sensitive aqueous microgels., *Adv. Colloid Interfac.* **85** (2000) 1-33.
- Pelton R.H. i Chibante P., Preparation of aqueous lattices with N-isopropylacrylamide., *Colloid Surface* **20** (1986) 247-256.
- Peppas N., Bures P., Leobandung W. i Ichikawa H., Hydrogels in pharmaceutical formulations., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50** (2000) 27-46.
- Peppas N. i Merrill E., Differential scanning calorimetry of crystallized PVA hydrogels., *J. Appl. Polym. Sci.* **20** (1976) 1457-1465.
- Pillai Z. i Kamat P., What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method., *J. Phys. Chem. B* **108** (2004) 945-951.
- Pomogailo A. i Kestelman V., Metallopolymer Nanocomposites., Vol **81**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005.
- Qiu Y. i Park K., Environment-sensitive hydrogels for drug delivery., *Adv. Drug. Deliver. Rev.* **53** (2001) 321-339.
- Quintana J., Valderruten N. i Katime I., Mechanical properties of poly(N-isopropyl-acrylamide-coitaconic acid) hydrogels., *J. Appl. Polym. Sci.* **85** (2002) 2540-2545.
- Radosavljević A., Božanić D., Bibić N., Mitrić M., Kačarević-Popović Z. i Nedeljković J., Characterization of Poly(vinyl alcohol)/Gold Nanocomposites Obtained by In Situ Gamma-Irradiation Method., *J. Appl. Polym. Sci.* **125** (2012) 1244-1251.
- Rai M., Yadav A. i Gade A., Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials., *Biotechnol. Adv.* **27** (2009) 76-83.

- Ramirez-Fuentes Y., Bucio E. i Burillo G., Thermo and pH sensitive copolymer based on acrylic acid and N-Isopropylacrylamide grafted onto polypropylene., *Polym. Bull.* **60** (2008) 79–87.
- Rance A., Marsh D.H. i Khlobystov A.N., Extinction coefficient analysis of small alkanethiolate-stabilised gold nanoparticles., *Chem. Phys. Lett.* **460** (2008) 230-236.
- Ratner B. i Hoffman A., "Synthetic Hydrogels for Biomedical Applications" u Hydrogels for Medical and Related Applications, ACS Symposium Series, Washington DC, 1976.
- Rattanaruengsrikul V., Pimpha N. i Supaphol P., Development of Gelatin Hydrogel Pads as Antibacterial Wound Dressings., *Macromol. Biosci.* **9** (2009) 1004–1015.
- Reibold M., Paufler P., Levin A.A., Kochmann W., Patzke N. i Meyer D.C., Materials: Carbon nanotubes in an ancient Damascus sabre., *Nature* **444** (2006) 286-287.
- Rele M., Kapoor S., Sharma G. i Mukherjee T., Reduction and aggregation of silver and thallium ions in viscous media., *Phys. Chem. Chem. Phys.* **6** (2004) 590-595.
- Ren X., Meng X., Chen D., Tang F., i Jiao J. Using silver nanoparticle to enhance current response of biosensor., *Biosens. Bioelectron.* **21** (2005) 433–437.
- Richard J.W., Spencer B.A., McCoy L.F., Carina E., Washington J., Edgar P., Acticoat versus silverlon: the truth., *J. Burns Surg. Wound Care* **1** (2002) 11-20.
- Rodriguez-Sanchez L., Blanco M.C. i Lopez-Quintela M.A., Electrochemical Synthesis of Silver Nanoparticles., *J. Phys. Chem. B* **104** (2000) 9683-9688.
- Rohan L.C., Hillier S.L. i Dezzutti C.S., Preventing the Sexual Transmission of HIV-1 with Topical Microbicides: Another Piece of the Equation., *The Journal of Infectious Diseases* **196** (2007) 1285–1287.
- Russell A. i Hugo W., Antimicrobial activity and action of silver., *Prog. Med. Chem.* **31** (1994) 351-370.



- Safdar N., Codispoti N., Purvis S. i Knobloch M.J., Patient perspectives on indwelling urinary catheter use in the hospital., *Am. J. Infect. Control.* **44** (2016) e23-e24.
- Safrany A. i Wojnarovits L., First steps in radiation-induced hydrogel synthesis: radical formation and oligomerization in dilute aqueous *N*-isopropylacrylamide solutions., *Radiat. Phys. Chem.* **67** (2003) 707-715.
- Saito O., Kang H.Y. i Dole M., Theory of gel-dose curves for polymers undergoing simultaneous crosslinking and scission., *J. Chem. Phys.* **46** (1967) 3607-3616.
- Samberg M., Oldenburg S. i Monteiro-Riviere N., Evaluation of Silver Nanoparticle Toxicity in Skin in Vivo and Keratinocytes in Vitro., *Environ. Health Persp.* **118** (2010) 407-413.
- Schexnailder P. i Schmidt G., Nanocomposite polymer hydrogels., *Colloid. Polym. Sci.* **287** (2009) 1-11.
- Schild H.G., Poly(*N*-isopropylacrylamide): experiment, theory and application., *Prog. Polym. Sci.* **17** (1992) 163-249.
- Sen M., Yakar A. i Guven O., Determination of average molecular weight between cross-links ( $M_c$ ) from swelling behaviours of diprotic acid-containing hydrogels., *Polymer* **40** (1999) 2969-2974.
- Sharma V., Yngard R. i Lin Y., Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities., *Adv. Colloid. Interfac.* **145** (2009) 83-96.
- Sharma R., Walker R.B. i Pathak K., Evaluation of the Kinetics and Mechanism of Drug Release from Econazole nitrate Nanosponge Loaded Carbapol Hydrogel., *Ind. J. Pharm. Edu. Res.* **45** (2011) 25-31.
- Shepherd J., Sarker P., Swindells K., Douglas I., MacNeil S., Swanson L. i Rimmer S., Binding Bacteria to Highly Branched Poly(*N*-isopropylacrylamide) Modified with Vancomycin Induces the Coil-to-Globule Transition., *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010) 1736-1737.
- Sidorov S., Bronstein L., Valetsky P., Hartmann J., Colfen H., Schnablegger H. i Antonietti M., Stabilization of Metal Nanoparticles in Aqueous Medium by

- Polyethyleneoxide–Polyethyleneimine Block Copolymers., *J. Colloid Interface Sci.* **212** (1999) 197-211.
- Sondi I. i Salopek-Sondi B., Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *Escherichia coli* as a model for Gram-negative bacteria., *J. Colloid Interface Sci.* **275** (2004) 177-182.
- Spasojević J., Radosavljević A., Krstić J., Mitrić M., Popović M., Rakočević Z., Kalagasidis-Krušić M., Kačarević-Popović Z., Structural characteristics and bonding environment of Ag nanoparticles synthesized by gamma irradiation within thermo-responsive poly(N-isopropylacrylamide) hydrogel., *Polym. Composite.* (2015a) doi:10.1002/pc.23665.
- Spasojević J., Radosavljević A., Krstić J., Jovanović D., Spasojević V., Kalagasidis-Krušić M., Kačarević-Popović Z., Dual responsive antibacterial Ag-poly(N-isopropylacrylamide/itaconic acid) hydrogel nanocomposites synthesized by gamma irradiation., *Eur. Polym. J.* **69** (2015b) 165-185.
- Spinks J.W.T. i Woods R.J., *An Introduction to Radiation Chemistry.*, (2<sup>nd</sup> Edition), John Wiley & Sons, New York, 1976.
- Stamplecoskie K., Scaiano J., Tiwari V. i Anis H. Optimal Size of Silver Nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy., *J. Phys. Chem. C* **115** (2011) 1403-1409.
- Stanirowski P.J., Wnuk A., Cendrowski K. i Sawicki W., Growth factors, silver dressings and negative pressure wound therapy in the management of hard-to-heal postoperative wounds in obstetrics and gynecology: a review., *Arch. Gynecol. Obstet.* **292** (2015) 757–775.
- Stepanov A.L., Hole D.E. i Townsend P.D., Modification of size distribution of ion implanted silver nanoparticles in sodium silicate glass using laser and thermal annealing., *Nucl. Instrum. Meth. B* **149** (1999) 89-98.
- Strauss P., Knole W. i Naumov S., Radiation-induced radical formation and crosslinking in aqueous solutions of N-isopropylacrylamide., *Macromol. Chem. Phys.* **199** (1998) 2229-2235.

- Sun R.W., Chen R., Chung N.P., Ho C.M., Lin C.L. i Che C.M. Silver nanoparticles fabricated in HEPES buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells., *Chem. Commun. (Camb.)* **28** (2005) 5059-5061.
- Takenaka S., Karg E., Roth C., Schulz H., Ziesenis A., Heinzmann U., Schramel P. i Heyder J. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats., *Environ. Health. Perspect.* **109** (Suppl 4) (2001) 547-551.
- Tasdelen B., Kayaman-Apohan N., Guven O. i Baysal B., Investigation of drug release from thermo- and pH-sensitive poly(*N*-isopropylacrylamide/itaconic acid) copolymeric hydrogels., *Polym. Advan. Technol.* **15** (2004a) 528-532.
- Tasdelen B., Kayaman-Apohan N., Guven O. i Baysal B., Preparation of poly(*N*-isopropylacrylamide/itaconic acid) copolymeric hydrogels and their drug release behavior., *Int. J. Pharm.* **278** (2004b) 343-351.
- Tasdelen B., Kayaman-Apohan N., Guven O. i Baysal B., Anticancer drug release from poly(*N*-isopropylacrylamide/itaconic acid) copolymeric hydrogels., *Radiat. Phys. Chem.* **73** (2005) 340-345.
- Theivasanthi T. i Alagar M., Electrolytic Synthesis and Characterizations of Silver Nanopowder., *Nano Biomed. Eng.*, **4** (2012) 58-65.
- Thostenson E., Li C. i Chou T.W., Nanocomposites in context., *Compos. Sci. Technol.* **65** (2005) 491-516.
- Tolstov A.L. i Lebedev E.V., Features of the stabilization of silver nanoparticles by carbonyl-containing polymers., *Theor. Exp. Chem.* **48** (2012) 213-226.
- Turan E. i Caykara T., Swelling and Network Parameters of pH-Sensitive Poly(acrylamide-co-acrylic acid) Hydrogels., *J. Appl. Pol. Sci.* **106** (2007) 2000-2007.
- U.S. Environmental Protection Agency, State of the Science Literature Review: Everything Nanosilver and More., Scientific Technical Research Engineering and Modeling Support, Final Report, EPA/600/R-10/084 Washington DC, August 2010.

- Veenas C., Nissamudeen K., Smitha S., Biju V. i Gopchandran K., Off-axis PLD: A novel technique for plasmonic engineering of silver nanoparticles., *J. Optoelectron. Adv. M.* **11** (2009) 114-122.
- Venkata Subbaiah Y.P., Prathap P. i Ramakrishna Reddy K.T., Structural, electrical and optical properties of ZnS films deposited by close-spaced evaporation., *Appl. Surf. Sci.* **253** (2006) 2409-2415.
- Vimala K., Samba Sivudu K., Murali Mohan Y., Sreedhar B. i Mohana Raju K., Controlled silver nanoparticles synthesis in semi-hydrogel networks of poly(acrylamide) and carbohydrates: A rational methodology for antibacterial application., *Carbohydr. Polym.* **75** (2009) 463-471.
- Vodnik V., Uticaj oblika nanočestica srebra na optička i termička svojstva kompozita Ag/polimer., doktorska disertacija, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu, 2008.
- Von Sonntag C., Bothe E. Ulanski P. i Adhikary A., Radical transfer reactions in polymers., *Radiat. Phys. Chem.* **55** (1999) 599-603.
- Wang B., Mukataka S., Kokufuta E. i Kodama M., The influence of polymer concentration on the radiation-chemical yield of intermolecular crosslinking of poly(vinylalcohol) by  $\gamma$ -rays in deoxygenated aqueous solution., *Radiat. Phys. Chem.* **59** (2000) 91-95.
- Wang B., Kodama M., Mukataka S. i Kokufuta E., On the intermolecular crosslinking of PVA chains in an aqueous solution by  $\gamma$ -ray irradiation., *Polym. Gels and Net.* **6** (1998) 71-81.
- Weast R.C., Handbook of chemistry and physics., (53rd ed.) The Chemical Rubber Co, Ohio, 1972.
- Weiss-Malik R.A., Solis F.J. i Vernon B.L., Independent control of lower critical solution temperature and swelling behavior with pH for poly(*N*-isopropylacrylamide-co-maleic acid)., *J. Appl. Polym. Sci.* **94** (2004) 2110-2116.
- White J.M.L., Powell A.M., Brady K. i Russell-Jones R., Severe generalized argyria secondary ingestion of colloidal silver protein., *Clin. Experim. Dermatol.* **28** (2003) 254-256.

- Wichterle O. i Lim D., Hydrophilic gels for biological use., *Nature* **185** (1960) 117-118.
- Wijnhoven S.W.P., Peijnenburg W.J.G.M., Herberts C.A., Hagens W.I., Oomen A.G., Heugens E.H.W., Roszek B., Bisschops J., Gosens I., van de Meent D., Dekkers S., de Jong W.H., van Zijverden M., Sips A.J.A.M. i Geertsma R.E. Nanosilver—a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment., *Nanotoxicology* **3** (2009) 109-138.
- Wiley B., Chen Y., McLellan J., Xiong Y., Li Z.Y., Ginger D. i Xia Y., Synthesis and Optical Properties of Silver Nanobars and Nanorice., *Nano Lett.* **7** (2007) 1032-1036.
- Wilkinson L.J., White R.J. i Chipman J.K., Silver and nanoparticles of silver in wound dressings: a review of efficacy and safety., *J. Wound. Care.* **20** (2011) 543-549.
- Wright J.B., Lam K., Hansen D. i Burrell R.E., Efficacy of topical silver against fungal burn wound pathogens., *Am. J. Infect. Control* **27** (1999) 344-350.
- Xue W. i Hamley I.W., Thermoreversible swelling behaviour of hydrogels based on N-isopropylacrylamide with a hydrophobic comonomer., *Polymer* **43** (2002) 3069-3077.
- Yang S., Wang Y., Wang Q., Zhang R. i Ding B., UV irradiation induced formation of Au nanoparticles at room temperature: The case of pH values., *Colloid. Surface A* **301** (2007) 174-183.
- Yu D. i Wing-Wah Yam V., Hydrothermal-Induced Assembly of Colloidal Silver Spheres into Various Nanoparticles on the Basis of HTAB-Modified Silver Mirror Reaction., *J. Phys. Chem. B* **109** (2005) 5497-5503.
- Zhang J. i Peppas N.A., Synthesis and characterization of pH- and temperature-sensitive poly(methacrylic acid)/poly(N-isopropylacrylamide) interpenetrating polymeric networks., *Macromolecules* **33** (2000) 102-107.
- Zhang Y., Lou Z., Hu Y., Zhang W., Zhang X., Hu X. i Zhang H., Facile Synthesis and Antibacterial Evaluation of Poly(acrylamide-co-(b-

cyclodextrin))/Silver Nanocomposite., *Polym. Composite.* (2014)  
doi:10.1002/pc.23317

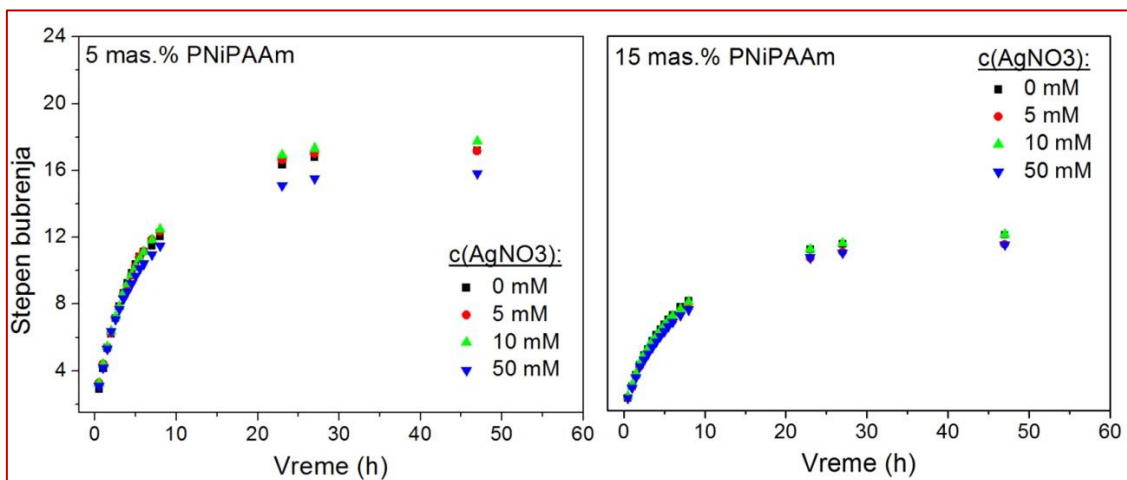
Zhang W., Yao Y., Sullivan N. i Chen Y., Modeling the Primary Size Effects of Citrate-Coated Silver Nanoparticles on Their Ion Release Kinetics., *Environ. Sci. Technol.* **45** (2011) 4422–4428.

Zhang X. i Zhuo R., Synthesis of temperature-sensitive poly(N-isopropylacrylamide) hydrogel with improved surface property., *J. Colloid Interf. Sci.* **223** (2000) 311–313.

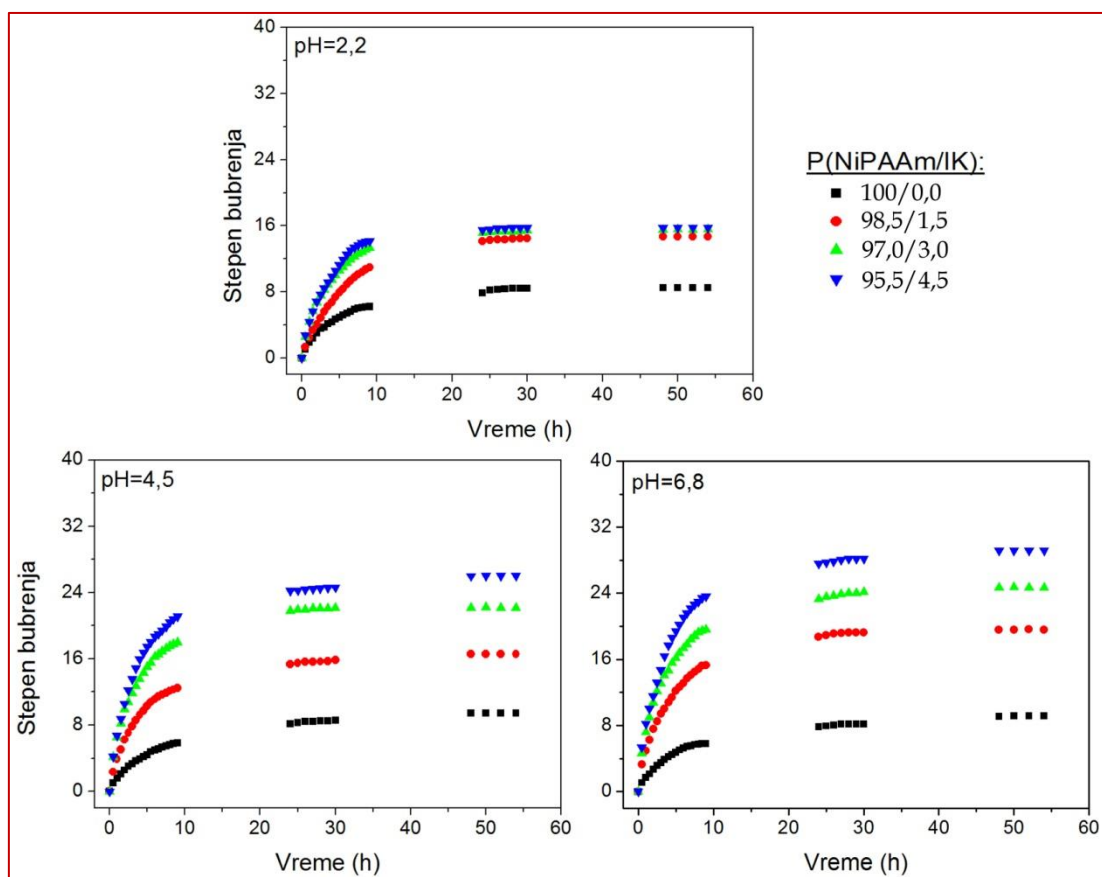
Zhao T., Chen H., Zheng J. Yu Q., Wu Z. i Yuan L., Inhibition of protein adsorption and cell adhesion on PNIPAAm-grafted polyurethane surface: Effect of graft molecular weight., *Colloid. Surface. B* **85** (2011) 26–31.

Zhou Y., Yu S.H., Wang C.Y., Li X.G., Zhu Y.R. i Chen Z.Y., A novel ultraviolet irradiation photoreduction technique for the preparation of single-crystal Ag nanorods and Ag dendrites., *Adv. Mater.* **11** (1999) 850–853.

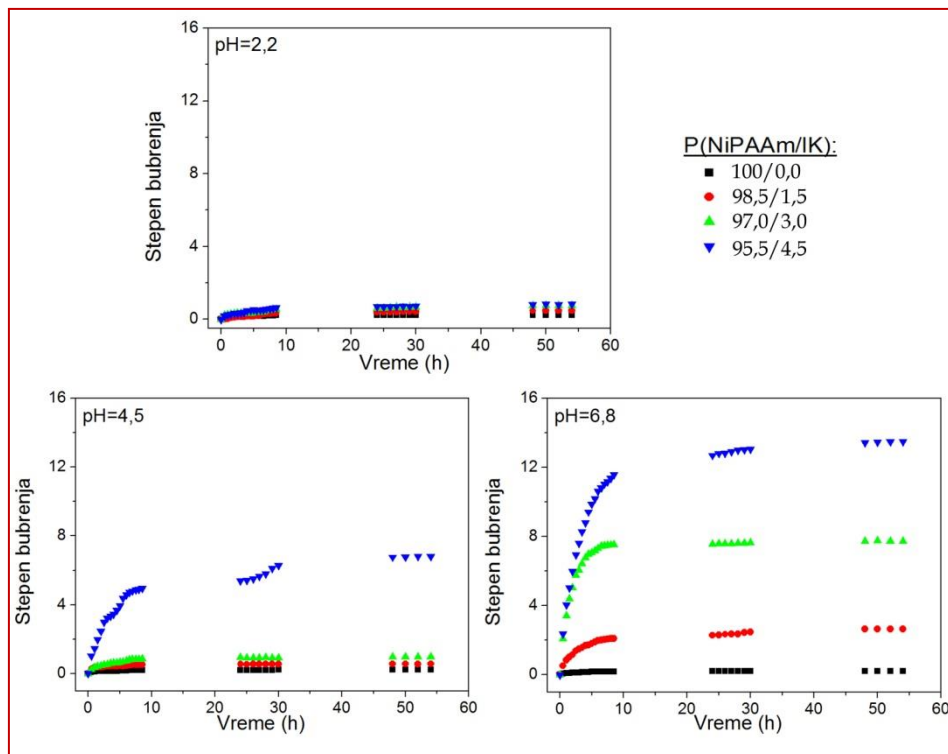
PRILOG I



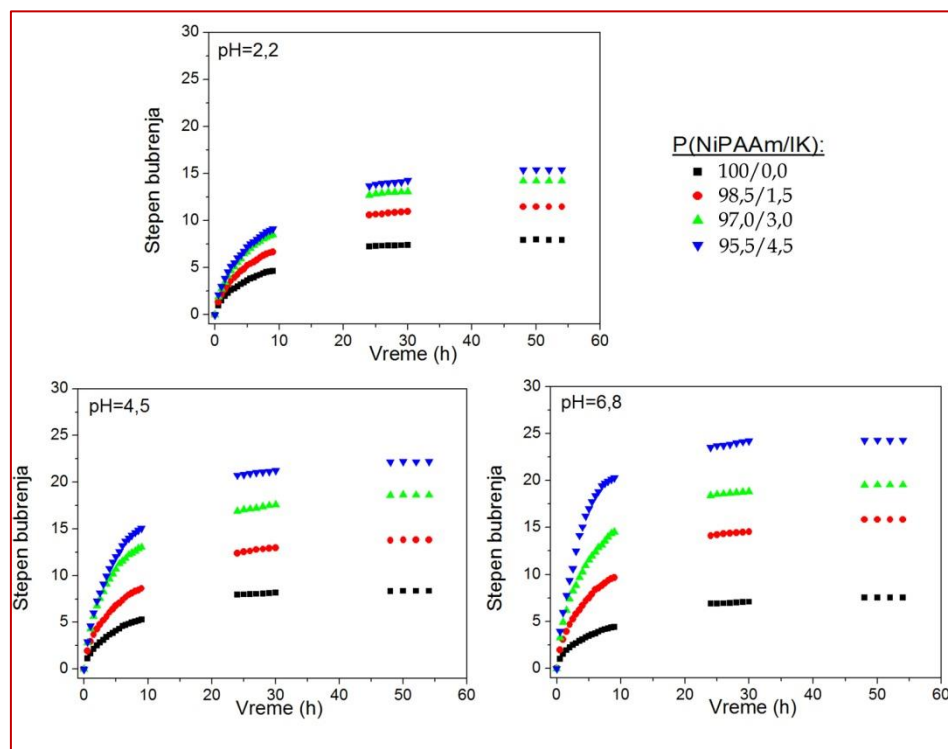
Slika P-1. Krive bubrenja Ag-PNiPAAm nanokompozita u vodi na 25 °C.



Slika P-2. Krive bubrenja P(NiPAAm/IK) hidrogelova u puferima različitih pH-vrednosti na 25 °C.

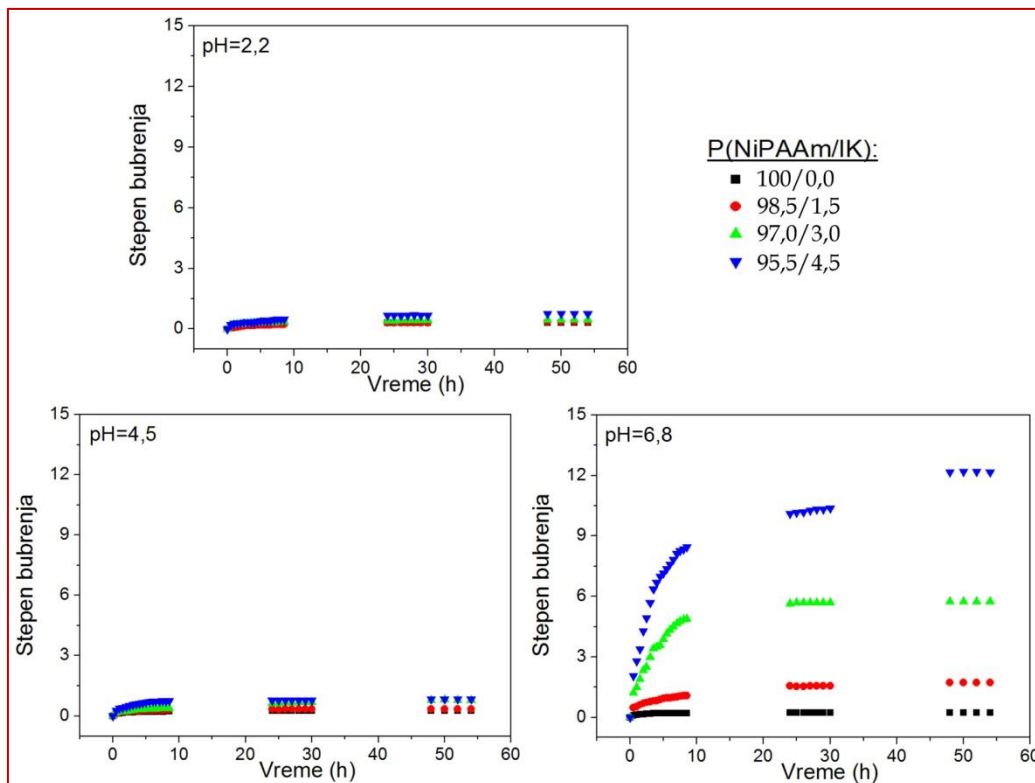


Slika P-3. Krive bubrenja P(NiPAAm/IK) hidrogelova u puferima različitih pH-vrednosti na 37 °C.

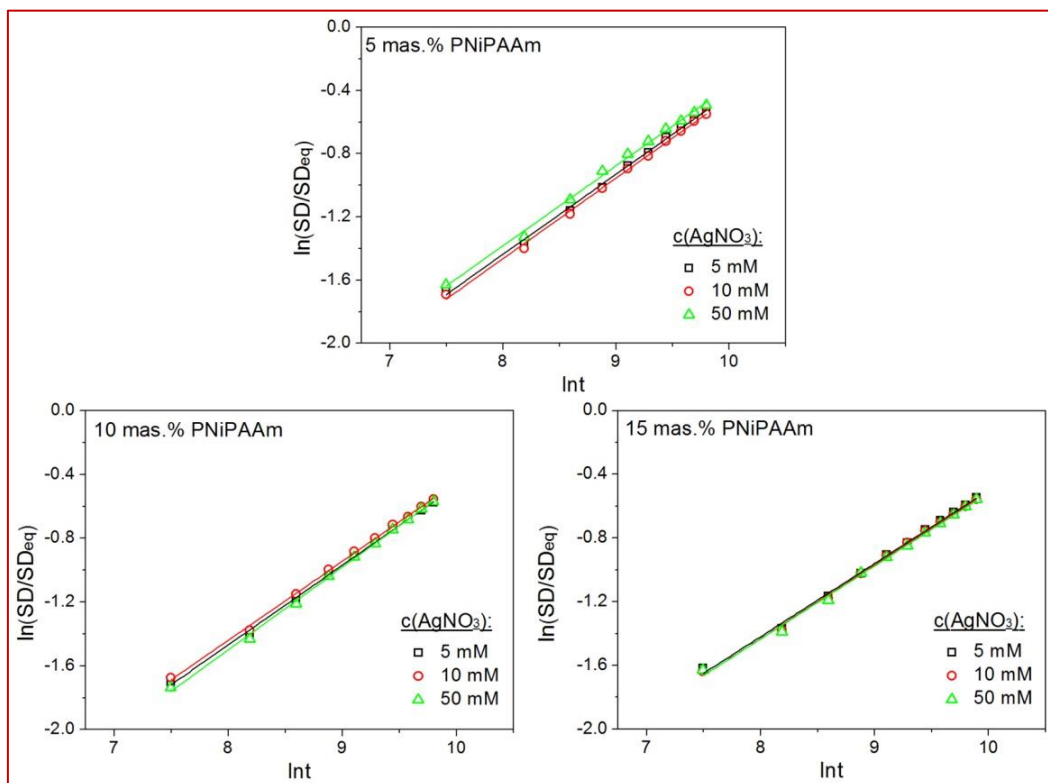


Slika P-4. Krive bubrenja Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita u puferima različitih pH-vrednosti na 25 °C.



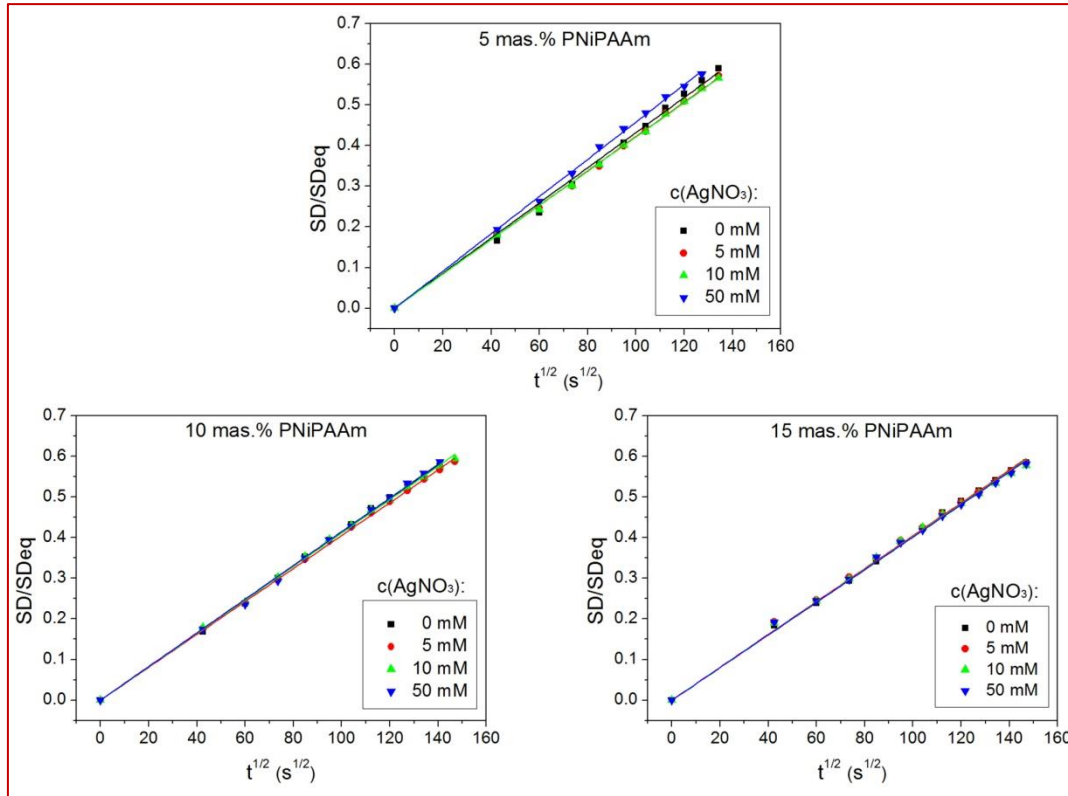


Slika P-5. Krive bubrenja Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita u puferima različiti pH-vrednosti na 37 °C.

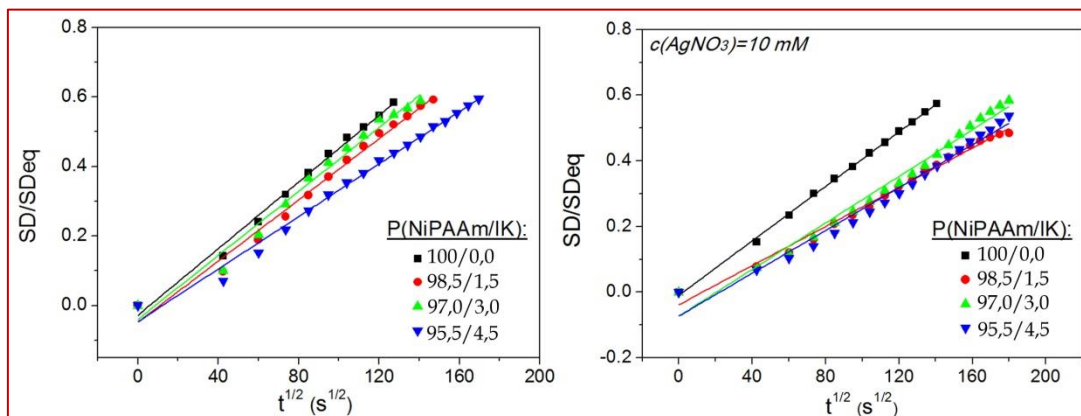


Slika P-6. Zavisnost  $\ln(SD/SD_{eq})$  od  $\ln t$  za Ag/P(NiPAAm) nanokompozite.

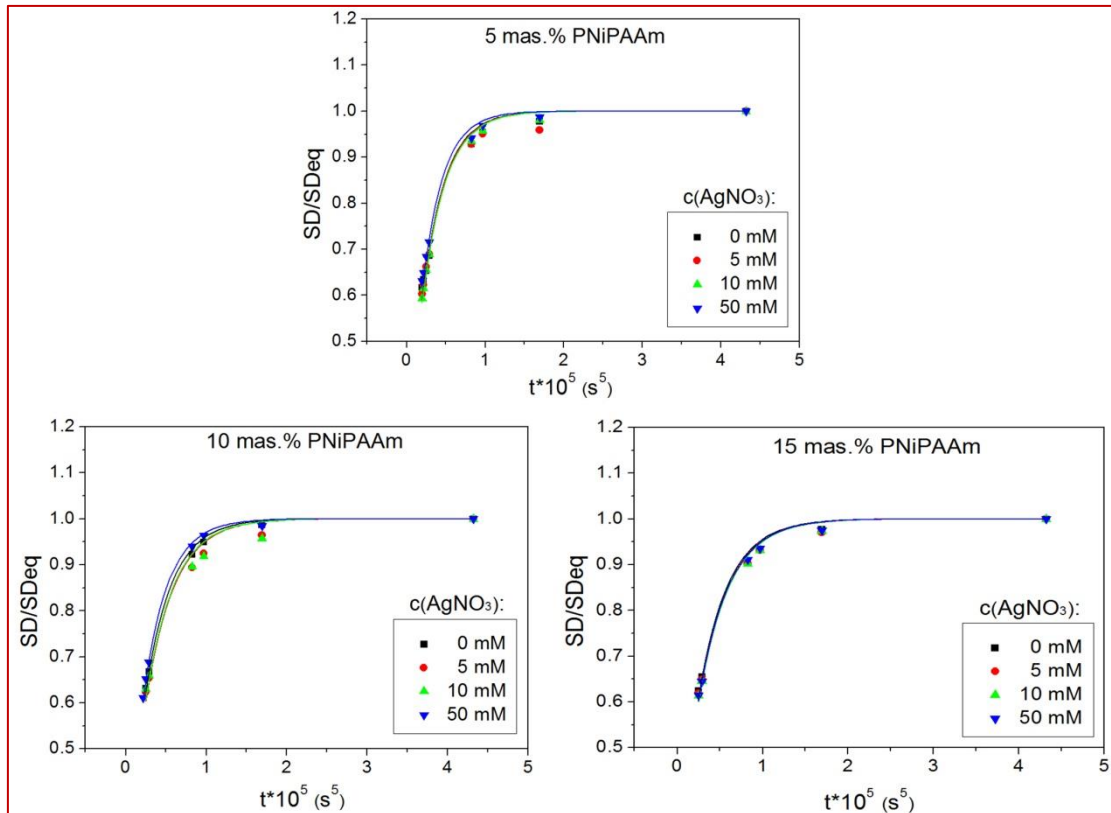
PRILOG II



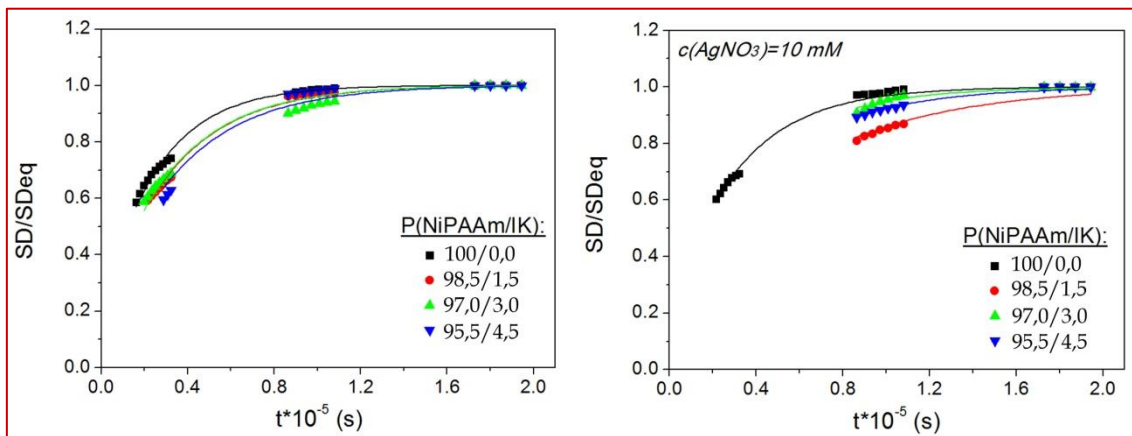
Slika P-7. Krive dobijene modelovanjem procesa bubrenja Ag/PNiPAAm nanokompozita u vodi na 25 °C, primenom *Early-time modela*.



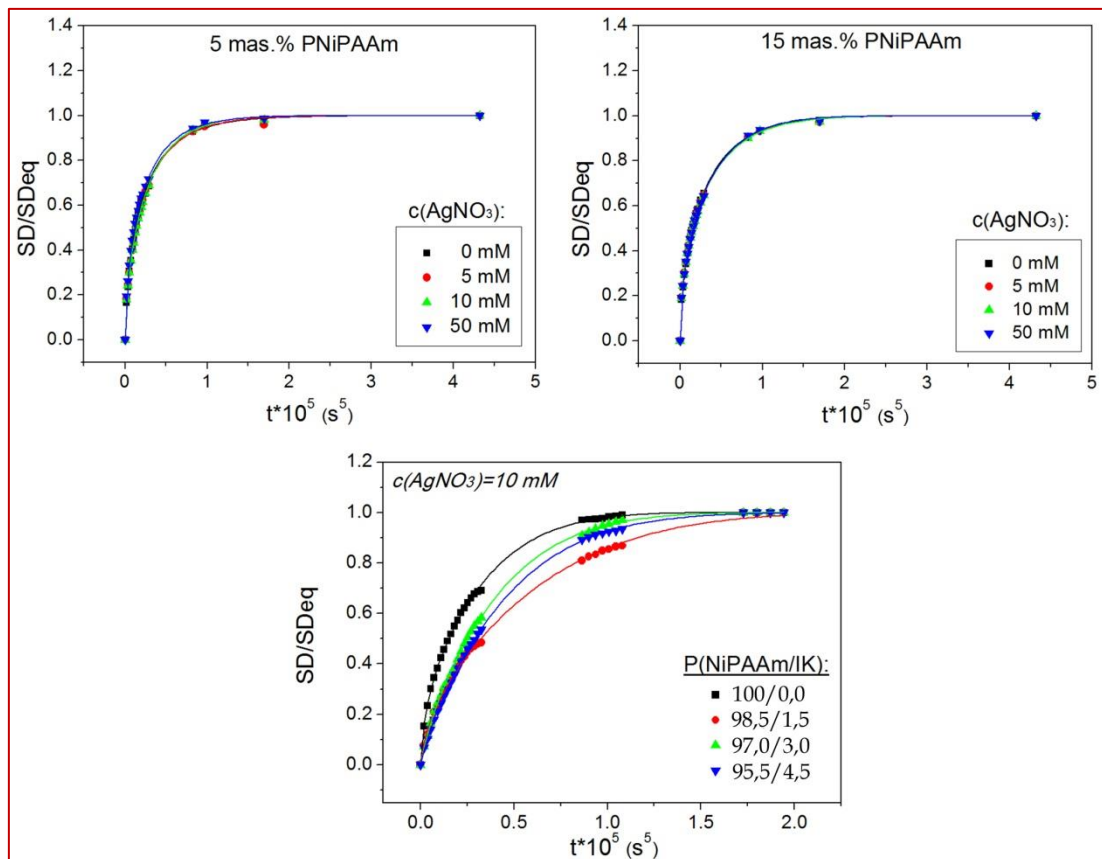
Slika P-8. Krive dobijene modelovanjem procesa bubrenja P(NiPAAm/IK) hidrogelova i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita u vodi na 25 °C, primenom *Early-time modela*.



Slika P-9. Krive dobijene modelovanjem procesa bubrenja Ag/PNiPAAm nanokompozita u vodi na 25 °C, primenom *Late-time* modela.



Slika P-10. Krive dobijene modelovanjem procesa bubrenja P(NiPAAm/IK) hidrogelova i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita u vodi na 25 °C, primenom *Late-time* modela.



**Slika P-11.** Krive dobijene modelovanjem procesa bubrenja Ag/PNiPAAm i Ag/P(NiPAAm/IK) nanokompozita u vodi na 25 °C primenom *Etter modela*.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Jelena Spasojević rođena je 06.08.1981. godine u Kruševcu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Organska hemijska tehnologija i polimerno inženjerstvo, upisala je školske 2000/01. godine, a završila u martu 2007. godine sa prosečnom ocenom 8,35 i ocenom 10,0 na diplomskom radu sa temom „Imobilizacija lipaze iz *Candida Rugosa* u hidrogelove *N*-izopropilakrilamida i itakonske kiseline“.

U periodu od novembra 2007. do decembra 2010. godine bila je zaposlena u Fresenius Medical Care Srbija, Vršac, na poziciji Viši stručni saradnik u proizvodnji.

Od februara 2011. godine zaposlena je u Institutu za nuklearne nauke Vinča, Laboratorija za radijacionu hemiju i fiziku „Gama“ (lab. 030), na naučno-istraživačkom projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Funkcionalni, funkcionalizovani i usavršeni nano materijali“ br. III 45005., sa periodom trajanja od 2011-2015. Školske 2010/2011. godine upisala je doktorske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Hemijsko inženjerstvo.

U periodu od 2011-2015 bila je angažovana na dva međunarodna projekta:

-„*Nanoscale Radiation Engeneering of Advanced Materials for Potential Biomedical applications*“, (IAEA-Coordinated Research Projects-F23028); ugovor br. 15384 - Radiolytically Synthesized Hybrid Nanosystems for Bio-Nano-Technology, period trajanja od 12.01.2009. do 12.01.2013.

-„*Radiation Curing of Composites for Enhancing their Feature and Utiliity in Healthcare and Industry*“, (IAEA-Coordinated Research Projects- F22051); ugovor br. 16733 - Radiolytic Synthesis of Nanocomposites Based on Noble Metal Nanoparticles and Natural Polymer, and Their Application as Biomaterial, period trajanja od 14.03.2011. do 14.03.2015.

Naučno-istraživački rad Jelene Spasojević se odvija pod rukovodstvom dr Aleksandre Radosavljević, višeg naučnog saradnika Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, i dr Meline Kalagasidis Krušić, vanrednog profesora Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Jelena P. Spasojević \_\_\_\_\_

број индекса \_\_\_\_\_ 4002/2010 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Radijaciono-hemijska sinteza termo- i pH-oseljivih antibakterijskih srebro/poli(N-izopropilakrilamid-ko-itakonska kiselina) nanokompozita

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

Потпис докторанда

У Београду, 05.09.2016.

Spasojević Jelena

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Jelena P. Spasojević \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ 4002/2010 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Хемијско-инженјерство \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_\_ Радијационо-хемијска синтеза термо- и pH-осетљивих антибактеријских  
сребро/poli(N-изопропилакриламид-ко-итаконска киселина) наноконтрозита

Ментори: dr Melina Kalagasidis Krušić, vanredni profesor Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet  
dr Aleksandra Radosavljević, viši naučni saradnik Univerziteta u Beogradu, Institut za nuklearne nauke Vinča

Потписани/а \_\_\_\_\_ Jelena P. Spasojević \_\_\_\_\_

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 05.09.2016.



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

**Radijaciono-hemijska sinteza termo- i pH-oseljivih antibakterijskih srebro/poli(N-izopropilakrilamid-ko-itakonska kiselina) nanokompozita**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 05.09.2016.

