

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Danijela D. Kostić

**KINETIKA I MEHANIZAM OTPUŠTANJA
SREBRA IZ NANOKOMPOZITNIH
Ag/ALGINATNIH HIDROGELOVA ZA
RAZLIČITE PRIMENE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Danijela D. Kostić

**KINETICS AND MECHANISM OF SILVER
RELEASE FROM NANOCOMPOSITE
Ag/ALGINATE HYDROGELS FOR
DIFFERENT APPLICATIONS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

Mentor:

Prof. dr Bojana Obradović, redovni profesor
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

Prof. dr Nevenka Bošković-Vragolović, redovni profesor
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Nenad Ignjatović, naučni savetnik, Institut tehnickih nauka SANU

Datum odbrane doktorske disertacije: _____, Beograd

Želela bih da se zahvalim mentoru, prof. dr Bojani Obradović, koja me je usmervalala tokom izrade ove teze i aktivno učestvovala u njenoj realizaciji. Takođe, zahvaljujem se prof. dr Nevenki Bošković-Vragolović i dr Nenadu Ignjatoviću na stručnim savetima tokom pisanja teze koji su pomogli da teza izgleda što profesionalnije.

Posebno bih želela da se zahvalim svojim kolegama Ivani Malagurski, Srđanu Vidoviću, Jasmini Stojkovskoj, Jovani Zvicer i Andrei Osmokrović na pomoći tokom izrade eksperimenata, kolegijalnosti i korektnosti tokom svih ovih godina provedenih zajedno.

Želela bih da se zahvalim svim prijateljima i porodici na podršci i razumevanju.

Ovaj doktorat posvećujem svim mladim i ambicioznim doktorantima u Srbiji.

Danijela D. Kostić

KINETIKA I MEHANIZAM OTPUŠTANJA SREBRA IZ NANOKOMPOZITNIH Ag/ALGINATNIH HIDROGELOVA ZA RAZLIČITE PRIMENE

REZIME

Nanokompoziti na bazi alginatnih hidrogelova sa nanočesticama srebra su atraktivni za primenu u medicini, i to kao antimikrobne obloge za rane i implantati za meka tkiva. Ovi nanokompoziti omogućavaju stabilizaciju i kontrolisano otpuštanje nanočestica i/ili jona srebra dok sam hidrogel obezbeđuje hidrofилnu, biokompatibilnu sredinu. Pored toga, atraktivni su i za primenu kao komponente funkcionalnih pakovanja za hranu gde bi mogli da obezbede antimikrobno dejstvo i time, i produženi vek trajanja hrane. Prema tome, funkcionalnost Ag/alginatnih nanokompozitnih hidrogelova u velikoj meri zavisi od načina i brzine otpuštanja srebra. Pored toga, poznavanje mehanizma i kinetike otpuštanja nanočestica i/ili jona srebra je ključno i sa stanovišta utvrđivanja uticaja ovih nanokompozita na ljudski organizam i životnu sredinu prilikom upotrebe.

Cilj istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji je bio razvoj matematičkih modela koji bi opisali mehanizam i kinetiku otpuštanja nanočestica i/ili jona srebra iz nanokompozitnih alginatnih hidrogelova radi postizanja antimikrobne aktivnosti u različitim primenama. Shodno tome, fokus je stavljen na hidrogelove sa elektrohemijski sintetisanim nanočesticama srebra za potencijalnu primenu u medicini, kao i na razvoj i karakterizaciju kompozitnih polimernih filmova sa alginatnim mikročesticama sa sadržanim nanočesticama srebra sintetisanim hidrotermalnom metodom za primenu u pakovanju hrane.

Primenom obe navedene metode u rastvoru natrijum-alginata uspešno su sintetisane sferične nanočestice srebra u opsegu veličina od 4 – 30 nm dajući stabilne Ag/alginatne koloidne rastvore. Ovi rastvori su dalje bili pogodni za dobijanje hidrogelova u različitim oblicima tako da su izlivanjem dobijeni nanokompozitni diskovi, a elektrostatičkom ekstruzijom nanokompozitne mikročestice. Hidrogelovi sa elektrohemijski sintetisanim nanočesticama su zatim ispitivani u pogledu kinetike otpuštanja nanočestica i/ili jona srebra pri različitim hidrodinamičkim uslovima relevantnim za primenu u medicini. Statički uslovi i direktan kontakt dva hidrogela su imitirali obloge za rane i implantate u neprokrvljenim tkivima dok su ispitivanja pri kontinualnom protoku fluida imitirala implantaciju u vaskularizovana tkiva. Posebno su

izvedeni eksperimenti u vodi i fiziološkom rastvoru kao modelu bioloških fluida. Na osnovu eksperimentalnih ispitivanja su zatim razvijeni i uspešno primenjeni matematički modeli koji su uključili difuziju nanočestica srebra kroz alginatnu matricu, reakciju oksidacije nanočestica i reakciju sa jonima hlora iz rastvora, i, najzad, difuziju nagrađenih formi $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$. Dobijeni su veoma niski koeficijenti difuzije nanočestica srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica u vodi reda veličine $\sim 10^{-18} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ što ukazuje na dobru stabilizaciju nanočestica srebra u alginatnoj matrici. U direktnom kontaktu sa alginatnim hidrogelom u statičkim uslovima, mala količina ($\sim 0,7 \%$) nanočestica je migrirala stvarajući veće agregate na površini hidrogela i više manjih agregata ($\sim 400 \text{ nm}$) unutar hidrogela. Sa druge strane, kontinualni protok vode kroz pakovani sloj Ag/alginatnih mikročestica je izazvao nekoliko puta veće otpuštanje srebra izazvano spiranjem nanočestica intersticijalnom brzinom fluida unutar mikročestica koja je određena kao $\sim 5 \text{ nm s}^{-1}$. Matematičko modelovanje otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih mikročestica u fiziološkom rastvoru je ukazalo na oksidaciju nanočestica kinetikom prvog reda sa konstantom brzine reda veličine $\sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. Pri tome je brzina oksidacije i reakcije sa jonima hlora rasla sa brzinom prenosa mase ovih jona tako da je bila najveća u slučaju suvih Ag/alginatnih mikročestica u kojima je tokom bubrenja ostvaren konvektivni prenos. Shodno tome, brzina difuzije nagrađenih $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ formi u tom slučaju je bila i najmanja ukazujući da je najverovatnije većim delom formiran precipitat AgCl.

Hidrotermalna sinteza kao jeftinija od elektrohemijske, je primenjena za dobijanje Ag/alginatnih koloidnih rastvora koji su putem elektrostatičke ekstruzije gelirani u obliku nanokompozitnih mikročestica koje su zatim ugrađene u filmove od poli(laktidne kiseline) (PLA) i poli(vinil alkohola) (PVA). Ovi filmovi su zatim ispitani sa stanovišta otpuštanja srebra u simulante za hranu na bazi vode odnosno 3 % zap. rastvor sirćetne kiseline, u destilovanu vodu, 10 % zap. rastvor etanola i 95 % zap. rastvor etanola. Najveće otpuštanje srebra je dobijeno u rastvoru sirćetne kiseline usled oksidacije nanočestica srebra pa tako i lakše difuzije jona kroz film. Koeficijenti difuzije srebra određeni za suve Ag/alginatne mikročestice i PLA kompozitne filmove su bili reda veličine $10^{-17} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. PLA kompozitni filmovi su pokazali slabu ali vidljivu antimikrobnu aktivnost na soju *S. aureus* pojavom inhibicione zone debljine oko 1 mm, dok nisu imali efekta na soj bakterije *E. coli*.

Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju da nanokompozitni biomaterijali na bazi nanočestica srebra i alginata u obliku hidrogelova imaju potencijal za biomedicinsku primenu kao antimikrobne obloge za rane ili implantati za meka tkiva. Isto tako, suve Ag/alginatne mikročestice su se pokazale kao veoma pogodne za umešavanje sa hidrofobnim (PLA) i hidrofilnim (PVA) rastvorima polimera otvarajući nove mogućnosti za dobijanje antimikrobnih filmova koji mogu naći primenu u pakovanju hrane.

Ključne reči: nanočestice srebra, alginat, nanokompozitni hidrogelovi, nanokompozitni PVA filmovi, nanokompozitni PLA filmovi, otpuštanje srebra, antibakterijska aktivnost, matematičko modelovanje, kinetika otpuštanja srebra, koeficijenti difuzije, konstante oksidacije nanočestica.

Naučna oblast: HEMIJSKO INŽENJERSTVO

KINETICS AND MECHANISM OF SILVER RELEASE FROM NANOCOMPOSITE Ag/ALGINATE HYDROGELS FOR DIFFERENT APPLICATIONS

ABSTRACT

Nanocomposite alginate hydrogels with incorporated silver nanoparticles are attractive for medical applications such as antimicrobial wound dressings and soft tissue implants. These nanocomposites provide stabilization and controlled release of silver nanoparticles and/or ions while the hydrogel itself, provides a hydrophilic and biocompatible environment. In addition, Ag/alginate nanocomposites are attractive for applications as components of functional food packaging due to antimicrobial effects that prolong food freshness. Thus, the functionality of Ag/alginate nanocomposite hydrogels largely depends on the rate and route of silver release. Furthermore, understanding the kinetics and mechanism of silver nanoparticle and/or ion release is crucial from the point of assessing the effects on human tissues and the body as well as on the environment during the nanocomposite use.

The aim of this doctoral thesis was to develop mathematical models describing mechanisms and kinetics of silver nanoparticle and/or ion release from nanocomposite Ag/alginate hydrogels designed to achieve antimicrobial activity in different applications. The focus was on Ag/alginate hydrogels with electrochemically synthesized silver nanoparticles for potential applications in medicine, as well as on development and characterization of composite polymer films containing Ag/alginate microbeads with silver nanoparticles synthesized by a hydrothermal method for applications in food packaging.

Utilization of both synthesis methods in Na-alginate solutions resulted in spherical silver nanoparticles in the size range 4 – 30 nm yielding stable Ag/alginate colloid solutions. The solutions were suitable for production of hydrogels in different forms such as discs produced by decanting and gelation as well as microbeads obtained by electrostatic extrusion. Hydrogels with electrochemically synthesized silver nanoparticles were investigated next regarding the release kinetics of silver nanoparticles and/or ions under different hydrodynamic conditions relevant for medical applications. Static conditions and a direct contact of a nanocomposite and an alginate hydrogel were set to mimic wound dressings and implants in nonvascularized tissues

while the studies under continuous fluid perfusion imitated implants in vascularized tissue sites. In addition, the experiments were performed in water and physiological saline solution as a model of biological fluids. Based on the experimental results mathematical models were derived, which included diffusion of nanoparticles within the alginate hydrogel, nanoparticle oxidation and reaction with chloride ions present in the saline solution, and finally, diffusion of formed $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ species. Very small values of diffusion coefficients were estimated in the order of magnitude $\sim 10^{-18} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ for silver nanoparticles diffusing from Ag/alginate microbeads in water, which indicates good nanoparticle stabilization within the alginate matrix. In direct contact of the two hydrogels under static conditions, only a small quantity of nanoparticles ($\sim 0.7 \%$) has migrated forming larger aggregates on the hydrogel surface and many smaller aggregates ($\sim 400 \text{ nm}$) within the alginate hydrogel. On the other hand, continuous water perfusion through the packed bed of Ag/alginate microbeads induced several fold higher silver release caused by nanoparticle wash out from the microbeads with the interstitial velocity estimated as $\sim 5 \text{ nm s}^{-1}$. Mathematical modeling of silver release from Ag/alginate microbeads in physiological saline solution indicated nanoparticle oxidation following first order kinetics with kinetic rate constants in the order of magnitude of $\sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. Moreover, the rates of oxidation and reaction with Cl^- ions increased with the increase in mass transport rate of these ions being the highest in the case of dry Ag/alginate microbeads, in which convective transport was occurring during bead swelling. Accordingly, diffusion rate of the formed $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ species in this case was the lowest implying that probably mostly solid AgCl precipitated within the beads. A hydrothermal method, as a cheaper method than the electrochemical synthesis, was used to obtain Ag/alginate colloid solutions, which were then electrostatically extruded to form nanocomposite microbeads that were further embedded in films of poly(lactic acid) (PLA) and poly(vinyl alcohol) (PVA). The obtained films were studied regarding silver release in food simulants based on water, *i.e.* distilled water and the following aqueous solutions: 3 vol. % acetic acid, 10 vol. % ethanol and 95 vol. % ethanol. The highest silver release was obtained in the acetic acid solution due to oxidation of silver nanoparticles resulting in faster diffusion of silver ions through the film. Apparent diffusion coefficients of silver nanoparticles and/or ions for dry Ag/alginate microbeads and PLA composite films were estimated in the order of magnitude of $\sim 10^{-17} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.

PLA composite films have exhibited weak but visible antibacterial activity against *S. aureus* forming an inhibition zone about 1 mm thick, while the effects against *E. coli* were not apparent.

Results presented in this doctoral thesis indicate that nanocomposite biomaterials based on silver nanoparticles and alginate hydrogels have potential for biomedical applications as antimicrobial wound dressings or implants for soft tissues. Also, dry Ag/alginate microbeads were shown to be suitable for mixing in hydrophobic (PLA) and hydrophilic (PVA) polymer solutions providing new possibilities for fabrication of antimicrobial composite films attractive for food packaging applications.

Keywords: silver nanoparticles, alginate, nanocomposite hydrogels, nanocomposite PVA films, nanocomposite PLA films, silver release, antibacterial activity, mathematical modeling, kinetics of silver release, diffusion coefficients, kinetic rate constant of nanoparticle oxidation.

Scientific Field: CHEMICAL ENGINEERING

SADRŽAJ

UVOD	1
1. TEORIJSKI DEO	3
1.1. SREBRO	4
1.2. NANOČESTICE SREBRA	4
1.2.1. Sinteza nanočestica srebra	6
1.2.1.1. <i>Metoda odozgo-na dole</i>	6
1.2.1.2. <i>Metoda odozdo - na gore</i>	7
1.2.1.3. <i>Jonska stabilizacija</i>	7
1.2.1.4. <i>Sterna stabilizacija</i>	8
1.2.2. Agregacija nanočestica srebra	9
1.2.3. Karakterizacija nanočestica srebra	11
1.2.4. Interakcije nanočestica srebra u fiziološkoj sredini u prisustvu jona hlora	13
1.2.5. Antimikrobna aktivnost	15
1.2.6. Komercijalna upotreba nanočestica srebra i regulativa	16
1.3. ALGINAT	20
1.3.1. Elektrostatička ekstruzija	23
1.3.2. Difuzivnost u alginatnom hidrogelu	24
1.3.3. Degradacija alginatnog hidrogela	25
1.3.4. Ag/alginatni hidrogelovi	26

1.4. POLI (VINIL ALKOHOL)	28
1.5. POLI (LAKTIDNA KISELINA)	30
1.6. PRENOS MASE KROZ HIDROGEL	34
1.6.1. Matematičko modelovanje difuzije imobilisanih supstanci iz hidrogela	37
1.7. MIGRACIONI TEST OTPUŠTANJA SUPSTANCI IZ PAKOVANJA ZA HRANU	39
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	42
3. MATERIJALI I METODE	44
3.1. MATERIJALI	45
3.2. SINTEZA Ag/ALGINATNIH KOLOIDNIH RASTVORA	45
3.2.1. Elektrohemijska metoda	45
3.2.2. Hidrotermalna metoda	46
3.3. DOBIJANJE NANOKOMPOZITNIH MATERIJALA	47
3.3.1. Dobijanje nanokompozitnih Ag/alginatnih hidrogelova u obliku mikročestica	47
3.3.2. Dobijanje i rehidracija suvih nanokompozitnih mikročestica	49
3.3.3. Dobijanje Ag/alginatnih nanokompozitnih hidrogelova u obliku diskova	49
3.3.4. Dobijanje filmova na bazi PLA	50
3.3.5. Dobijanje filmova na bazi PVA	50

3.4. METODE KARAKTERIZACIJE Ag/ALGINATNIH NANOKOMPOZITA	51
3.4.1. Optička mikroskopija	51
3.4.2. Transmisiona elektronska mikroskopija	51
3.4.3. FE-skenirajuća elektronska mikroskopija	51
3.4.4. Određivanje koncentracije srebra	52
3.4.5. Uv-vidljiva spektroskopija	53
3.4.5.1. Korelisanje koncentracije srebra u koloidnim rastvorima i dobijenim Ag/alginatnim mikročesticama	54
3.4.6. Antimikrobna aktivnost PLA i PVA kompozitnih filmova	55
3.5. ISPITIVANJE KINETIKE OTPUŠTANJA SREBRA	56
3.5.1. Kinetika otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih mikročestica proizvedenih iz koloidnog rastvora dobijenog elektrohemijском metodom korišćenjem alginata srednje viskoznosti	57
3.5.1.1. Otpuštanje srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica u dH ₂ O u statičkim uslovima i uslovima mešanja u vodenom kupatilu	57
3.5.1.2. Otpuštanje srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica u fiziološkom rastvoru u statičkim uslovima i uslovima mešanja u vodenom kupatilu	57
3.5.1.3. Otpuštanje srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica u statičkim uslovima u fiziološkom rastvoru	58
3.5.2. Kinetika otpuštanja srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica proizvedenih iz koloidnog rastvora dobijenog elektrohemijском metodom	

korišćenjem alginata niske viskoznosti	59
3.5.2.1. <i>Otpuštanje srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica u statičkim uslovima u dH₂O</i>	59
3.5.2.2. <i>Otpuštanje srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica pri u pakovanom sloju kontinualnom protoku dH₂O</i>	59
3.5.3. Kinetika otpuštanja srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica proizvedenih iz koloidnog rastvora dobijenog hidrotermalnom sintezom	60
3.5.3.1. <i>Otpuštanje srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica u statičkim uslovima u simulantima hrane na bazi vode</i>	60
3.5.4. Otpuštanje srebra iz PLA i PVA kompozitnih filmova	61
3.5.5. Ispitivanje migracije nanočestica srebra iz Ag/alginatnog diska u alginatni disk u direktnom kontaktu	61
4. REZULTATI	62
4.1. KOLOIDNI RASTVOR ALGINATA SA ELEKTROHEMIJSKI SINTETISANIM NANOČESTICAMA SREBRA	63
4.2. KOLOIDNI RASTVOR ALGINATA SA HIDROTERMALNO SINTETISANIM NANOČESTICAMA SREBRA	65
4.3. MIKROČESTICE DOBIJENE IZ KOLOIDNOG RASTVORA SINTETISANOG ELEKTROHEMIJSKOM METODOM	70
4.4. MIKROČESTICE DOBIJENE IZ KOLOIDNOG RASTVORA SINTETISANOG HIDROTERMALNOM METODOM	74
4.5. PLA KOMPOZITNI FILMOVI	78
4.5.1. Optička mikroskopija PLA kompozitnih filmova	78

4.5.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija PLA kompozitnih filmova	79
4.5.3. Uv-vidljiva spektroskopija	80
4.5.4. Antibakterijska aktivnost PLA kompozitnih filmova	81
4.6. PVA KOMPOZITNI FILMOVI	81
4.6.1. Optička mikroskopija PVA kompozitnih filmova	81
4.6.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija PVA kompozitnih filmova	82
4.6.3. Uv-vidljiva spektroskopija	83
4.6.4. Antibakterijska aktivnost PVA kompozitnih filmova	84
4.7. ISPITIVANJE KINETIKE OTPUŠTANJA SREBRA IZ KOMPOZITNIH MATERIJALA SA NANOČESTICAMA SREBRA	85
4.7.1. Kinetika otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih mikročestica proizvedenih iz koloidnog rastvora dobijenog elektrohemijском metodom korišćenjem alginata srednje viskoznosti	85
4.7.1.1. <i>Otpuštanje srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica u dH₂O u statičkim uslovima i u uslovima mešanja u vodenom kupatilu</i>	86
4.7.1.2. <i>Otpuštanje srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica u fiziološkom rastvru u statičkim uslovima i uslovima mešanja u vodenom kupatilu</i>	90
4.7.1.3. <i>Otpuštanje srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica u statičkim uslovima u fiziološkom rastvoru</i>	94
4.7.2. Kinetika otpuštanja srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica proizvedenih iz koloidnog rastvora dobijenog elektrohemijском metodom korišćenjem alginata niske viskoznosti	97

4.7.2.1. <i>Otpuštanje srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica u dH₂O u statičkim uslovima i u pakovanom sloju pri kontinualnom protoku</i>	97
4.7.3. Kinetika otpuštanja srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica proizvedenih iz koloidnog rastvora dobijenog hidrotermalnom sintezom	101
4.7.3.1. <i>Otpuštanje srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica u statičkim uslovima u simulantima hrane na bazi vode</i>	101
4.7.4. Otpuštanje srebra iz PLA i PVA kompozitnih filmova	104
4.7.4.1. <i>Kinetika otpuštanja srebra iz PLA i PVA kompozitnih filmova u 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline na 20 °C</i>	104
4.7.4.2. <i>Koncentracije otpuštenog srebra iz PLA i PVA kompozitnih filmova nakon 10 dana u različitim simulantima hrane na bazi vode na različitim temperaturama</i>	106
4.7.5. Kinetika difuzije srebra iz jednog u drugi hidrogel	112
4.8. MATEMATIČKI MODEL OTPUŠTANJA SREBRA	114
4.8.1. Matematički model otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih mikročestica proizvedenih iz koloidnog rastvora dobijenog elektrohemijском metodom korišćenjem alginata srednje viskoznosti	115
4.8.1.1. <i>Vlažne Ag/alginatne mikročestice u dH₂O u statičkim uslovima i u uslovima mešanja u vodenom kupatilu</i>	115
4.8.1.2. <i>Ag/alginatne mikročestice u fiziološkom rastvoru u statičkim uslovima i u uslovima mešanja u vodenom kupatilu</i>	120

4.8.2. Kinetika otpuštanja srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica proizvedenih iz koloidnog rastvora dobijenog elektrohemijskom metodom korišćenjem alginata niske viskoznosti	129
4.8.2.1. <i>Vlažne Ag/alginatne mikročestice u statičkim uslovima u dH₂O</i>	129
4.8.2.2. <i>Vlažne Ag/alginatne mikročestice pri kontinualnom protoku dH₂O u pakovanom sloju</i>	130
4.8.3. Kinetika otpuštanja srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica proizvedenih iz koloidnog rastvora dobijenog hidrotermalnom sintezom	136
4.8.3.1. <i>Suve Ag/alginatne mikročestice u statičkim uslovima u različitim simulantima hrane na bazi vode</i>	136
4.8.4. Modelovanje otpuštanja srebra iz PLA I PVA kompozitnih filmova u 3 % zap. Rastvoru sirćetne kiseline na 20 °C	139
5. DISKUSIJA	143
6. ZAKLJUČAK	156
7. PRILOG	161
7.1. SPISAK SLIKA	163
7.2. SPISAK TABELA	173
7.3. SPISAK OZNAKA	174
8. LITERATURA	177

UVOD

Nanočestice su čestice nanometarskih dimenzija od 1-100 nm. U poslednjih par decenija nanočestice srebra su postale veoma atraktivan fokus mnogih istraživačkih grupa zbog svog izuzetnog antimikrobnog dejstva tako da se sve više probijaju na tržište medicinskih materijala, kozmetike, materijala za pakovanje hrane, kao i u sisteme za prečišćavanje vode.

Kako mikroorganizmi postaju sve otporniji na antibiotike, postoji sve veća potreba da se nađe rešenje kojim bi se obezbedila sterilna sredina. Usled izuzetno izražene antimikrobne aktivnosti prema bakterijama, virusima i gljivama, nanočestice srebra se istražuju kao jedno od rešenja ovog problema. Smatra se da su nanočestice potentnije od jona srebra baš zbog svog produženog antimikrobnog dejstva. Glavni nedostatak u primeni nanočestica srebra je njihova nestabilnost i sklonost ka aglomeraciji zbog težnje ka dostizanju nižeg energetskog stanja. Aglomeracijom se, međutim, smanjuje antimikrobna aktivnost. Da bi se ovaj fenomen izbegao, nanočestice je potrebno dodatno stabilisati što je moguće postići rastvorima različitih polimera kao na primer: alginata, hitozana, poli (vinil alkohola) i drugim. Alginat je posebno atraktivan biomaterijal, jer lako gelira u prisustvu jona kalcijuma dajući hidrogelove koji su biokompatibilni i biodegradabilni i kao takvi, u širokoj su biomedicinskoj upotrebi i to posebno kao obloge za rane zbog velike sorpcione moći, a time i regulacije vlage u rani. U kombinaciji sa nanočesticama srebra, hidrogelovi na bazi alginata imaju sposobnost da usled bubrenja otpuštaju srebro i deluju antimikrobno, a sa druge strane apsorbuju višak vlage iz rane i na taj način utiču na brže zarastanje rana. Kako nanočestice srebra mogu imati i citotoksične efekte, tako je potrebno opisati i jasno poznavati mehanizam otpuštanja i/ili oksidacije ovih nanočestica, kao i njihovu interakciju sa okolnom sredinom. To su i glavne prepreke u definisanju funkcije nanokompozitnih biomaterijala i to nedovoljno poznati podaci o obliku i koncentraciji u kojoj se otpuštaju nanočestice srebra, brzini oksidacije nanočestica, kao i o mogućim interakcijama sa okolnim jonima. Upravo zbog ovih nedovoljno poznatih činjenica Evropska uprava za bezbednost hrane (European Food Safety Authority, EFSA) još uvek nije odobrila korišćenje nanočestica srebra za komercijalnu primenu u pakovanju hrane, kao i u medicinskim uređajima i proglasila je medicinske materijale sa nanočesticama srebra, matarijalima III stepena

visokog rizika. Zbog toga je od ključnog značaja poznavanje načina otpuštanja i interakcija nanočestica kako u organizmu tako i u životnoj sredini nakon upotrebe proizvoda na bazi nanokompozita.

Cilj istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji je bio opis mehanizma i kinetike otpuštanja nanočestica srebra, iz nanokompozitnih hidrogelova na bazi alginata. Pri tome su primenjene elektrohemijska sinteza i hidrotermalna metoda sinteze nanočestica. Eksperimentalno je ispitana i matematički modelovana kinetika otpuštanja srebra iz nanokompozitnih Ag/alginatnih hidrogelova u suvoj i vlažnoj formi, dobijenih iz koloidnog rastvora sintetisanog elektrohemijskom metodom, u vodi i fiziološkom rastvoru za primenu u medicini. Sa druge strane, ispitana je kinetika otpuštanja nanočestica srebra sintetisanih hidrotermalnom metodom iz suvih Ag/alginatnih mikročestica i iz kompozitnih filmova na bazi poli(vinil alkohola) (PVA) i poli(laktidne kiseline) (PLA) sa suvim Ag/alginatnim mikročesticama u svrhu razvoja novih materijala za primenu u pakovanju hrane.

1. TEORIJSKI DEO

1.1. SREBRO

Hiljadama godina, metalno srebro i joni srebra su korišćeni u svakodnevnoj upotrebi i u tradicionalnoj medicini zbog svoje antibakterijske aktivnosti. Drevni Rimljani su u vodu ubacivali srebrne novčiće, što je ostalo kao običaj i danas u mnogim kulturama. Upotreba srebra u klinici ima takođe dugogodišnju tradiciju. Godine 1884., Krede, nemački akušer je koristio 1 % rastvor srebra nitrata za tretman slepila uzrokovano infekcijom kod novorođenčadi (Jain i sar., 2009). Početkom 20. veka infekcija velikih preloma i rana je postala najveći uzrok smrti pacijenata sa ovim problemom, čak 50 % (Reiss i Artz, 1954). Opekotine potpuno destabilišu funkciju kože što čini kožu pogodnom za napade mikroorganizama koji izazivaju sepsu. Koža ostaje pogodna za bakteriološke i mikrobne napade sve dok se epitel potpuno ne obnovi. Uprava za hranu i lekove (Food and Drug Administration, FDA) je odobrila korišćenje koloidnog srebra još 1950. godine bez nekih posebnih naznaka o sigurnosti i bezbednosti korišćenja ovih proizvoda (Gupta i Kumar, 2014). Ipak, sa pojavom antibiotika 1940. godine istraživanja medicinske upotrebe srebra su značajno opala. Godine 1965. prvi put je korišćen 0,5 % rastvor srebra-nitrata za lečenje opekotina, što je ponovo obnovilo istraživački interes za srebro. Četiri godine kasnije, 1968. predstavljena je krema sa 1 % srebra-sulfadiazina, koji je postao jedan od vodećih antimikrobnih agenasa za lečenje opekotina i rana poslednjih 40 godina (Fox 1968). Pokazano je i da se antimikrobna aktivnost raznih antibiotika pojačava u prisustvu srebra (Wijnhoven i sar., 2009).

1.2. NANOČESTICE SREBRA

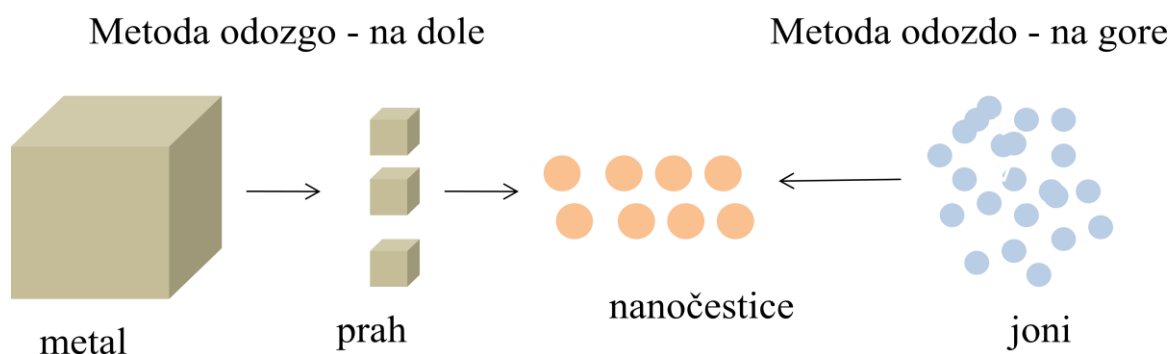
Nanomaterijali se definišu kao prirodni ili sintetisani materijali koji sadrže čestice u neagregiranoj formi i bez aglomerata gde je više od 50 % dobijenih čestica u opsegu veličina od 1 – 100 nm (Regulation (EU) No 528/2012, 2012). Generalno, nanočestice imaju specifične karakteristike zbog velikog udela površinskih atoma u odnosu na jedinicu zapremine. Zbog velike specifične površine, nanočestice poseduju veliku površinsku energiju i zato su termodinamički nestabilne. Nanočestice srebra su poslednjih godina postale sve atraktivnije zbog svog izraženog antibakterijskog (Wijnhoven i sar., 2009; Yin i sar., 1999, Guzman i sar., 2012), antiviralnog (Sun i sar., 2005, Elechiguerra i sar., 2005) i antigljivičnog efekta na sojevima *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, i *Saccharomyces cerevisiae* (Wright i sar., 1999)

i to za različite primene u tekstilnoj industriji (Benn i Westerhoff, 2008), biomedicini (Wijnhoven i sar., 2009, Senjen, 2007), inženjerstvu tkiva (Diniz i sar., 2015, Liu i sar., 2012, Sun i sar., 2015) i industriji pakovanja hrane (Cushen 2012, Huang i sar., 2011, Goetz i sar., 2013, Echegoyen i Nerin, 2013, Metak i Ajaal, 2013). Takođe, zbog izraženog antimikrobnog efekta, nanočestice srebra su našle veoma dobru primenu u tretiranju dubokih nekrotičnih rana, ostvarujući tako sterilnu sredinu u rani. Takođe je pokazano da nanočestice srebra ne dovode do zapaljinskog efekta u in vivo uslovima (Nadworny i sar., 2010, Kirsner i sar., 2001) i ubrzavaju zalečenje rana (Tian i sar., 2007). Upotreba srebra u jonskom obliku je zbog toksičnosti prema čoveku u nekoliko navrata limitirana, tako da se danas sve više teži novim proizvodima sa srebrom u formi nanočestica koje su pokazale izražen antimikrobni efekat ali i slabu citotoksičnost (Jain i sar., 2009).

Nanočestice srebra mogu dospeti u organizam na tri načina: inhalacijom, preko kože i oralno. Eksperimenti koji su urađeni na miševima pokazali su da nanočestice srebra veličina 14 nm, 10 nm, 75 nm i 110 nm unete oralnm putem nisu delovale toksično i nisu izazvale imunološki odgovor, ali pokazano je da se određena količina unesenih nanočestica srebra našla najviše u jetri i bubrezima (Loeschner i sar., 2011, Boudreau i sar., 2016). Takođe, nanočestice mogu da prođu kroz biološke membrane i mogu da difunduju u biološke tečnosti gde se putem krvi konvektivnim transportom mogu dopremiti do različitih delova tela (Dukhin i Labib, 2013, Quadros i Marr 2010, Oberdörster i sar. 2005; Ji i sar., 2007, Sung i sar., 2009). Pošto prečnici pora mnogih krvnih sudova u tkivima ne prelazi 6 nm, agregirani oblici nanočestica srebra ne bi mogle da se nađu u tkivima. Sa druge strane, pore krvnih sudova u tkivima tumora su od 100 nm do 780 nm pa bi tako nanočestice srebra mogle da nađu primenu i u uništavanju ćelija tumora (Wang i sar., 2011). Jedan od osnovnih problema pri difundovanju nanočestica srebra u biološkim sistemima jeste njihova tendencija da nakon oksidacije reaguju sa jonima hlora u biološkim tečnostima i tako grade nerastvoran beli talog AgCl, a dodatno je moguća i agregacija nanočestica zbog prisustva većeg broja elektrolita koji izazivaju nestabilnost pozitivno ili negativno stabilisanih nanočestica (Lee at al., 2007).

1.2.1. Sinteza nanočestica srebra

Različitim metodama sinteze mogu se dobiti nanočestice srebra različitih oblika, veličina i stepena stabilnosti. Postoje dva osnovna pristupa sintezi nanočestica: a) odozgo - na dole i b) odozdo-na gore (slika 1.1). Prvi put je pokazana metoda sinteze nanočestica srebra korišćenjem srebro-nitrata kao izvora jona srebra i natrijum-citrata kao redukcionog sredstva i stabilizatora još 1951. godine (Turkevich i sar., 1951).



Slika 1.1. Dva osnovna pristupa sintezi metalnih nanočestica: metoda odozgo na dole i odozdo na - gore

1.2.1.1. Metoda odozgo-na dole

Metoda dobijanja nanočestica srebra od odozgo na dole je metoda koja od većih dimenzija nekog materijala pravi manje dimenzije nano veličina putem sečenja, struganja ili brušenja prirodnog materijala (Cao, 2004). Ovom metodom moguće je uspešno dobiti nanočestice veličine od 10 – 100 nm ali zato ova metoda ima mnogo nedostataka. Neki od nedostataka su nemogućnost dobijanja pravilnih oblika nanočestica što može znatno uticati na svojstva ovih čestica usled različite specifične površine. Najpoznatija metoda ovakvog usitnjavanja materijala je litografija što podrazumeva izlaganje materijala osetljivog na zračenje fotonima ili česticama velike energije usled čega dolazi do strukturno - hemijskih modifikacija izloženih oblasti pa se samo površina nekog materijala modifikuje tako da biva prekrivena nanočesticama. Drugi tip metode je mlevenje u mlinovima sa čeličnim keramičkim kuglicama. Nakon nekoliko sati trajanja procesa, moguće je dobiti nanočestice. Ova metoda je pogodna za materijale koji se lako lome, a imaju dobar prenos toplote kao

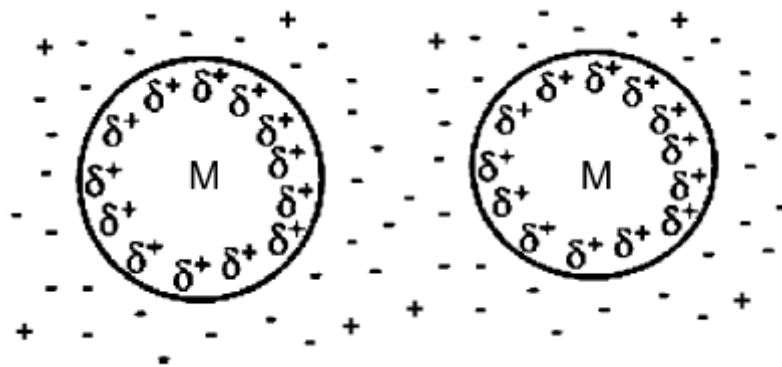
npr. keramički materijali. Kugle treba da budu napravljene od inertnih materijala velike gustine, jer je kinetička energija proporcionalna masi kugli. U mlinove se stavlja prah željenog materijala veličine čestica oko 50 μm , a maseni odnos kugle/prah je 1:2 (Cao, 2004). Prednost ove metode je što je veoma jednostavna i što se može dobiti velika količina materijala za kratko vreme. Nedostatak ove metode je polidisperznost nanočestica, mogućnost pojave nečistoća materijalom od koga su napravljene kuglice dok nanočestice nemaju dodatnu stabilizaciju ligandima (Cao, 2004).

1.2.1.2. *Metoda odozdo - na gore*

Pod ovom metodom odozdo – na gore podrazumeva se organizacija materijala polazeći od atoma ili molekula ili klastera. Ova metoda se pokazala kao bolja metoda za sintezu nanočestica srebra od metode odozgo – na dole zbog dobijanja uniformnijih nanočestica sa manjim nepravilnostima oblika. Ovo se može objasniti redukcijom Gibsove slobodne energije tako da su nanočestice dobijene ovom metodom u stanju termodinamičke ravnoteže za razliku od metode odozgo - na dole kojom se izazivaju unutrašnji naponi u materijalu tokom procesa dobijanja nanočestica. Nanočestice, nezavisno od metode sinteze imaju veliku specifičnu površinu i usled toga pokazuju veliku težnju ka aglomeraciji tako da se moraju stabilisati. Postoje dva načina stabilizacije nanočestica u tečnom medijumu: jonska (elektrostatička) i sterna stabilizacija (Cao, 2004).

1.2.1.3. *Jonska stabilizacija*

Pod jonskom ili elektrostatičkom stabilizacijom se podrazumeva elektrostatičko odbijanje dvojnog električnog sloja između dve čestice. Na primer, ako se pozitivno naelektrisanje unutar nanočestice rasporedi po površini nanočestice, dolazi do približavanja negativnih jona iz rastvora pa se tako oko svake nanočestice formira omotač negativnog naelektrisanja što izaziva pojavu međusobnog odbijanja nanočestica (slika 1.2) (Ozkar i Finke, 2002, Ott i Finke, 2007). Pojava osmotskog toka rastvarača u zonu velike koncentracije jona kada se dve čestice približe takođe dovodi do odbijanja čestica.



Slika 1.2. Elektrostatička stabilizacija metalnih nanočestica. Pozitivno naelektrisanje se raspoređuje po površini nanočestica pa se oko svake nanočestice stvara omotač negativnog naelektrisanja (Ott i Finke, 2007)

Ovaj tip stabilizacije se najčešće postiže anjonima halogenih elemenata i karboksilatnim anjonima (Abou-El Nour i sar., 2010). Nanočestice srebra mogu biti takođe elektrostatički stabilisane i to jonima citrata, vodonikom i polietileniminom (El Badawy i sar., 2012)

1.2.1.4. *Sterna stabilizacija*

Sterna stabilizacija je poznata i kao stabilizacija nanočestica u rastvoru polimera ali je mehanizam stabilizacije manje poznat u odnosu na jonsku stabilizaciju. Sterna stabilizacija se zasniva na adsorpciji polimera na površini nanočestica koji služi kao difuziona barijera koja sprečava rast čestica. Fizičko objašnjenje se zasniva na tome da bi približavanjem dve čestice došlo do sabijanja slojeva liganada i dovelo do smanjenja entropije što utiče na odbijanje čestica i pojave osmotskog efekta usled velike koncentracije polimera u regiji između dve čestice.

Sterna stabilizacija polimerima se uglavnom postiže u toku sinteze metalnih nanočestica u rastvorima polimera niske koncentracije da bi se dobio monosloj polimera koji je vezan na površini čestice. Mnogi redukcionni reagensi su kao prekursori opisani u sintezi metalnih nanočestica, a polimeri služe kao dodatni stabilizatori već sintetisanih nanočestica. Za redukciju jona srebra u nanočestice korišćeni su razni reaktanti kao što su: gas H_2 (Evanoff i Chumanov, 2005), natrijum-borohidrat (Lee i Meisel, 1982), hidrazin (Kim i sar., 2007), etanol (Amendola i sar., 2007), Tolensov reagens

(Fernandez i sar., 2008), askorbinska kiselina (Kashiwagi i Nakamoto, 2006), a sinteza se najčešće obavlja u vodenom rastvoru. Redukcioni agensi imaju ključnu ulogu u kontroli veličine dobijenih nanočestica. Što je jači agens, to će nanočestice biti manje, a kako se koristi slabiji agens, to nanočestice prelaze u veće klastere. Različiti redukcioni agensi takođe utiču na formiranje različitih oblika nanočestica. Postoje i dodatni parametri koji utiču na veličinu formiranih nanočestica. Na primer, pH vrednost je od presudnog značaja za sintezu nanočestica srebra u formaldehidu. Iako je formaldehid jak redukcioni agens, ukoliko se sinteza nanočestica srebra obavlja pri niskoj vrednosti pH, redukcija će biti veoma spora. Zato je sintezu nanočestica srebra pogodnije izvoditi u baznoj sredini, a srebro-nitrat (AgNO_3) je najčešći prekursor za sintezu nanočestica srebra (Cao, 2004).

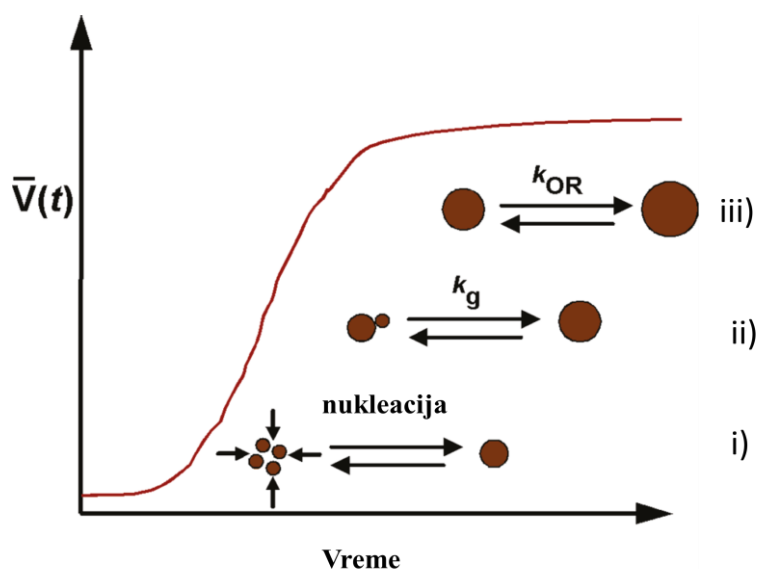
Sinteza nanočestica srebra zavisi i od drugih brojnih parametara kao što su temperatura (Yang i Pan, 2012, Krishnaraj i sar., 2012), pritisak (Yang i Pan, 2012.), početna koncentracija jona srebra (Krishnaraj i sar., 2012), vreme sinteze (Yang i Pan, 2012, Krishnaraj i sar., 2012) i kao što je već rečeno pH rastvora (Krishnaraj et al., 2012)

U cilju prevencije aglomeracije nanočestica srebra, dodatna stabilnost se postiže redukcijom u rastvorima različitih polimera čija je funkcija da stvore monosloj oko čestica kako bi sprečili njihov dalji rast. Polimeri koji se u te svrhe koriste mogu biti prirodni: skrob (Chairam i Somsook, 2008, Chairam i sar., 2009), dekstran (Berry i sar., 2003), hitozan (Park i sar., 2005) i alginat (Jovanović i sar., 2012), a mogu biti i sintetički: poli (vinil pirolidon) (PVP), poli(vinil alkohol) (PVA), poli(2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA) i poli(metil metakrilat) (PMMA) (Stasica i sar., 2000, Darwis i sar., 2002, Gautam i sar., 2007, Hoppe i sar., 2006, Toshima i sar., 2005).

1.2.2. Agregacija nanočestica srebra

Kristalna struktura nanočestica srebra je jedna od osnovnih karakteristika po kojima se nanočestice razlikuju od materijala makrometarskih veličina. Odnos broja atoma na površini i unutar čestice značajno raste sa smanjenjem veličine čestice što je jedan od razloga zašto je sintezu nanokristala teško kontrolisati. Zbog velikog broja površinskih atoma, nanokristal ima veliku površinsku energiju u poređenju sa energijom samog kristala. Površinska energija utiče da nanokristal postaje termodinamički nestabilan, što

je uzrokovano činjenicom da svi atomi u kristalu teže da zauzmu najmanje moguće energetska stanje (Ceo 2004). Pri tome može doći do agregacije i aglomeracije nanočestica ali ova dva pojma je potrebno razlikovati. Pod agregacijom se podrazumeva sjedinjavanje čestica jakim vezama gde je ukupna površina novonastale strukture manja od površine svake čestice posebno dok je aglomeracija vezivanje agregata i čestica slabim vezama gde je ukupna površina novonastale strukture jednaka zbiru površina svake čestice ponaosob (Reidy i sar. 2013). Postoje dva mehanizma rasta čestica. Prvi podrazumeva klasičan princip nukleacije i rasta zrna (“LaMer” mehanizam) gde se molekuli nadalje dodaju zrnju reagujući sa njegovom površinom, a drugi je Ostvaldovo sazrevanje gde se manje nanočestice raspadaju da bi se sjedinile sa većom česticom i tako dovele do njenog rasta (Richards i sar., 2010). Mehanizam rasta nanočestica je prikazan na slici 1.3. (Richards i sar., 2010).



Slika 1.3. Šematski prikaz mehanizma formiranja i rasta nanočestica srebra u toku vremena. Mehanizam je opisan u tri stupnja: i) agregativna nukleacija, ii) agregacioni rast, iii) Ostvaldov rast. $\bar{V}(t)$ je srednja zapremina nanočestica zavisna od vremena, k_g je konstanta agregacionog rasta, k_{OR} je konstanta brzine Ostvaldovog sazrevanja (Richards i sar., 2010)

Z potencijal je razlika potencijala između disperzije srednjeg i stacionarnog sloja fluida pričvršćenog za dispergovane čestice i on je ključni pokazatelj koliko su nanočestice stabilne u nekom polimeru. Na primer, Z potencijal nanočestica srebra u alginatu po

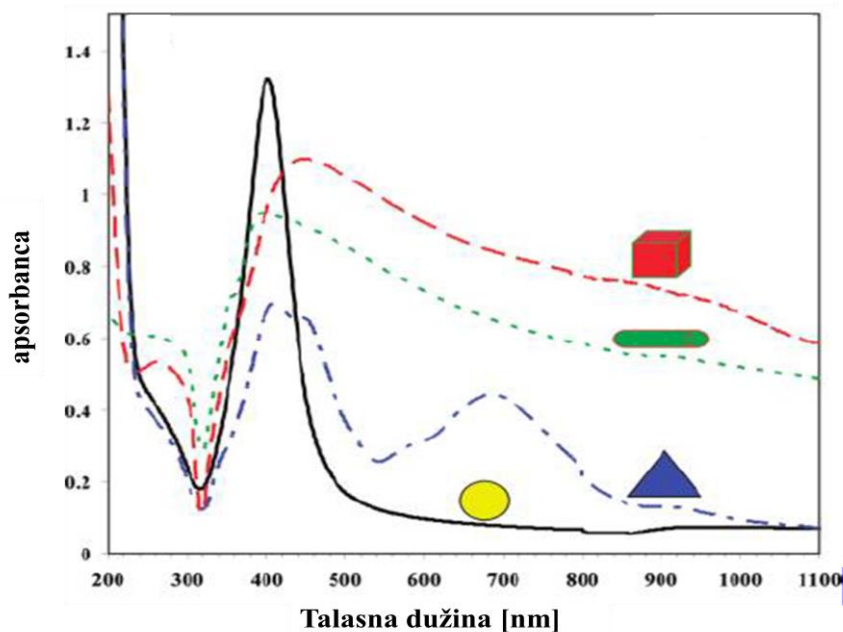
nekim autorima je oko -52,5 mV (Seo i sar., 2012) što ukazuje na stabilnost nanočestica u ovom polimeru. U drugim polimerima Z potencijal može biti viši ili niži. Na primer u jednom slučaju u rastvoru PVP je Z potencijal iznosio -9 mV (Xiao, 2013), a u drugim -40 mV u zavisnosti od načina pripreme i sinteze, pH vrednosti koloida i ostalih elektrolita u rastvoru. Ako nanočestice srebra imaju negativan Z potencijal onda će pojava pozitivnih jona dovesti do destabilizacije nanočestica i njihove agregacije (Li i sar., 2010).

1.2.3. Karakterizacija nanočestica srebra

Prvi korak u karakterizaciji nanočestica srebra je detekcija nanočestica posle sinteze. Dalja karakterizacija nanočestica srebra mora da obuhvati veličinu nanočestica, oblik i koncentraciju. Neke od najčešće korišćenih metoda za karakterizaciju nanočestica srebra su mikroskopija atomskih sila (engl. atomic force microscopy, AFM), skenirajuća elektronska mikroskopija (engl. scanning electron microscopy, SEM), transmisiona elektronska mikroskopija (engl. transmission electron microscopy, TEM), UV-vidljiva spektroskopija, difrakcija X zracima (engl. X-ray diffractometry, XRD) i dinamičko raspršivanje svetlosti (engl. dynamic light scattering, DLS).

UV-vidljiva spektroskopija je metoda kojom se određuju optička svojstva obojenih rastvora. Kako srebro u nanočestičnoj formi daje rastvor obojen u žuto, ova metoda se pokazuje kao jedna od prvih metoda pogodnih za detekciju nanočestica srebra na osnovu karakteristične apsorbanace. Monohromatska svetlost prolazi kroz uzorak i meri se intenzitet apsorbovane svetlosti. Po Lamber-Berovom zakonu (Lamberts-Beer) koncentracija je proporcionalna apsorbanaci pa je tako moguće izmeriti nepoznatu koncentraciju nanočestica srebra. Uglavnom, ovo je prva metoda karakterizacije i potvrde prisustva nanočestica srebra nakon sinteze u rastvoru gde se na oko 400 nm uočava karakterističan pik sfernih nanočestica srebra. Ovom metodom je takođe lako pratiti i stabilnost nanočestica (Sastry i sar., 1998, Amendola i sar., 2007), a dobiti i prve naznake o veličini, obliku i koncentraciji sintetisanih nanočestica srebra (Amendola i Meneghetti, 2009). Oblik nanočestica srebra se može preliminarno odrediti na osnovu talasne dužine pika tako da je za sferne nanočestice, karakteristična talasna dužina oko 400 nm. UV-vidljivi spektar trouglastih nanočestica pokazuje više karakterističnih pikova na talasnim dužinama od 407 nm, 450 nm i 680 nm, za

štapićaste nanočestice srebra karakteristični pikovi su na oko 325 nm i 420 nm, a za kubne nanočestice srebra na oko 350 nm i 440 nm kao što je prikazano na slici 1.4 (Ashkarran i sar., 2012). Takođe, povećavanje površine ispod pika kao i kretanje pika ka većim talasnim dužinama, ukazuje da je došlo do smanjenja rastojanja između nanočestica što rezultira pojavom agregata (Paramelle i sar., 2014). Kada se već sintetiše neki tip nanočestica srebra i odredi kom obliku pripada, veličinu nanočestica srebra je moguće proceniti na osnovu maksimalnog apsorpcionog pika određenog primenom UV-vidljive spektroskopije tako što se apsorpcioni pik većih nanočestica pomera ka višim talasnim dužinama. Tako se za sferne nanočestice srebra prečnika 20 - 100 nm talasna dužina maksimalnog pika pomera u opsegu od 400 do 500 nm (Paramelle i sar., 2014).



Slika 1.4. UV-vidljivi spektri nanočestica srebra različitih oblika: sfernog, trouglastog, štapićastog i kubnog (Ashkarran i sar., 2012)

Transmisiona elektronska mikroskopija je tehnika elektronske mikroskopije kod koje se elektronski snop propušta kroz ultra tanki sloj uzorka. Slika, odnosno mikrografija koja nastaje zbog interakcije elektrona pri prolazu kroz uzorak, uvećava se i fokusira u uređaju za dobijanje slike, kao što je fluorescentni ekran, sloj fotografskog filma, ili se

detektuje pomoću senzora, kao što je CCD kamera. Koristeći signal sekundarnih elektrona, moguće je ostvariti rezoluciju slike manju od 0,5 nm.

DLS metodom se koristi svetlost da bi se odredila veličina čestica u uzorku. Svetlost određene talasne dužine se emituje kroz uzorak putem lasera, a kada svetlost interaguje sa česticama unutar rastvora i raspršava se, intenzitet svetlosti se takođe menja. Ova promena u intenzitetu svetlosti je direktno proporcionalna veličini čestica u rastvoru, odnosno što su čestice sitnije, to je promena intenziteta rasejane svetlosti veća. Ovom metodom je moguće izmeriti čestice od nekoliko nanometara do nekoliko mikrometara (Lim i sar., 2013).

Ukoliko je potrebna slika visoke rezolucije neke površine, SEM se pokazao kao pogodan uređaj sa granicom rezolucije čak ispod 1 nm. Ovaj mikroskop radi slično kao optički mikroskop samo što umesto fotona usmerava snop elektrona i detektuje elektrone emitovane sa površine uzorka.

AFM je metoda kojom se ispituje reljef površine uzorka tako što se mere međumolekularne sile koje deluju između atoma na mernoj sondi i atoma na površini uzorka. Na taj način, postižu se rezolucije snimanja u atomskoj rezoluciji. Prednost ove metode u odnosu na SEM je što omogućava merenje i fizičkih karakteristika uzorka kao što su električne, magnetne i mehaničke.

Difrakcija X-zračenja je tehnika koja se koristi za određivanje atomske i molekulske strukture kristala na osnovu rasipanja X – zraka. Merenjem uglova i intenziteta tih zraka, određuje se gustina elektrona u kristalu, a zatim na osnovu toga i lokacije atoma u kristalu. Ova tehnika može da se koristi i za ispitivanje kristalichnost nanomaterijala pa je tako moguće odrediti koji tip kristalne rešetke figuriše u dobijenim nanočesticama.

1.2.4. Interakcije nanočestica srebra u fiziološkoj sredini u prisustvu jona hlora

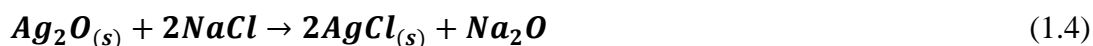
Nezavisno od načina sinteze nanočestica srebra uvek dolazi do njihove oksidacije manjom ili većom brzinom. Taj proces se u vodenoj sredini odvija po mehanizmu koga su predstavili mnogi autori (Li i sar., 2010, Li i sar. 2012, Choi i sar 2008, Marambio-Jones i Hoek, 2010) i koji se može opisati sledećim reakcijama:



Ukoliko se nanočestice nalaze u fiziološkom rastvoru odvijaju se sledeće reakcije:



odnosno:



Proces oksidacije nanočestica srebra se može usporiti dodavanjem stabilizujućih agenasa, snižavanjem temperature i povećavanjem pH vrednosti rastvora (Liu i Hurt, 2010). Oksidacija nanočestica srebra zavisi i od veličine nanočestica pa tako veće nanočestice imaju manju konstantu oksidacije (Liu i sar., 2010). Prisustvo jona hlora utiče na nestabilnost nanočestica srebra uz reakciju jona srebra sa jonima hlora što dovodi do formiranja AgCl taloga i različitih $AgCl_x^{(x-1)-}$ formi. Tako da, ukoliko je mali Cl/Ag molarni odnos (< 535), stvoriće se AgCl u formi taloga na površini nanočestica usporavajući tako dalju oksidaciju nanočestica (Levard i sar., 2013, El Badaway i sar., 2012). Ukoliko je molarni odnos Cl/Ag veći od 2675 formiraće se različite forme $AgCl_x^{(x-1)-}$ koje će dovesti do brže oksidacije nanočestica srebra (Levard i sar., 2013). Prisustvo jona hlora, pored oksidacije nanočestica srebra, utiče i na njihovu agregaciju što umonogome zavisi od veličine, oblika i koncentracije nanočestica srebra, pH vrednosti rastvora, kao i koncentracije jona hlora (He i sar., 2013, Li i sar., 2010). U suštini, koncentracija jona hlora značajno utiče na to koji mehanizam će biti favorizovan, da li oksidacija (koncentracija veća od 27 mM) ili agregacija nanočestica srebra (preko 27 mM) (Espinoza i sar., 2012). Simultana oksidacija nanočestica srebra kao i formiranje AgCl taloga na nanočesticama dovodi do formiranja agregata (Li i sar., 2010). Ipak, ne bi trebalo da postoje interakcije između nanočestica srebra i AgCl, jer su oba tipa čestica negativno naelektrisana (El Badawy i sar., 2010) ali zato joni srebra imaju tendenciju da se talože na česticama AgCl zbog njihovog negativnog Z potencijala (Sugimoto i Kimijima, 2003).

1.2.5. Antimikrobna aktivnost

Nanočestice srebra su pokazale izuzetnu antimikrobnu aktivnost prema različitim gram pozitivnim (Kim i sar., 2007, Soo-Hwan i sar., 2011) i gram negativnim bakterijama (Sondi i Salopek-Sondi, 2004, Kim i sar., 2007, Soo-Hwan i sar., 2011). Glavna razlika između gram pozitivnih i gram negativnih bakterija je u debljini i sastavu ćelijskog zida gdje je u prvom slučaju debljina ćelijskog zida 30 nm dok je kod gram negativnih bakterija 2 - 3 nm. Pokazano je da je veličina nanočestica srebra bitna u ispoljavanju antimikrobne aktivnosti (Morones i sar., 2005), tako da manje nanočestice koje imaju veću specifičnu površinu imaju jače izražen antimikrobni efekat i prema Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama pa čak i u manjim koncentracijama u odnosu na veće nanočestice (Baker i sar., 2005; Morones i sar., 2005; Panacek i sar., 2006). Takođe, oblik nanočestica igra veliku ulogu u antimikrobnoj aktivnosti pa su nanočestice srebra trouglastog oblika pokazale izraženiju antimikrobnu aktivnost u odnosu na sferne i štapičaste nanočestice (Wijnhoven i sar., 2009) dok su drugi autori pokazali da sferične nanočestice srebra sintetisane u rastvoru poli(vinil piroolidina) (PVP) imaju izraženiju antimikrobnu aktivnost od trouglastih, štapičastih i kubnih nanočestica srebra sintetisanih takođe u rastvoru PVP, što može biti zbog toga što su sferne nanočestice bile najmanjih dimenzija (Ashkarran i sar., 2012).

Pretpostavljen je mehanizam kako nanočestice reaguju sa Gram negativnim bakterijama i to: a) nanočestice srebra, pogotovo dimenzija od 1-10 nm reaguju sa ćelijskim zidom bakterije i drastično ometaju njene funkcije kao što je propustljivost, b) prolaze kroz ćelijski zid bakterije i reaguju sa sumpornim i fosforim grupama na dezoksiribonukleinskoj kiselini (DNK) i c) otpuštaju jone srebra koji inhibiraju bakterijske enzime, a takođe stvaraju reaktivne forme kiseonika kao slobodne radikale (Morones i sar., 2005, Hwang i sar., 2008).

Ipak, naučnici su podeljeni po pitanju šta je to što izaziva antimikrobni efekat, da li same nanočestice srebra ili joni srebra. Joni srebra se otpuštaju sa površine nanočestica pa otuda i zaključak da što su nanočestice manje, jača je antimikrobna aktivnost, jer je odnos površine i zapremine čestica veći pa time i veće otpuštanje jona sa površine (Egger i sar., 2009).

1.2.6. Komercijalna upotreba nanočestica srebra i regulativa

Jedan među prvim komercijalno dostupnim proizvodima koji sadrže nanočestice srebra je "Silver Algaedyn" registrovan još 1954. godine sa raspodelom veličine čestica 20 – 110 nm kao sredstvo za uklanjanje algi u bazenima (Nowack i sar., 2011). Sa druge strane, primer jednog medicinskog proizvoda sa nanočesticama srebra koji je dostupan na tržištu je Acticoat™ flex 3 (*Smith and Nephew, London, UK*) koji se koristi u lečenju opekotina prvog i drugog stepena, dijabetičkih i venskih čireva, hroničnih rana. Ova obloga za rane je napravljena od fleksibilnog polietilena prevučene nanočesticama srebra i pokazala je dobre rezultate u zarastanju dubokih rana nakon samo 16 ili 17 dana gde je postignuta potpuna repitalizacija rane, ali uz uočavanje i prisustva nanočestica srebra u okolnom tkivu i u ćelijama (Rigo i sar., 2013). Takođe je pokazano da je ova obloga za rane manje agresivna i ne izaziva bol za razliku od često korišćene kreme na bazi srebo-sulfadazina (Varas i sar., 2005). Postoje i komercijalno dostupni kateteri sa nanočesticama srebra kao što su Silverline (*Spiegelberg GmbH i Co. KG, Hamburg, Germany*) i ON-Q Silver Soaker™ (*I-Flow Corporation, CA, USA*) (Ge i sar., 2014).

Takođe, zbog svog izraženog antimikrobnog efekta, nanočestice srebra se sve više koriste u istraživanjima koja se odnose na razvoj novih materijala za pakovanje hrane kako bi se tako produžila i očuvala svežina namirnica. Mnogi autori su opisali migraciju i otpuštanje nanočestica srebra iz materijala za pakovanje hrane u simulante hrane što je propisano evropskim standardima (Goetz i sar., 2013, Šimon i sar., 2008, Artiaga i sar., 2015). Uglavnom, autori su merili ukupnu koncentraciju otpuštenog srebra u simulante hrane, ali nema mnogo podataka o veličini, obliku i stabilnosti otpuštenog srebra. Ipak, pokazano je da nanočestice srebra iz komercijalno dostupnih materijala za pakovanje hrane migriraju u simulante za hranu kao sferične čestice ali i rastu u prečniku i do 300 nm (Huang i sar., 2011). Kako su simulanti hrane u stvari tečnosti (sirćetna kiselina, voda i etanol) koje simuliraju kiselu ili masnu hranu ovi modeli predstavljaju ipak značajno pojednostavljenje u pogledu sastava i strukture u odnosu na prave namirnice kao što su sokovi i meso. Difuzija bilo koje supstance pa tako i nanočestica srebra u hranu zavisi od tipa hrane i njene teksture kao i od dimenzije nanočestica srebra.

Zbog sve veće upotrebe nanočestica srebra na tržištu, javlja se sve veća zabrinutost za uticaj ovih čestica na živi svet kada se nađu u otpadnim vodama (Pouran i sar. 2014,

Van der Veecken i sar., 2008, Davison i Zhang, 2012). Komercijalna upotreba nanočestica je odobrena u SAD od strane Agencije za zaštitu životne sredine Sjedinjenih država koja je izdala dokument o kontroli toksičnih supstanci (*EPA's Toxic Substances Control Act (TSCA)*) (Vance i sar. 2015). Postoje tri grupe proizvoda registrovanih u EPA koji sadrže nanočestice srebra i to: a) antimikrobni aditivi na bazi srebra, b) nanočestice impregnirane u filtere za vodu i c) dezinfekciona sredstva na bazi srebra (Gupta i Kumar 2014). Neki primeri registrovanih komercijalnih proizvoda su: "MicroSilver BG-R" (*Bio-Gate, Germany*) kao aditiv raznim materijalima za ostvarivanje antimikrobne aktivnosti uz naznaku da se ne sme koristiti u materijalima za pakovanje hrane ili u čuvanju vode za piće, ali je zato dostupan kao aditiv u medicinskoj opremi i kozmetici, zatim "Additive SSB" (*Nanohorizons, SAD*) kao antimikrobni agens koji se može impregnirati u različite polimere za razne primene gde je potrebna antimikrobna aktivnost i "Nature G45-VC40" (*Zodiac Pool Care, Inc, SAD*). Američka konferencija vladinih industrijskih higijeničara (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists, ACGIH*) je predložila maksimalnu dozvoljenu koncentraciju metalnog srebra u nanočestičnoj formi kojoj čovek može da bude izložen od $0,1 \text{ mg m}^{-3}$, a za rastvore jonskog srebra u maksimalnoj koncentraciji iznosi $0,01 \text{ mg m}^{-3}$ (Drake i Hazelwood 2005). Ovim je napravljena razlika između dejstva nanočestica i jonskog srebra. Sa druge strane, Organizacija za bezbednost i zaštitu na radu (*Occupational Safety and Health Administration*), Zdravstvena uprava (the Mine Safety and Health Administration) i Nacionalni institut za zaštitu i zdravlje na radu (*the National Institute for Occupational Safety and Health*) u SAD su odobrile izloženost srebru u bilo kojoj formi od $0,01 \text{ mg m}^{-3}$ (Drake i Hazelwood 2005, https://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_267300.html, 10.05.2017). Razlika između metalnog srebra i jona srebra je u Evropi navedena još 1994 godine kada je Evropska komisija donela pravilnik po kome je maksimalno dozvoljeno izlaganje koncentraciji $0,1 \text{ mg m}^{-3}$ česticama srebra u toku 8h rada (European commission, 1994). Primena nanočestica je regulisana i definisana i u kozmetičkoj indutriji (Regulation (EC) No 1223/2009, 2009).

Evropska uprava za bezbednost hrane (*European Food Safety Authority, EFSA*) je propisala da maksimalna migracija jona srebra iz materijala koji su u kontaktu sa hranom može da bude $0,05 \text{ mg/kg}$ hrane (EFSA, 2011). Navedeno je da nanočestice

srebra (E 174) ne mogu biti odobrene u svrhu razvoja materijala za pakovanje hrane, jer nedostaju podaci i validni rezultati koji pokazuju toksičnost elementarnog srebra, distribuciju veličina nanočestica srebra kao i oksidaciju nanočestica i otpuštanje jona srebra (EFSA, 2016).

Naučni eksperti su izložili mišljenje o proceni rizika nanočestica srebra u kojima izlažu potencijalni rizik od upotrebe nanočestica u medicinskim uređajima. Rizik u izlaganju nanočesticama srebra bi obuhvatao procenu tipa medicinske opreme, tipa tkiva u kontaktu sa opremom i vreme kontakta (http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consultations/public_consultations/sce_nhr_consultation_22_en, 10.05.2017). Takođe predloženo je da se jasno definiše: 1) mehanizam otpuštanja nanočestica, 2) distribucija nanočestica, 3) toksikološki uticaj, 4) rizik. Po planu Evropske regulative (<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:52012PC0542>, 10.05.2017) medicinska oprema koja sadrži nanočestice srebra bi trebalo da bude tako dizajnirana da ne dođe do otpuštanja nanočestica iz medicinske opreme u organizam pacijenta. Sva medicinska oprema koja sadrži nanočestice srebra je svrstana u III klasu medicinskih uređaja najvećeg rizika (tu spadaju srčani zalisci, zamena kuka, plućni implantati), a nanomaterijal mora da bude inkapsuliran ili vezan tako da je nemoguće otpuštanje sa medicinske opreme u pacijentov organizam (<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:52012PC0542>, 10.05.2017). Standardi koji tačno definišu medicinske uređaje sa nanočesticama srebra još uvek nisu doneseni.

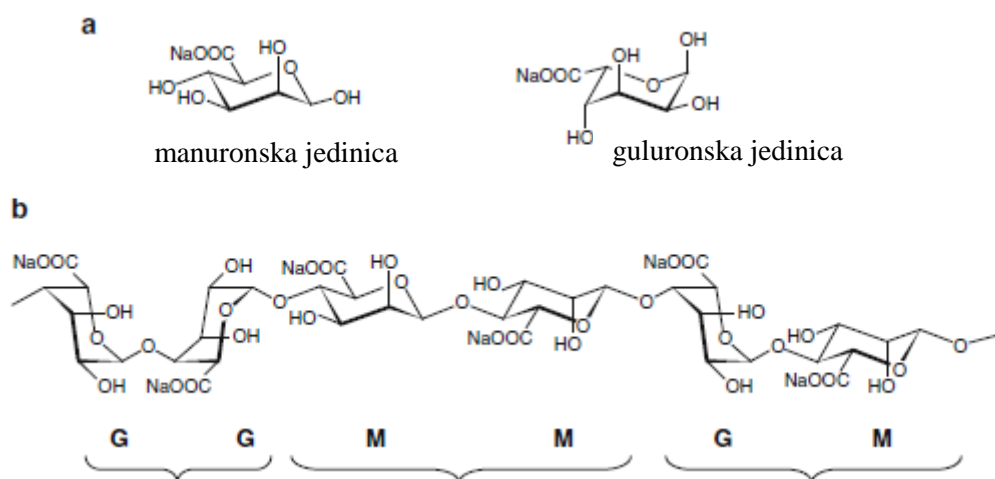
Ipak, nanotehnologija je postala jedna od glavnih grana i glavni prioritet EU u programu razvoja do 2020 godine. Proizvodi koji se plasiraju na tržište sadrže sve više komponentata koje uključuju nanomaterijale i tako dostižu cenu na tržištu od 700 milijardi evra u 2015. godini, a pretpostavlja se da će dostići i 2 biliona evra u 2020. godini uz otvaranje 6 miliona novih radnih mesta (Regulation (EU) No 1291/2013, 2013). U tabeli 1.1 su predstavljene neke kompanije koje proizvode nanočestice srebra.

Tabela 1.1. Pregled nekih kompanija koje postoje na tržištu i bave se proizvodnjom nanočestica srebra

Kompanija	Srednja veličina čestica [nm]	Oblik proizvoda
Huzheng Nano Technology (<i>Shanghai, Kona</i>)	1	suspenzija
Vive Nano (<i>Ontario, Kanada</i>)	1, 10	suspenzija
nanoComposix, Inc. (<i>San Diego, SAD</i>)	10 - 127	suspenzija
QuantumSphere, Inc (<i>Santa Ana, SAD</i>)	10 – 60	prah
Inframat Advanced Materials LLC (<i>SAD</i>)	20 – 400	prah
SkySpring Nanomaterials (<i>Houston, SAD</i>)	15-800	prah
Nano Technology Inc. (<i>Daejeon, Južna Koreja</i>)	150	prah
Nano-Vision Tech (<i>Seoul, Južna Koreja</i>)	15 - 25	suspenzija
IoLiTec (<i>Heilbronn, Nemačka</i>)	35-60	prah
PlasmaChem GmbH (<i>Berlin, Nemačka</i>)	10 , 6-7 , 100 – 150	prah, koloidni rastvor
NaBond (<i>Hong Kong, Kina</i>)	35, 20, 50, 80	prah
NovaCentrix (<i>Austin, SAD</i>)	25 - 30	prah
Nanostructured & Amorphous Materials, Inc (<i>Houston, SAD</i>)	20 - 80	prah
Seashell Technology, LLC (<i>California, SAD</i>)	50 – 150	
Nano Ocean Tech (<i>San Diego, SAD</i>)	6	Prah
MKnano (<i>Mississauga, Kanada</i>)	15-40	prah

1.3. ALGINAT

Alginat je prirodni polisaharid koji se sastoji od kiselinskih ostataka β -D-manuronske (M) i α -L-guluronske kiseline (G) povezanih 1-4 glikozidnim vezama (Rehm, 2009). Ovi ostaci mogu biti organizovani u blok (MM) jedinica, (GG) jedinica ili od naizmenično postavljenih (MG) jedinica (slika 1.5.). Alginat je naziv za jednu grupu polisaharida koja se može izolovati iz smeđih algi (uglavnom iz *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria japonica*, *Ecklonia maxima*, *Lessonia nigrescens* i *Durvillaea Antarctica*) ili iz bakterija (*Azotobacter vinelandii* i mnoge vrste iz reda *Pseudomonas*) (Rehm, 2009). Organizacija (M) i (G) jedinica u okviru natrijum-alginata kao i to koliko će koja jedinica biti procentualno zastupljena u alginatu, zavisi od vrste alge iz koje se izoluje alginat, kao i od dela tkiva te vrste (Andresen i sar., 1977).

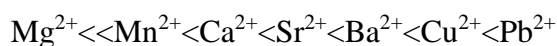


Slika 1.5. Hemijska struktura alginata. a) β -D-manuronska (M) jedinica i α -L-guluronska jedinica (G) natrijum alginata. b) struktura natrijum-alginata sa G-G blokom, M-M blokom i M-G blokom

Ipak, u industriji, alginat se najviše koristi zbog mogućnosti da formira hidrogel, jer tako ima sposobnost da zadrži veliku količinu vode (Rehm, 2009). Alginat je komercijalno dostupan na tržištu uglavnom kao natrijum-alginat srednje molekulske mase od oko 32 000 Da do 400 000 Da (Rehm, 2009; Lee i Mooney, 2012). Alginat je našao primenu u lečenju i tretiranju rana, u proizvodnji hrane, imobilizaciji

bioaktivnih agenasa i ćelija za različite namene. Primeri su imobilizacija ćelija kvasca u proizvodnja etanola, inkapsulacija ćelija hondrocita u inženjerstvu tkiva hrskavice, inkapsulacija antibiotika za lokalno obezbeđivanje sterilne sredine u in vivo uslovima, za inkapsulaciju enzima u raznim industrijskim primenama, probiotičkih bakterija u industriji hrane, kao i inkapsulacija nanočestica srebra u tretmanu rana (Smidsrød, 1990, Martinsen i sar., 1989, Wang i sar., 2012, Ueng i sar., 2004, Blandino i sar., 2003, Sultana i sar., 2000, Jovanović i sar., 2012, Stojkowska i sar., 2013).

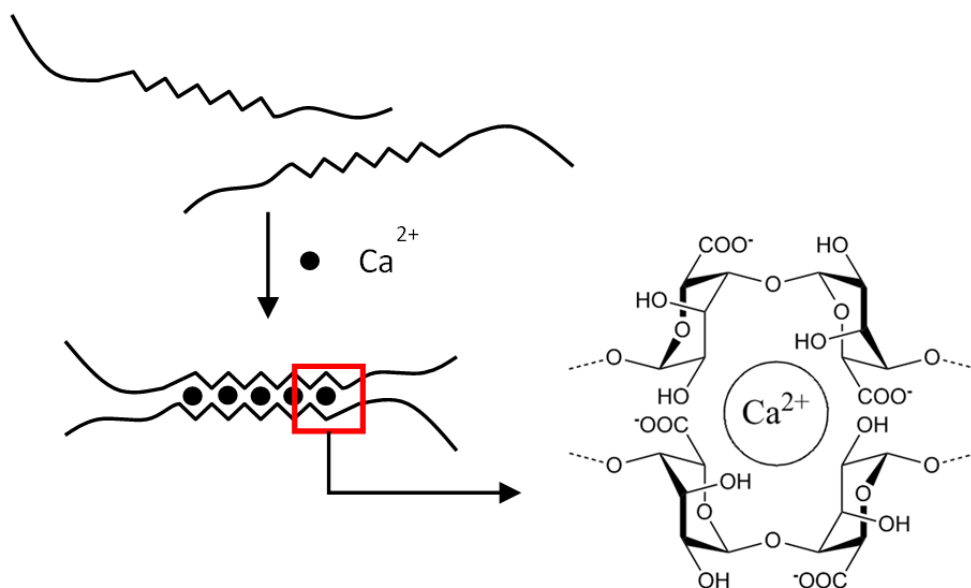
Alginatni hidrogelovi se formiraju u prisustvu dvovalentnih i trovalentnih katjona pri čemu afinitet prema dvovalentnim katjonima raste po sledećem redosledu (Haug i Smidsrød 1970):



Pokazano je da jačina hidrogela ne zavisi samo od katjona kojim se alginat gelira već i od udela GG blokova. Što je veći udeo G-jedinica, to je gel jači (Smidsrød, 1974). Afinitet tri hidro GG, MM i MG blokova prema dvovalentnim jonima je opisan u literaturi kao (Smidsrød, 1974):

GG blok	$\text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} \gg \text{Mg}^{2+}$
MM blok	$\text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} \sim \text{Ca}^{2+} \sim \text{Mg}^{2+}$
MG blok	$\text{Ba}^{2+} \sim \text{Sr}^{2+} \sim \text{Ca}^{2+} \sim \text{Mg}^{2+}$

Umrežavanje alginatnih lanaca dvovalentnim katjonima je opisano „egg box“ modelom, tj. modelom kutije za jaja (Grant i sar., 1973). Prema ovom modelu, katjoni se u alginatu prvo vezuju za guluronske jedinice dok se ne popune sva slobodna mesta pa se onda dva ili više guluronskih jedinica povezuje gradeći šupljine po izgledu kutije za jaja. Dalje se dvovalentni joni vezuju se za manuronske jedinice usled interakcije sa karboksilnim grupama, mada, ove veze su slabije od veza sa GG blokovima i lakše se raskidaju jonskom izmenom (Mitrović i sar., 2010). Model vezivanja dvovalentnih jona u natrijum alginatu na primeru kalcijuma je prikazan na slici 1.6. (Paquesab i sar., 2014).



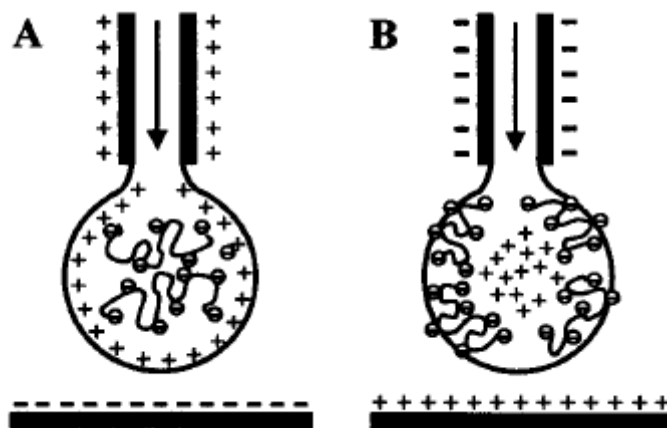
Slika 1.6. Vezivanje Ca^{2+} jona za alginatne lance: "egg-box" model (model kutije za jaja) vezivanja jona kalcijuma u šupljine (Paquesab i sar., 2014)

Prilikom formiranja alginatnog hidrogela dolazi do blagog izbacivanja vode zbog skupljanja alginatnih lanaca u jednu organizovanu strukturu što za posledicu ima smanjenje dimenzije hidrogela i povećanje koncentracije polimera (Martinsen i sar. 1989). Ovaj fenomen je poznat u literaturi kao „sinerezis“ dok ovakva struktura hidrogela povećava stabilnost hidrogela ali smanjuje poroznost.

Mikročestice su posebno pogodan oblik hidrogela za imobilizaciju različitih supstanci i ispitivanje njihovog otpuštanja. Mikročestice, s obzirom na mali prečnik imaju veću specifičnu površinu kao i manje difuzione limitacije u poređenju sa česticama većih prečnika (De Vos i sar., 2006). Mikročestice se mogu dobiti različitim tehnikama: metodom ukapavanja dobijaju se 2 – 3 mm, metodom ukapavanja uz primenu sekundarnog toka vazduha (Anilkumar i sar., 2001, Bučko i sar., 2005), vibracionom metodom (Heinzen i sar., 2002), metodom raspršivanja pomoću rotirajućeg ravnog diska (Ogbonna, 2004), metodom presecanja mlaza (Prusse i Vorlop 2004) i elektrostatičkom ekstruzijom (Bugarski i sar., 1994, Poncelet i sar., 1999).

1.3.1. Elektrostatička ekstruzija

Jedna od tehnika za dobijanje manjih čestica hidrogela (prečnika nekoliko stotina mikrona) uniformne raspodele veličina je elektrostatička ekstruzija koja se zasniva na potiskivanju rastvora kroz kapilaru uz primenu elektrostatičkog polja, a zatim sakupljanju kapi u rastvoru za geliranje (Keshavartz i sar., 1992; Bugarski i sar. 1993). Razlikuju se tri osnovne geometrije sistema za elektrostatičku ekstruziju: i) geometrija paralelnih ploča (površina rastvora za geliranje je paralelna sa pozitivno naelektrisanom pločom kroz koju je provučena igla i koja predstavlja pozitivnu elektrodu), ii) pozitivno naelektrisan rastvor za geliranje, a igla je uzemljena, i iii) pozitivno naelektrisana igla, a rastvor za geliranje je uzemljen. Pri korišćenju alginata ustanovljen je da je za proizvodnju mikročestica najefikasniji sistem sa pozitivno naelektrisanom iglom (Poncelet i sar., 1999, Bugarski i sar., 1994). Kapi se odvajaju sa vrha kapilare i pod uticajem gravitacije i elektrostatičke sile padaju u rastvor za geliranje u kome dolazi do jonske izmene i očvršćavanja alginatnih čestica. Elektrostatički potencijal koji se primenjuje između kapilare i rastvora u kome se kapljice skupljaju i očvršćavaju indukuje određeno naelektrisanje na površini alginatnog rastvora, dovodeći do smanjenja površinskog napona i drastičnog smanjenja veličina kapljica koje se otkidaju, u odnosu na veličinu kapljica dobijenih metodom ukapavanja bez primene električnog polja (Poncelet i sar. 1999; Bugarski i sar. 1994). Prečnik mikročestica varira u zavisnosti od operativnih parametara kao što su primenjeni elektrostatički napon, unutrašnji prečnik igle i rastojanje između elektroda, kao i od fizičkih karakteristika alginatnog rastvora koji se potiskuje (Poncelet i sar. 1999; Bugarski i sar. 1994; Bugarski i sar. 1994). Ovom metodom dobijene su mikročestice prečnika manjeg od 1 mm pa sve do 50 μm (Bugarski i sar., 1994). Na slici 1.7. je prikazan princip otkidanja kapi usled elektrostatičke ekstruzije.



Slika 1.7. Šematska ilustracija dispozicije jona natrijuma i alginatnih lanaca u slučaju dva različita tipa naelektrisanja: A) pozitivno naelektrisana igla izaziva pomeranje pozitivnih jona natrijuma na površinu kapi, B) pozitivno naelektrisan rastvor za geliranje služi za sakupljanje negativno naelektrisanih kapi. (Nedovic i sar., 2002)

1.3.2. Difuzivnost u alginatnom hidrogelu

Difuzija kroz alginatni hidrogel se odvija kroz pore u hidrogelu i zavisi od njihove veličine i rasporeda. Hidrogelovi se na osnovu veličine pora mogu podeliti na superporozne (pore veće od 100 μm), makroporozne (pore od 0,1-1 μm), mikroporozne (pore od 10-100 nm) i neporozne (pore od 1-10 nm) (Ganji i sar., 2010). Tako je pokazano da se dimenzije pora u alginatnom hidrogelu mogu kretati od 5 nm do 150 nm (Andresen i sar. 1977). Ipak, mnogi autori su pokazali da je najverovatnija veličina pora u alginatu oko 10 – 20 nm (Holte i sar. 2007; Stewart i Swaisgood 1993; Grassi i sar. 2009; Fundueanu i sar. 1999). Povećavanjem masenog udela alginata, smanjuje se difuzivnost unutar hidrogela, a na difuzivnost bitno utiču još i udeo guluronskih i manuronskih jedinica kao i naelektrisanje i veličina supstance koja difunduje (Gombotz i Wee, 2012). Pozitivno naelektrisane čestice difunduju sporije kroz Ca-alginatni hidrogel, zbog interakcija sa negativno naelektrisanim lancima alginata (Gombotz i Wee, 2012). Pokazano je da je u alginatnom hidrogelu sa većim udelom G jedinica manja difuzivnost supstance zbog toga što su strukture lanaca u ovim hidrogelovima dosta rigidnije u odnosu na hidrogel sa manjim udelom G jedinica (Amsden i Turner 1999). Ipak, u drugim studijama je pokazano da je difuzivnost supstanci kroz alginatni hidrogel veća, što je udeo G jedinica veći u odnosu na udeo M jedinica (Holte i sar.,

2007). Ovi rezultati su objašnjeni pojavom da će u alginatnom hidrogelu sa većim udelom G jedinica, koje inače imaju veći afinitet prema divalentnim katjonima prilikom geliranja, ostati manji deo slobodnih alginatnih lanaca i tako će se nesmetano omogućiti prolaz pozitivno naelektrisanih supstanci (Holte i sar., 2007). Isti fenomen je uočen i u slučaju kada kroz alginatnu matricu difunduju neutralne supstance, pa je zaključeno da Ca-alginat sa većim udelom M jedinica ima manje pore (Holte i sar., 2007). Ovaj hidrogel je međutim, slabije geliran tako da je veća mogućnost slabljenja veza između alginatnih lanaca i raspadanja hidrogela.

Određeni su koeficijenti difuzije različitih malih molekula kroz Ca-alginatni hidrogel reda veličine $10^{-10} - 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (Rasmussen i sar. 2003, Holte i sar. 2007, Holte i sar., 2006, Puguan i sar., 2015). Sa druge strane, koeficijent difuzije nanočestica lateksa prečnika 20 nm je bio $3,3 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (Holte i sar., 2007). Tako je i koeficijent difuzije nanočestica zlata prečnika 10 – 30 nm kroz poli(etilen glikol) određen kao $(0,5 - 40) \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (Hume i Jeerage, 2013).

1.3.3. Degradacija alginatnog hidrogela

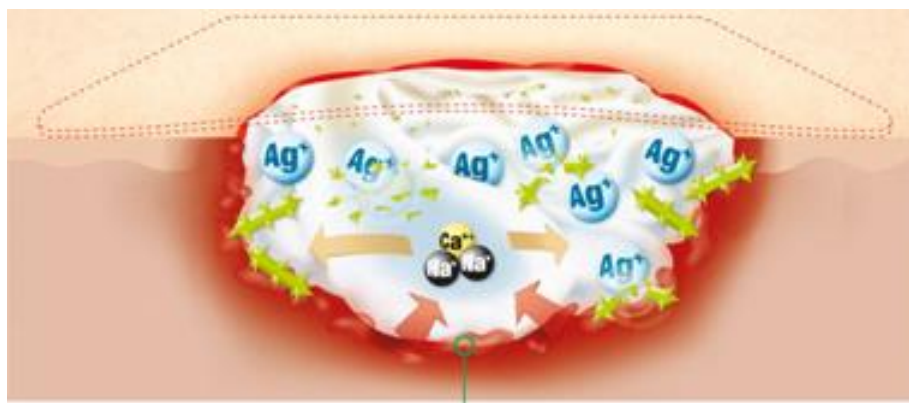
Otpuštanje imobilisane supstance iz alginatnih hidrogelova zavisi i od bubrenja hidrogela i degradacije što se pogotovo odvija u fiziološkim uslovima usled prisustva jona natrijuma. Bubrenje Ca-alginatnih hidrogelova u fiziološkom rastvoru (0,9 mas % NaCl) se odvija tako što se Ca^{2+} joni iz manuronskih jedinica prvo zamene Na^+ jonima i tako dolazi do udaljavanja lanaca i time i bubrenja, a zatim dolazi i do jonske izmene u guluronskim jedinicama (Bajpai i Sharma 2004). Takođe, pokazan je isti mehanizam razgradnje mikročestica alginata u medijumu za kulture ćelija u prisustvu male koncentracije natrijum-citrata (0,05 - 0,5 mM) gde prvo dolazi do zamene i raskidanja veza između manuronskih jedinica i bubrenja čestica, a zatim i do raskidanja veza između guluronskih jedinica što dovodi do pucanja čestica (Mitrović i sar., 2010).

Kontrolisana degradabilnost biomaterijala je jedna od najvažnijih karakteristika materijala za primene u inženjerstvu tkiva i kontrolisanom otpuštanju lekova gde bi trebalo da novo sintetisano tkivo postepeno zameni materijal odnosno da se aktivna supstanca dostavi na željeni način na određeno mesto (Augst i sar., 2006). Pošto u organizmu ne postoji enzim za razgradnju alginata, alginatni hidrogelovi se veoma

sporo i nekontrolisano raspadaju u *in vivo* uslovima (Lee i Mooney, 2012). Pri tome je u jednoj studiji pokazano da su lanci alginata veliki i ne mogu da difunduju kroz pore u bubrezima, tako da se ne mogu potpuno izbaciti iz organizma (Al-Shamkhani i Duncan, 1995). Jedan od načina za prevazilaženje tog problema je modifikacija alginata natrijum-perjodatom čime se omogućava parcijalna oksidacija alginata i tako poboljšava degradacija hidrogela (Lee i Mooney 2012; Bouhadir i sar., 2001).

1.3.4. Ag/alginatni hidrogelovi

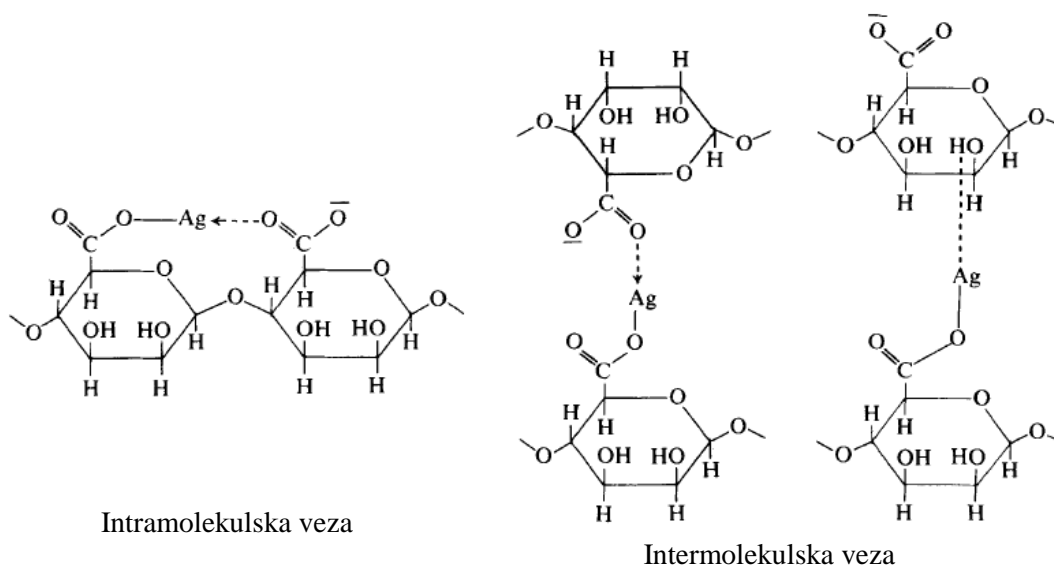
Hidrogelovi predstavljaju dobre matrikse za stabilizaciju nanočestica srebra, a jedna od atraktivnih primena ovih nanokompozita je u tretmanu rana i to posebno dubokih, nekrotičnih inficiranih rana (Boonkaew i sar., 2014, Varaprasad i sar., 2011). U odnosu na druge prirodne i sintetičke materijale, alginatni hidrogelovi su komercijalno najzastupljeniji u ovoj primeni zbog sposobnosti da regulišu nivo vlage u rani i time utiču na brže zarastanje rana (slika 1.8) (Paul i Sharma 2004, Queen i sar., 2004). Neki od primera komercijalno dostupnih Ca-alginatnih obloga za rane sa srebrom u jonskom obliku su: Suprasorb[®]A+Ag (Lohmann and Rauscher, Neuwid, Germany), Algicell[®] Ag (Dermasciences, Princenton, SAD), Algidex Ag[®] (DeRoyal), Molnlycke Melgisorb[®] Ag (Molnlycke, Norcross, Georgia).



Slika 1.8. Šematski prikaz delovanja obloge za rane Suprasorb[®] A+Ag na bazi kalcijum-alginatnog hidrogela sa jonima srebra u dubokoj rani: izmenom jona kalcijuma iz hidrogela sa jonima natrijuma iz tkiva, dolazi do bubrenja hidrogela u vlažnoj sredini i naglog otpuštanja jona srebra. (<http://www.activavet.co.uk/products/suprasorb>, 10.05.2017)

Do sada je izvedeno više načina sinteze nanočestica srebra u rastvoru natrijum alginata kao što su: hidrotermalna sinteza (Yang i Pan 2012), primena mikrotalasa (Zhao i sar., 2013), sinteza natrijum-borohidratom (Seo i sar., 2012) i elektrohemijska sinteza (Jovanović i sar., 2012).

Pokazano je da joni srebra mogu da reaguju sa alginatom i da grade veze inter- i intramolekulski (Hassan, 1993, Hassan, 1991) (slika 1.9). Utvrđeno je da Ag^+ joni elektrostatički intereaguju sa karboksilnim grupama na lancima alginata (Yang i Pan, 2012) tako da je pokazano da je moguće geliranje alginata upravo jednovalentnim jonima srebra (Lengert i sar. 2016). Takođe, FTIR analizom koloidnog rastvora Na-alginata sa elektrohemijski sintetisanim nanočesticama srebra pokazano je da nanočestice grade veze sa određenim grupama u alginatnim lancima (Jovanović i sar., 2012).



Slika 1.9. Inter - i intramolekulsko vezivanje jona srebra sa karboksilnim grupama na alginatnim lancima (Hassan, 1991)

U biomedicinskim primenama alginatni hidrogelovi sa nanočesticama srebra najčešće dolaze u kontakt sa fiziološkom sredinom tako da se pojave opisane u poglavljima o alginatu i nanočesticama srebra i ovde odvijaju. Naime, u fiziološkoj sredini zbog velike koncentracije jona natrijuma dolazi do jonske izmene sa jonima kalcijuma i bubrenja hidrogela (Bajpai i Sharma 2004). Sa druge strane, istovremeno dolazi do oksidacije

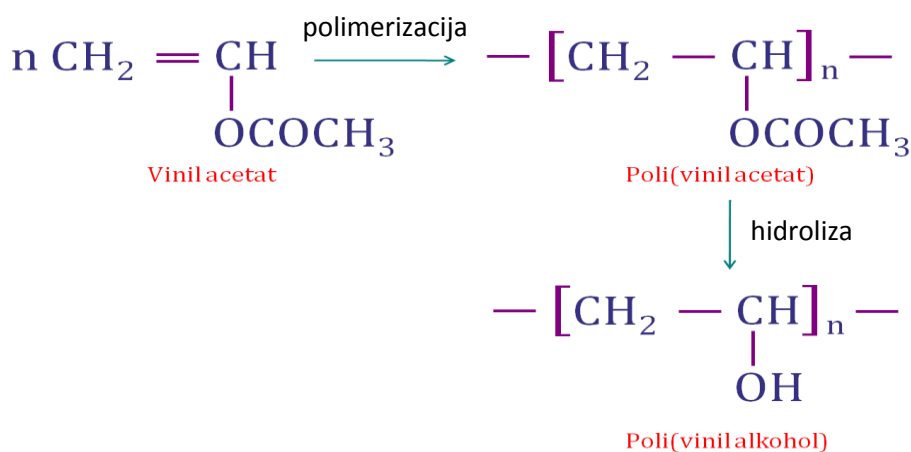
nanočestica srebra, ali zbog prisustva jona hlora iz fiziološke sredine, grade se jonski kompleksi i teško rastvoran talog AgCl koji najvećim delom ostaje zarobljen u hidrogelu (Levard i sar., 2013).

U potencijalnim primenama u pakovanjima hrane, značajno je prisustvo i drugih jona i molekula tako da su neki od simulanata hrane na bazi vode, vodenog rastvora sirćetne kiseline i etanola, kao što je već rečeno u poglavlju 1.2.6. Sa smanjenjem pH vrednosti rastvora, kao u slučaju rastvora sirćetne kiseline, dolazi do ubrzavanja oksidacije nanočestica srebra (Peretyazhko i sar., 2014), a alginatni hidrogel istovremeno postaje jače umrežen (Rehm 2009). Prisustvo etanola ne utiče značajno na nanočestice srebra pošto je pokazano da se etanol može koristiti kao stabilizator pri sintezi ovih nanočestica (Pal i sar., 2009). Etanol smanjuje zapreminu Ca-alginatnog hidrogela usled vezivanja vode iz hidrogela (Torres i sar., 2011). Sve navedene pojave bitno utiču na otpuštanje jona i/ili nanočestica iz Ag/alginatnih hidrogelova i time na njihovu funkcionalnost u različitim primenama.

1.4. POLI(VINIL ALKOHOL)

Poli(vinil alkohol) (PVA) je biodegradabilan sintetički polimer koji se komercijalno dobija hidrolizom poli(vinil acetata) najčešće u baznoj sredini (slika 1.10.) (Ishigaki i sar., 1999, Hassan i Peppas 2000). PVA se široko primenjuje u različitim oblastima kao što su tekstilna industrija i proizvodnja raznih higijenskih proizvoda (DeMerlis i Schoneker, 2003), a u farmaciji i medicini mogu se navesti membrane (Chuang i sar., 2000), sistemi za kontrolisano otpuštanje (Brazel i Peppas, 1999), i kao komponenta implanata (Kobayashi i sar., 2003). Takođe, to je jedan od najčešće korišćenih polimera za proizvodnju filmova u industriji pakovanja hrane zbog svoje slabe propustljivosti za gasove (Piergiovanni i Limbo, 2016). Zahvaljujući velikom broju hidroksilnih grupa, PVA se rastvara u vodi, na povišenoj temperaturi iznad 70 °C, pri čemu se njegova rastvorljivost povećava sa povećanjem stepena hidrolize. I druge fizičke osobine ovog polimera zavise od stepena hidrolize tako da se proizvodi kao delimično i potpuno hidrolizovan (DeMerlis i Schoneker, 2003). U industriji pakovanja hrane glavni nedostatak ovog polimera je njegova sposobnost da u vlažnim uslovima bubri (Piergiovanni i Limbo, 2016), ali sa druge strane, upravo ova karakteristika ga čini pogodnim materijalom za dobijanje antimikrobnih pakovanja, jer će imobilisana aktivna

supstanca biti lakše otpuštena ukoliko dođe do bubrenja polimera (Pei i sar., 2006, Zu i sar., 2012). Agencija FDA je odobrila upotrebu PVA polimera u materijalima za pakovanje hrane, a posebno je odobrena upotreba i za pakovanje mesa (DeMerlis i Schoneker, 2003). Takođe, upotreba PVA je odobrena u različitim medicinskim primenama (DeMerlis i Schoneker, 2003).

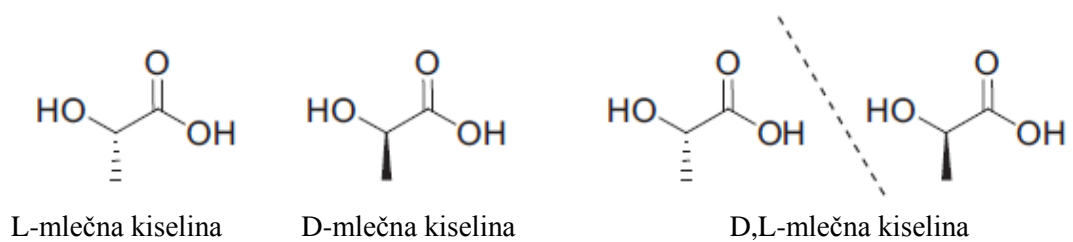


Slika 1.10. Dobijanje poli(vinil alkohola) polimerizacijom vinil acetata, praćene hidrolizom poli(vinil acetata) (Stojkowska, 2015)

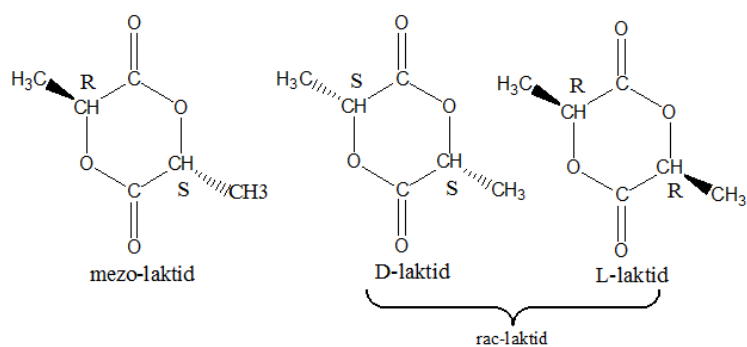
Nanočestice srebra je moguće sintetisati u rastvoru PVA uz zagrevanje (Pencheva i sar., 2007, Filippo i sar., 2009), laserskom iradijacijom (Deepak i sar., 2012), uz prisustvo hidrazin hidrata (Patil i sar., 2012, Khanna i sar., 2005), redukcijom pomoću natrijum borohidrata (Choi i sar., 2008), i gama iradijacijom (Krklješ i sar., 2007). Tako se PVA pokazao kao pogodan polimer za stabilizaciju nanočestica srebra i zlata (Mahapatra i sar., 2007, Sharma i sar., 2009) gde uspešno štiti nanočestice od agregacije (Khanna i sar., 2005). PVA filmovi sa nanočesticama srebra bi mogli da nađu primenu u tretmanu rana (Jun i sar., 2007, Galya i sar., 2008), zaštitnog pakovanja i prevlake za neke medicinske uređaje (Galya i sar., 2008).

1.5. POLI(LAKTIDNA KISELINA)

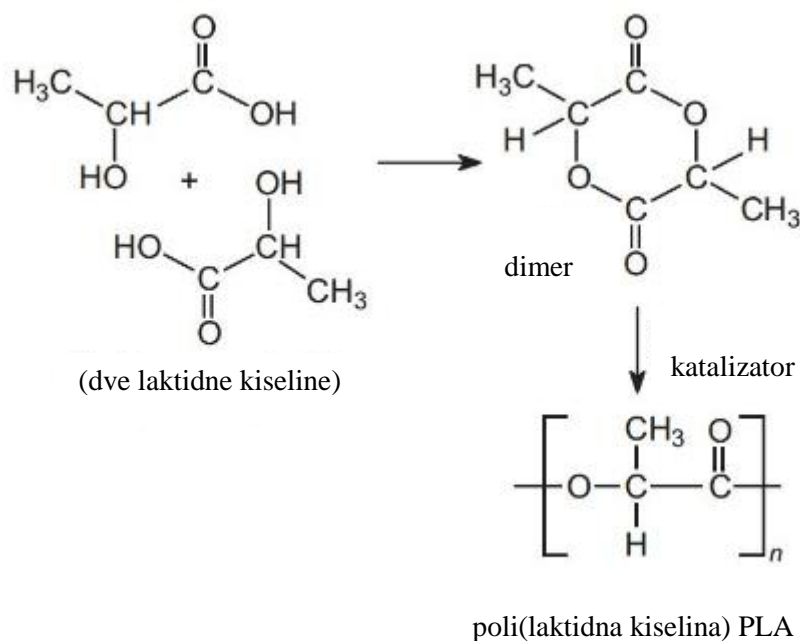
Jedan od najpoznatijih biopolimera je poli(laktidna kiselina) (PLA). Drugi naziv za laktidnu kiselinu je mlečna kiselina. Poli(laktidna kiselina) se dobija polimerizacijom (2-hidroksipropanske) kiseline tj. laktidne kiseline, ili polikondenzacijom uz otvaranje prstena laktida (cikličnog diestra laktidne kiseline) (Masutani i Kimura, 2014). Prvobitno, laktidna kiselina se dobijala iz skupih rafiniranih šećera (glukoze, saharoze) klasičnim fermentacionim postupkom pomoću bakterija mlečne kiseline koje obuhvataju vrste: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weisella* (Davidson i sar., 1995, Ercolini i sar., 2001, Holzapfel i sar., 2001, Stiles i Holzapfel, 1997, Axelsson, 2004) dok danas postoje industrijski procesi u kojima se fermentacija izvodi na kukuruzu, šećernoj repi, skrobu krompira i surutki (Ristić i sar., 2012). Najveći deo svetske proizvodnje laktidne kiseline se odvija pomoću bakterijske fermentacije ugljenih hidrata. Primenom bakterija iz roda *Lactobacilli*, koje svojom aktivnošću proizvode jedino laktidnu kiselinu (Amass i sar., 1998). Kao izvor sirovina za dobijanje ovog monomera mogu se koristiti i sporedni proizvodi iz poljoprivrede i prehrambene industrije. Na taj način rešava se problem odlaganja agroindustrijskog otpada i smanjuju ulaganja u prvu fazu procesa proizvodnje poli(laktidne kiseline). Ova kiselina se javlja u dve različite optički aktivne stereoizomerne forme L i D enantiomeri, odnosno (S i R konfiguracije) kao i racematska smeša D i L enantiometra (slika 1.11.) od kojih je moguće dobiti tri različita laktida L(-)-laktid (S,S), D(+)-laktid (R,R) i optički neaktivan mezo-laktid (R,S) (slika 1.12.). Racemaska smeša, L- i D-laktida, se uglavnom naziva D,L-laktid (Ristić i sar., 2012). Najčešće korišćena metoda dobijanja poli(laktidne kiseline) je upravo otvaranje prstena laktida (slika 1.13.).



Slika 1.11. Konfiguracije L, i D i DL enantiomera 2-hidroksi propanske kiseline, tj. laktidne kiseline (Masutani i Kimura, 2014)



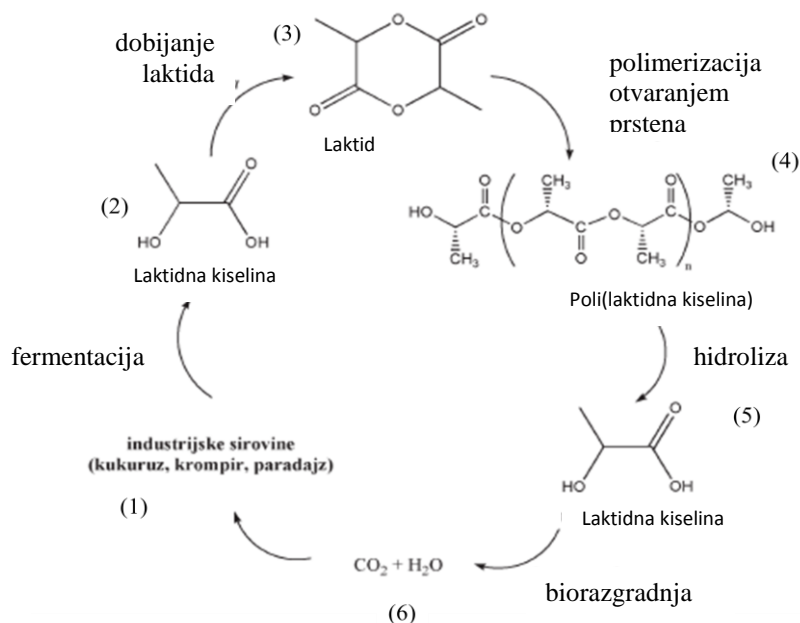
Slika 1.12. Konfiguracije L, D i cikličnih diestra laktidne kiseline (laktida) (Ristic i sar., 2012)



Slika 1.13. Dobijanje poli(laktidne kiseline): iz laktidne kiseline se dobija ciklični diestar laktidne kiseline čijim se otvaranjem prstena u prisustvu katalizatora dobija poli(laktidna kiselina) (<http://www.essentialchemicalindustry.org/polymers/degradable-plastics.html>, 10.05.2017)

Ovaj polimer je biorazgradiv, biokompatibilan i potpuno resorbilan u organizmu u zavisnosti od molekulske mase najviše. Naime, hidrolizom u fiziološkoj sredini daje mlečnu kiselinu, komponentu koja se iz organizma eliminiše kroz Krebsov ciklus kao H₂O i CO₂ i tako kruži u prirodi, (slika 1.14). Upotreba PLA je odobren od strane agencije FDA kao sintetičkog biodegradabilnog materijala koji može da se koristi između ostalog i za pakovanje hrane (Conn i sar., 1995, Rajendra i sar., 2014). Svaki materijal za pakovanje hrane mora da ispunjava određene uslove, a to je da budu nepropusni za gasove kao što su kiseonik, vodena para, arome i svetlost (Tawakkal i sar., 2014) što su neke od glavnih karakteristika ovog polimera. PLA je sve zastupljeniji polimer u industrijskoj grani, a pogotovo se aktivno koristi u Japanu (Mutsuga i sar., 2008). Zbog izrazite biodegradabilnosti i mogućeg uticaja degradacije na hranu u pakovanju, Organizacija za bezbednost hrane u Japanu ograničila je maksimalni dnevni unos laktida u organizam na 0,1 mg kg⁻¹ dan⁻¹ (Mutsuga i sar., 2008). PLA potpuno zamenjuje polietilen visoke i niske gustine i tako nalazi primenu u pakovanjima kao što

su kese, čaše za jogurt i činije za pakovanje sveže salate (Jabeen i sar., 2015). Dobre mehaničke i termičke osobine čine ovaj materijal pogodan za manipulaciju različitim tehnikama, kao što su ekstruzija, injektovanje pod pritiskom i topljenje polimera (Hamad i sar., 2015). Zbog svoje biokompatibilnosti i biorazgradivosti, poli(L-laktidna kiselina) PLLA je našla upotrebu i u medicini, kao hirurški konac, zatim kao stentovi i vlakna, fiksatori fraktura, sistemi za kontrolisano oslobađanje lekova i lekovitih supstanci u ortopediji i u stomatologiji (Ristic i sar., 2012, Rajendra i sar., 2014, Wee i sar., 2006). Obzirom da je PLA imunološki inertan sintetički polimer (Novikova i sar., 2003, Vito i sar., 2008) ispituje se i u inženjerstvu tkiva (Chen i sar., 2006, Mitragotri i Lahann, 2009). Zbog svoje sve veće primene PLA je 2010. godine proglašen drugom na svetu najbitnijom plastikom (Rajendra i sar., 2014).



Slika 1.14. Proces kruženja PLA: iz industrijskih sirovina (1) se fermentacijom dobija laktidna kiselina (2) iz koje se sintetiše ciklični diestar laktidne kiseline, laktid (3); polimerizacija laktidne kiseline se odvija postupkom otvaranja laktidnog prstena (4); hidrolizom ovog polimera je moguće razložiti poli(laktidnu kiselinu) na laktidnu kiselinu (5) koja se dalje u biološkim sistemima razlaže na CO₂ i H₂O (6) (Ristic i sar., 2012)

Nanočestice srebra mogu biti inkorporirane u PLA, a glavna svrha u dobijanju ovih nano kompozita je razvoj novih biodegradabilnih biomaterijala sa izraženom antimikrobnom aktivnošću u pakovanju hrane i u medicinskoj upotrebi (Shameli i sar., 2010, Fortunati i sar., 2012, Busolo i sar., 2010, Fortunati i sar., 2010, Xu i sar., 2006). Antimikrobna aktivnost nanokompozitnog filma zavisi pre svega od koncentracije i veličine nanočestica srebra, i njihove raspodele u filmu (Gorrasi i sar., 2015). Pokazano je da PLA filmovi sa nanočesticama srebra mogu imati izuzetne antimikrobne efekte ali pri visokim koncentracijama nanočestica višim od 5 mas. % (Shameli i sar., 2010). Nanočestice srebra je moguće i sintetisati u rastvoru PLA uz dodavanje natrijum borohidrata kao redukcionog sredstva pri čemu su dobijene nanočestice sfernog oblika prečnika 4-5 nm (Shameli i sar., 2010).

Nanočestice srebra bitno utiču na vreme degradacije PLA polimera, tako da je pri koncentraciji nanočestica srebra od 0,01 mas. % - 0,07 mas. % detektovano povećanje koncentracije CO₂ kao pokazatelj degradacije polimera, dok se pri koncentraciji nanočestica od 0,12 mas. %, degradacija usporila do 40 dana (Gorrasi i sar., 2015). Propustljivost kiseonika kao jedan od glavnih parametara materijala za pakovanje hrane, ne menja se značajno sa inkorporacijom nanočestica srebra, koje i u filmu ispoljavaju antimikrobnu aktivnost (Fortunati i sar. 2010).

1.6. PRENOS MASE KROZ HIDROGEL

Otpuštanje nanočestica kao i drugih supstanci iz hidrogela zavisi od više faktora i zahteva složenu analizu celog sistema. Tako mehanizam otpuštanja obuhvata sledeće procese pri primeni hidrogela u nekoj fiziološkoj sredini (Zarzycki i sar 2010):

1. transport medijuma iz okolne sredine u hidrogel putem pora na hidrogelu;
2. degradacija imobilisane supstance i/ili matriksa hidrogela;
3. difuzija imobilisanih supstanci ili produkta razgradnje polimera u okolni medijum;
4. usled degradacije polimera može doći do promene pH vrednosti u hidrogelu;
5. degradacija hidrogela može biti autokatalizovana;
6. bubrenje hidrogela;

7. vezivanje i interakcije imobilisanih supstanci sa ostacima lanaca hidrogela;
8. konvektivni način prenosa uzrokovan strujanjem fluida u fiziološkoj sredini;
9. procesi adsorpcije/desorpcije različitih supstanci prisutnih u fiziološkoj sredini;
10. promena u geometriji sistema za otpuštanje izazvana naponima u fiziološkoj sredini.

Ipak, da bi se proces otpuštanja imobilisane supstance opisao matematički, nije racionalno uzimati u obzir sve gore navedene fenomene već samo dominantne fizičke i hemijske procese. Tako da se sa stanovišta hemijskog inženjerstva u opisivanju mehanizma otpuštanja neke supstance iz hidrogela najčešće u obzir uzimaju sledeći postupci (Zarzycki i sar., 2010):

1. spoljni prenos mase (difuzija kroz granični sloj tečno-hidrogel);
2. unutrašnja difuzija (kroz matriks hidrogela);
3. desorpcija (ukoliko je supstanca imobilisana fizičkom adsorpcijom);
4. hemijske reakcije (npr. sa molekulima iz okolne sredine ili produktima razgradnje hidrogela).

Pri tome je najčešće limitirajući korak brzina unutrašnje difuzije (molekulska difuzija kroz matriks hidrogela) uz propratne hemijske reakcije ako su prisutne.

U smeši fluida, sa različitim koncentracijama neke supstance u raznim tačkama, javlja se prirodna tendencija da se razlike koncentracija smanje. Ova pojava koja je uočena još 1815. godine i naziva se molekulskom difuzijom (Duduković, 2008). Ako je sistem nepokretan ili je strujanje laminarno, pri čemu se slojevi toka fluida ne mešaju, sopstveni prenos mase se vrši difuzijom, odnosno kretanjem molekula iz sloja više u sloj niže koncentracije (Cvijović i Bošković-Vragolović, 2001). Fik (*Fick*) je pokazao da se molski sopstveni fluks jedne supstance kroz drugu može prikazati preko sledeće jednačine

$$N_{A_x} = - D_{AB} \frac{dC_A}{dx} \quad (1.5)$$

gde je N_A molški fluks komponente A, D_{AB} je koeficijent difuzije ili molekulska difuzivnost komponente A kroz komponentu B, C_A je koncentracije komponente A koja se menja u x pravcu (Duduković, 2008).

Opšta jednačina diferencijalnog bilansa mase sa hemijskom reakcijom je:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = r_A + D\nabla^2 C \quad (1.6)$$

gde je r_A brzina hemijske reakcije nastajanja komponente A, a C je koncentracija komponente A.

Ova jednačina za Dekartov koordinatni sistem glasi:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = r_A + D\left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2}\right) \quad (1.7)$$

U cilindričnom koordinatnom sistemu jednačina 1.6 postaje:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\left(\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r}\left(r \frac{\partial C}{\partial r}\right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 C}{\partial \phi^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2}\right) + r_A \quad (1.8)$$

dok je u sfernom koordinatnom sistemu dobija se:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\left(\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r}\left(r^2 \frac{\partial C}{\partial r}\right) + \frac{1}{r^2 \sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \sin \theta \frac{\partial C}{\partial \theta} + \frac{1}{r^2 \sin^2 \theta} \frac{\partial^2 C}{\partial \phi^2}\right) + r_A \quad (1.9)$$

Upotreba hidrogelova za biomedicinsku upotrebu kao na primer u inženjerstvu tkiva u mnogome zavisi od poroznosti hidrogela, organizacije i povezanosti pora kako bi se na što efektivniji način putem medijuma dopremili svi neophodni nutrijenti do svih ćelija u nosaču. Propustljivost nosača zavisi od sledećih parametara: 1) poroznosti materijala, 2) veličine i raspodele pora u nosaču, 3) povezanosti pora, 4) propustljivosti u porama, 5) orijentacije pora (O'Brien i sar., 2007). Uglavnom, kretanje supstance kroz hidrogel je opisano modelom difuzije (Siepmann i Siepmann, 2012), ali takođe pokazano je da otežana konvekcija medijuma kroz hidrogel takođe utiče na mobilnost supstance kroz

hidrogel ukoliko konvekcija postoji (Kapur i sar., 1997, Kosto i Deen, 2005, Kosto i Deen, 2004, White i Deen, 2002).

Iako se hidrogelovi sastoje najvećim delom od vode, ipak vlakna polimera, sterne smetnje polimera i makromolekula otežavaju difuziju i konvekciju neke supstance. Tako da se lokalni fluks jedne supstance u izotropskom hidrogelu može prikazati kao (Kosto i Deen, 2005):

$$N = -K_d D_\infty \nabla C + K_e v C \quad (1.10)$$

gde je K_d koeficijent ograničene difuzivnosti i predstavlja odnos difuzivnosti unutar hidrogela i difuzivnosti slobodne supstance u rastvoru, D_∞ . Koeficijent ograničene konvekcije kroz hidrogel, K_e , je odnos brzine čestice i fluida u slučaju kada je difuzivnost zanemarljiva, a rastvorena supstanca se posmatra kao slobodna i uniformno suspendovana. Oba ova koeficijenta zavise od veličine makromolekula kao i od gel strukture. Srednja brzina fluida kroz hidrogel je obeležena sa v , dok je C srednja koncentracija supstance koja se prenosi u hidrogelu.

Jednačina (1.10) je izvedena iz opšte bilansne jednačine mase neke supstance koja se prenosi difuzijom i strujanjem fluida i pri tome nastaje u reakciji ova jednačina u dekartovom koordinatnom sistemu koja glasi:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = r_A + D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \right) - \left(u \frac{\partial C}{\partial x} + v \frac{\partial C}{\partial y} + w \frac{\partial C}{\partial z} \right) \quad (1.11)$$

Uz matematički model otpuštanja supstance iz hidrogela, potrebno je postaviti i početne i granične uslove. Početni uslovi podrazumevaju početnu distribuciju supstance u sistemu dok granični uslovi podrazumevaju uslove za prenos mase na granici sistema.

1.6.1. Matematičko modelovanje difuzije imobilisanih supstanci iz hidrogela

Da bi se postavio model koji opisuje najjednostavniji fenomen difuzije supstance iz hidrogela, najčešće se uvode sledeće pretpostavke (Siepmann i Siepmann, 2012):

1. unutrašnja difuzija supstance kroz hidrogel je limitirajući korak;
2. koeficijent difuzije supstance u hidrogelu je konstantan;

3. sistem za otpuštanje je idealno uronjen u medijum za otpuštanje tokom celokupnog vremena;
4. hidrogel ne bubri značajno;
5. hidrogel se ne degradira tokom otpuštanja supstance;
6. otpor prenosu mase na granici između sistema za otpuštanje i medijuma je zanemarljiv.

Bazirajući se na ovim osnovnim pretpostavkama, izvedeno je više modela koji opisuju otpuštanje supstance iz matriksa hidrogela. Ukoliko je aktivna supstanca uniformno distribuirana u hidrogelu izvedene su poznate analitičke jednačine za različite geometrije sistema

Za ravnu ploču izvedena je jednačina (Crank, 1975):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{\exp[-D_L(2n+1)^2\pi^2t/L^2]}{(2n+1)^2} \quad (1.12)$$

gde su M_t i M_∞ količine supstance otpuštene nakon nekog vremena t i nakon beskonačnog vremena redom, D_L je koeficijent difuzije supstance kroz ploču, a L je debljina ploče.

Na osnovu ove jednačine (1.12) se izvode dve aproksimacije za početni i krajnji period otpuštanja kao što sledi (Siepmann i Siepmann, 2012):

Za kratka vremena otpuštanja $\frac{M_t}{M_\infty} \leq 0,6$ dobija se:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \left(\frac{D_L t}{\pi L^2} \right)^{0,5} \quad (1.13)$$

Za duga vremena otpuštanja $\frac{M_t}{M_\infty} \geq 0,4$ jednačina (1.12) se svodi na:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \exp\left(-\frac{\pi^2 D_L t}{L^2}\right) \quad (1.14)$$

Za sferu izvedena je jednačina (Crank, 1975):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp[-D_R n^2 \pi^2 t / R^2]}{n^2} \quad (1.15)$$

gde je R poluprečnik sfere.

I u ovom slučaju izvedenu su dve aproksimacije za početni i krajnji period otpuštanja

Za kratka vremena $\frac{M_t}{M_\infty} < 0,4$ dobija se (Siepmann i Siepmann, 2012):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 6 \left(\frac{D_R t}{\pi R^2} \right)^{0,5} - \frac{3 D t}{R^2} \quad (1.16)$$

Za duga vremena $\frac{M_t}{M_\infty} > 0,6$ izvedena je jednačina (Siepmann i Siepmann, 2012):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \exp\left(-\frac{\pi^2 D_R t}{R^2}\right) \quad (1.17)$$

1.7. MIGRACIJA SUPSTANCI IZ PAKOVANJA ZA HRANU

Po standardima Evropske Unije migracioni test bilo koje supstance se sprovodi tako što se meri otpuštanje supstance iz pakovanja za hranu u jedinicama mg kg^{-1} koristeći 6 dm^2 površine pakovanja po 1 kg hrane (odnosno simulanta hrane). Ovaj test se sprovodi u simulantima za hranu. Simulanti hrane na bazi vode su: vodeni rastvor 10 zap. % etanola (simulant A koji predstavlja vodenu hranu), vodeni rastvor 3 zap. % sirćetne kiseline (simulant B koji predstavlja hranu koja ima hidrofilni karakter i pH ispod 4,5), vodeni rastvor 20 zap. % etanola (simulant C koji predstavlja hranu koja ima hidrofilni karakter i hranu sa sadržajem alkohola do 20 %), vodeni rastvor 50 zap. % etanola (simulant D1 koji predstavlja alkoholnu hranu koja ima sadržaj alkohola veći do 20 %), biljno ulje (stimulant D2, masna hrana). Kao stimulant masne hrane (stimulant D2) umesto biljnog ulja može se koristiti vodeni rastvor 95 zap. % etanola (Commission Regulation (EU) No 10/2011). Migracioni test se uglavnom sprovodi na različitim temperaturama i to na 4, 20 i 40 °C u toku 10 dana, na 70 °C u toku 2 sata i na 100 °C u toku 1 sata (Commission Regulation (EU) No 10/2011). U regulativi su navedene supstance procenjene kao dozvoljene i čija migracija u simulante za hranu može da bude i do 60 mg kg^{-1} hrane, ali neke supstance su dodatno limitirane na maksimalnu otpuštenu koncentraciju od 1 mg kg^{-1} hrane (Commission Regulation (EU) No

10/2011). Otpuštanje nekih metala iz pakovanja za hranu je dodatno ograničeno, pa je tako maksimalna dozvoljena koncentracija otpuštenog barijuma 1 mg kg⁻¹ hrane, kobalta 0,05 mg kg⁻¹ hrane, bakra 5 mg kg⁻¹ hrane, gvožđa 48 mg kg⁻¹ hrane, litijuma 0,6 mg kg⁻¹ hrane, magnezijuma 0,6 mg kg⁻¹ hrane i cinka 25 mg kg⁻¹ hrane. Supstance koje mogu biti otpuštene iz pakovanja za hranu u simulante za hranu u zavisnosti od rizika toksičnosti su grupisane u tri kategorije tako da su dozvoljene koncentracije svedene na određene opsege: i) 5 – 60 mg kg⁻¹ hrane, ii) 0,05-5 mg kg⁻¹ hrane i iii) < 0,05 mg kg⁻¹ hrane (European Commission Scientific Committee, 2011).

Maksimalna dozvoljena koncentracija srebra u jonskom obliku koja može da migrira u simulante za hranu je 0,05 mg/kg hrane (The EFSA Journal 2005, EFSA 2011a). Takođe, postoji i privremena lista aditiva na bazi srebra za koje nije potrebno da budu regulisani od strane EFSA već su regulisani na nacionalnom nivou. Ovi aditivi su: 20 mas. % srebro-hlorid kao prevlaka preko 80 mas. % titanijum-oksida, staklo sa srebrom sa različitim udelima srebra (0,5 – 3 %), srebro-zeolit sa masenim udelom srebra od 2,5 – 5 % i srebro-cink-zeolita sa 1,6 mas. % srebra (https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_fcm_legis_additives-prov-list.pdf 10.05.2017)

Ipak, ove regulative ne uključuju i ne odnose se na migraciju fabrikovanih tj. namenski napravljenih nanočestica (Commission Regulation (EU) No 10/2011).

Migracija nanočestica iz plastičnih pakovanja u okolinu se odvija u skladu sa četiri osnovna mehanizma: i) desorpcija nanočestica, ii) difuzija nanočestica, iii) rastvaranje nanočestica i iv) degradacija pakovanja (Duncan i Pillai 2015). Do degradacije plastičnog pakovanja može doći usled mehaničkog oštećenja, fotodegradacije, termalne degradacije i hidrolize (Duncan 2015). Najpoznatiji model koji se koristi da bi opisao migraciju komponente iz polimera je Piringerov model (Otto Piringer) (Duncan i Pillai 2015):

$$D_p^* = 10^4 \exp\left(A_p - 0,135M_r^{\frac{2}{3}} + 0,003M_r - \frac{10454}{T}\right) \quad (1.18)$$

gde je D_p^* koeficijent difuzije supstance u polimeru, A_p – specifični parametar polimera, M_r – relativna molekulska masa supstance koja migrira i T je temperatura kojoj je sistem izložen.

Jedan od prvih pokušaja da se opiše difuzija nanočestica iz materijala za pakovanje hrane u okolni medijum je bio Fikovom difuzijom korišćenjem Štoks-Ajnštajnovne jednačine (Stoks-Einstein) kojom se opisuje koeficijent difuzije sferičnih čestica u fluidu. Tako je izračunat broj nanočestica (n) koje mogu biti otpuštene iz polimera u medijum (Simon i sar., 2008):

$$n = \frac{c_{0n} \cdot S_x}{4} \left(\frac{2 \cdot k_B \cdot T \cdot t}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot a} \right)^{1/2} \quad (1.19)$$

gde je S_x – ukupna površina polimera izložena simulantu za hranu, c_{0n} - početna koncentracija nanočestica u polimeru, k_B je Bolcmanova konstanta, T je apsolutna temperatura, η je dinamička viskoznost amorfne faze polimera, a je poluprečnik nanočestice koja difunduje.

Ipak, najjednostavnija jednačina za opisivanje migracije tj. otpuštanja supstanci iz materijala za pakovanje hrane je zasnovana na drugom Fikovom zakonu difuzije za kratka vremena otpuštanja i za ploču je predstavljena jednačinom (1.13).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji je bio razvoj matematičkih modela koji bi opisali mehanizam i kinetiku otpuštanja nanočestica srebra iz nanokompozitnih alginatnih hidrogelova radi postizanja antimikrobne aktivnosti u različitim primenama. Shodno tome, fokus je stavljen na hidrogelove sa elektrohemijski sintetisanim nanočesticama srebra za potencijalnu primenu u medicini, kao i na razvoj i karakterizaciju kompozitnih polimernih filmova sa alginatnim mikročesticama sa sadržanim nanočesticama srebra sintetisanim hidrotermalnom metodom za primenu u pakovanju hrane.

Posebni ciljevi ove doktorske disertacije su bili:

- dobijanje i karakterizacija Ag/alginatnih mikročestica elektrostatičkom ekstruzijom koloidnog rastvora sintetisanog elektrohemijskom metodom;
- ispitivanje kinetike otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih hidrogelova u različitim oblicima (mikročestice, diskovi) sa elektrohemijski sintetisanim nanočesticama srebra u vodi i u fiziološkom rastvoru kao modelu biološkog fluida u različitim hidrodinamičkim uslovima relevantnim za primenu u oblogama za rane i implantatima za meka tkiva;
- razvoj matematičkih modela za opisivanje kinetike otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih hidrogelova u vodi, a zatim i u prisustvu jona hlora, polazeći od jednostavnijih modela unutrašnje difuzije i uključivanjem hemijske reakcije oksidacije nanočestica, reakcije sa jonima hlora i difuzije nastalih formi $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$;
- sinteza nanočestica srebra hidrotermalnom metodom u rastvoru Na-alginata i dobijanje Ag/alginatnih mikročestica elektrostatičkom ekstruzijom;
- dobijanje i karakterizacija PLA i PVA kompozitnih filmova sa umetnutim Ag/alginatnim mikročesticama metodom isparavanja rastvarača;
- ispitivanje i matematičko modelovanje kinetike otpuštanja srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica, kao i iz kompozitnih PVA i PLA filmova u simulante za hranu na bazi vode;
- ispitivanje antibakterijske aktivnosti PLA i PVA kompozitnih filmova na jednom model soju gram-pozitivnih i gram negativnih bakterija.

3. MATERIJALI I METODE

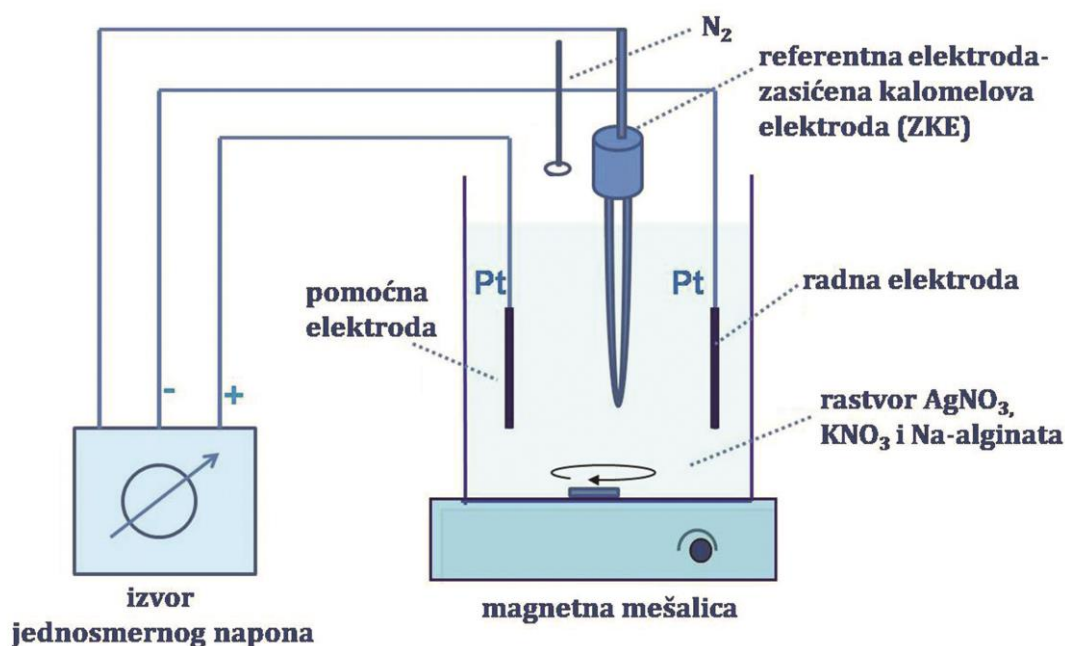
3.1. MATERIJALI

U ovom radu korišćeni su natrijum-alginat niskog viskoziteta (A-2158, Sigma, St. Louis, MO, SAD), natrijum-alginat srednjeg viskoziteta (A-2033, Sigma, St. Louis, MO, SAD), poli(vinil alkohol) (PVA) rastvorljiv u vrućoj vodi (P1763, Sigma, St. Louis, MO, SAD) i poli(mlečna kiselina) (PLA) (3052 D, Nature Works® SAD). Takođe, korišćeni su srebro-nitrat (M. P. Hemija, Beograd, Srbija), kalijum-nitrat (Centrohem, Stara Pazova, Srbija), kalcijum-nitrat tetrahidrat (Centrohem, Stara Pazova, Srbija), natrijum-citrat dihidrat (Sigma Aldrich, Kosher, Austrija), azotna kiselina (65 %, Zorka Pharma, Šabac, Srbija), amonijum hidroksid (25 %, NRK Inženjering, Beograd, Srbija), hloroform (Fisher Chemical, Velika Britanija), 96 zap. % etanol (Zorka Pharma, Šabac, Srbija), 99.5 zap. % glacijalna sirćetna kiselina (Zorka Pharma, Šabac, Srbija), natrijum-hlorid (Centrohem, Stara Pazova, Srbija). U eksperimentima određivanja antimikrobne aktivnosti korišćene su bakterijske kulture: *Staphylococcus aureus* TL dobijena sa Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, Univerzitet u Nišu (Leskovac, Srbija), *Escherichia coli* ATCC 25922 nabavljena od American Type Culture Collection (Manassas, VA, SAD). Za pripremu laboratorijske kulture bakterija korišćena je podloga napravljena od hranljivog bujona i agara (Institut za imunologiju i virusologiju Torlak, Beograd, Srbija).

3.2. SINTEZA Ag/ALGINATNIH KOLOIDNIH RASTVORA

3.2.1. Elektrohemijska metoda

Natrijum-alginatni koloidni rastvor sa nanočesticama srebra je dobijen novom elektrohemijском metodom (Obradovic i sar., 2015). Nanočestice srebra su elektrohemijski sintetisane u vodenom rastvoru koji je sadržao 0,1 M KNO₃, 3,9 mM AgNO₃, i 2 mas.% Na-alginata. Za galvanostatsku sintezu je korišćen Gamry Reference 600 potencijostat/galvanostat/ZRA (Gamry Instruments, Warminster, PA, SAD), u elektrohemijскоj ćeliji sa radnom Pt elektrodom (Pt pločica dimenzija 9 x 10 mm), pomoćnom Pt elektrodom (Pt pločica dimenzija 10 x 13 mm) i zasićenom kalomelovom elektrodom (ZKE) kao referentnom (slika 3.1). Sinteza je izvođena uz stalno mešanje, pri gustini struje od 50 mAcm⁻² i pri vremenu implementacije od 10 min. Rastvor je izlagan protoku azota 20 min pre početka sinteze, kao i tokom sinteze.



Slika 3.1. Šematski prikaz eksperimentalne aparature za elektrohemijsku sintezu nanočestica srebra: u elektrohemijskoj ćeliji sa vodenim rastvorom KNO_3 , AgNO_3 , i Na-alginata se nalaze radna Pt elektroda, pomoćna Pt elektroda i zasićena kalomelova elektroda (ZKE) kao referentna elektroda. Galvanostatska sinteza je izvedena u elektrohemijskoj ćeliji uz stalno mešanje vodenog rastvora i atmosferi azota (Stojkowska 2015)

U toku elektrohemijske sinteze je primećeno da dolazi do blagog taloženja alginatnog hidrogela na elektrodi, tako da se koncentracija alginata u koloidnom rastvoru tokom sinteze smanjuje na 1,73 mas.% u slučaju alginata srednje viskoznosti i 1,9 mas. % u slučaju alginata niske viskoznosti. Da bi se dobili alginatni koloidni rastvori sa različitom koncentracijom nanočestica srebra, početno sintetisani koloidni rastvor je razblažen rastvorom Na-alginata odgovarajućeg masenog udela.

3.2.2. Hidrotermalna metoda

Nanočestice srebra su dobijene u rastvoru natrijum-alginata hidrotermalnom sintezom u autoklavu (*Prva Iskra, Srbija*) pod pritiskom od 2 bara i na temperaturi od $100\text{ }^\circ\text{C}$ prema metodi opisanoj u literaturi (Yang i Pan, 2012). U 40 cm^3 vodenog rastvora 2 mas. % Na-alginata srednje viskoznosti se postepeno uz mešanje dodaje 7 cm^3 rastvora AgNO_3 (28,6 mM). Ovakva smeša se meša 15 minuta nakon čega se u rastvor postepeno

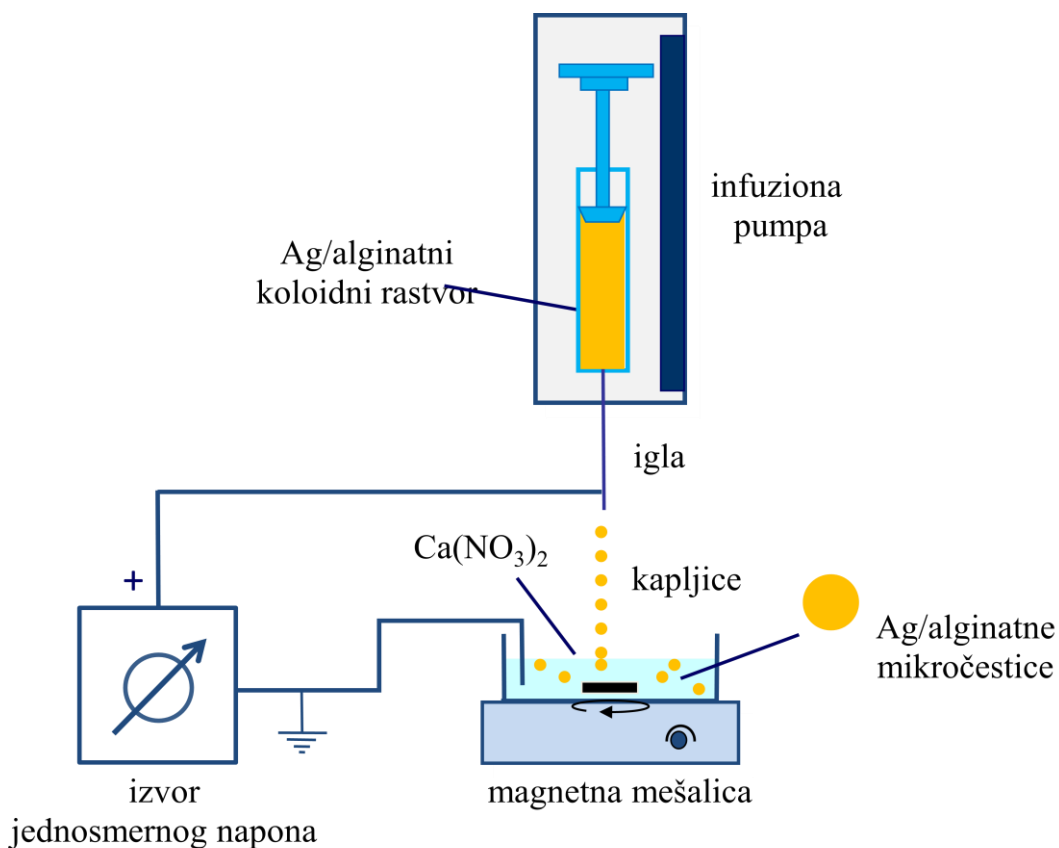
u kapima dodaje 3 cm³ 2 mas. % Na- citrata (Bastus et al., 2014) i ostavlja da se meša narednih 15 minuta. Smeša se zatim zatvara poklopcem ili poklapa aluminijumskom folijom i smešta u autoklav na 100 °C, pod pritiskom od 2 bara u toku 5 sati. Finalna koncentracija jona srebra u rastvoru bi trebalo da bude 4 mM ukoliko ne dolazi do većeg isparavanja vode. Ovako dobijen koloidni rastvor se nakon sinteze meša na mešalici oko 10 min dok se malo ne ohladi, a zatim se centrifugira 10 minuta u centrifugi (*Centrifuge 5804, Eppendorf, Germany*) na 11000 obr min⁻¹, kako bi se izdvojile veće čestice i postigla uniformnost koloidnog rastvora.

3.3. DOBIJANJE NANOKOMPOZITNIH MATERIJALA

3.3.1. Dobijanje nanokompozitnih Ag/alginatnih hidrogelova u obliku mikročestica

Natrijum alginatni koloidni rastvori sa nanočesticama srebra (Ag/alginat) su korišćeni za dobijanje Ag/alginatnih mikročestica elektrostatičkom ekstruzijom (Obradovic i sar., 2015). Ag/alginatni koloidni rastvori sa različitim koncentracijama nanočestica srebra su uz pomoć infuzione pumpe za potiskivanje tečnosti (*Racel, Scientific Instruments, Stamford, CT, SAD*) potiskivani kroz pozitivno naelektrisanu iglu od nerđajućeg čelika. Iz generatora visokog napona (*Model 30R, Bertan Associates, Inc., New York, SAD*) izvedena je pozitivna elektroda i povezana sa iglom, a u rastvor kalcijum nitrata koji je služio kao rastvor za geliranje uronjena je uzemljena elektroda (slika 3.2). Tako je između vrha igle i rastvora kalcijum-nitrata stvoreno električno polje, pa se tako, usled gravitacione i elektrostatičke sile, koloidni rastvor od vrha igle otkidao u vidu mlaza sitnih naelektrisanih kapljica i gelirao usled razmene jona Na⁺ i Ca²⁺ tako da je došlo do očvršćavanja kapi u obliku sferičnih čestica. U slučaju koloidnog rastvora dobijenog elektrohemijom korišćena je igla prečnika 25 G sa ravnim vrhom (*Nisco Engineering, Švajcarska*) pri čemu je rastojanje između vrha igle i rastvora za geliranje (1,5 mas.% Ca(NO₃)₂ x 4H₂O) iznosilo oko 2 cm, a primenjeni elektrostatički napon, je bio u opsegu od 6 - 7 kV. Protok rastvora Ag/alginata je bio 39,3 cm³h⁻¹ uz korišćenje šprica zapremine 10 cm³. U slučaju koloidnog rastvora dobijenog hidrotermalnom sintezom korišćena je igla prečnika 28 G sa ravnim vrhom (*Nisco Engineering, Švajcarska*) pri čemu je rastojanje između vrha igle i rastvora za geliranje (3 mas.% Ca(NO₃)₂ x 4H₂O) iznosilo oko 2 cm, a primenjeni elektrostatički napon, između vrha igle i rastvora za geliranje je bio 6 kV. Protok rastvora Ag/alginata je bio 7,93 cm³h⁻¹ uz

korišćenje šprica zapremine 10 cm³. Nakon formiranja, mikročestice su ostavljene u rastvoru za geliranje još 30 min, uz mešanje. Nakon toga, Ag/alginatne mikročestice su isprane dva puta u dH₂O, kako bi se uklonili zaostali joni srebra i kalcijuma i dalje su korišćene u eksperimentalnim istraživanjima.



Slika 3.2. Šematski prikaz eksperimentalne aparature za izvođenje elektrostatičke ekstruzije: koloidni rastvor se potiskuje uz pomoć infuzione pumpe kroz pozitivno naelektrisanu iglu dok je rastvor za geliranje (rastvor kalcijum-nitrata) uzmešten. Između vrha igle i rastvora Ca(NO₃)₂ se stvara električno polje pa se koloidni rastvor potiskivan pumpom kroz iglu otkida u obliku mlaza sitnih kapljica. Kapljice geliraju u rastvoru Ca(NO₃)₂ usled razmene jona Na⁺ i Ca²⁺ tako da dolazi do očvršćavanja kapi u obliku sfernih čestica.

3.3.2. Dobijanje i rehidracija suvih nanokompozitnih mikročestica

Ag/alginatne mikročestice sa nanočesticama srebra dobijene od koloidnih rastvora su sušene na sobnoj temperaturi do konstantne mase. Mogućnost rehidracije suvih Ag/alginatnih mikročestica je ispitivana korišćenjem fiziološkog rastvora (0,9 mas.% NaCl).

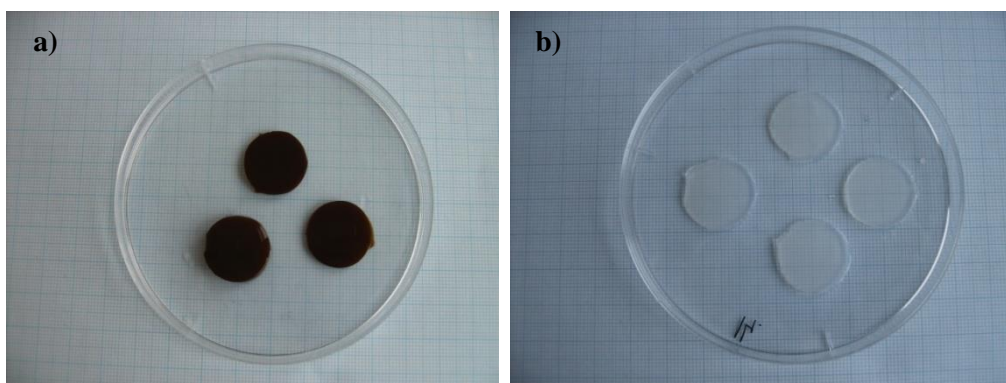
Suve Ag/alginatne mikročestice su dobijene od koloidnog rastvora sa nanočesticama srebra sintetisanim elektrohemijском metodom tako što je 4 grama vlažnih mikročestica osušeno do konstantne mase (0,15 g). Zatim su suve mikročestice potopljene u 10 cm³ fiziološkog rastvora na 37 °C i praćena je promena mase i veličine mikročestica u toku vremena.

Rehidracija nanokompozitnih Ag/alginatnih mikročestica je praćena merenjem mase i prećnika mikročestica u toku vremena.

3.3.3. Dobijanje Ag/alginatnih nanokompozitnih hidrogelova u obliku diskova

Napravljeni su diskovi od koloidnih rastvora dobijenih elektrohemijском metodom iz rastvora Na-alginata srednje viskoznosti i sa koncentracijom AgNO₃ od 3,9 mM. Na dno staklene Petri šolje (prećnika 9 cm) stavljen je filter papir sa veličinom pora od 0,20 μm (*Gelman Sciences, SAD*) natopljen 1,5 mas. % rastvorom Ca(NO₃)₂ x 4H₂O, a zatim je odozgo sipano 20 cm³ 3,9 mM koloidnog rastvora. Odmah potom i na površinu koloidnog rastvora su postavljena tri filter papira natopljena sa 1,5 mas. % rastvora Ca(NO₃)₂ x 4H₂O pri ćemu je prvi filter papir bio sa porama veličine 0,20 μm, dok su druga dva bila tehnićki filter papir (*Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Nemaćka*). Preko filter papira je zatim postepeno dodavano 20 cm³ rastvora 1,5 mas. % Ca(NO₃)₂ x 4H₂O i Petri šolja je ostavljena da stoji 48 h. Nakon tog perioda, uklonjeni su filter papiri, a dobijen hidrogel je ostavljen u istom rastvoru da dodatno gelira još 48 h. Potom su iz hidrogela, isećeni diskovi prećnika 2 cm i debljine 2 mm pomoću cilindrićnog sećiva i ostavljeni još 24 h da geliraju u novom svećem rastvoru za geliranje (1,5 mas. % Ca(NO₃)₂ x 4H₂O) (slika 3.3.). Kao kontrola napravljeni su diskovi od 1,73 mas. % Na-alginatnog rastvora na isti naćin. Poćetna masa Ag/alginatnih diskova (3 merenja)

posle geliranja je bila $0,56 \pm 0,15$ g, a čistih alginatnih diskova (3 merenja) $0,59 \pm 0,09$ g.



Slika 3.3. Diskovi hidrogelova alginata: a) Ag/alginatni diskovi, b) alginatni diskovi

3.3.4. Dobijanje filmova na bazi PLA

Filmovi na bazi PLA su dobijeni jednostavnom metodom isparavanja rastvarača. Nakon rastvaranja 2 g PLA u 20 cm^3 hloroforma uz mešanje na sobnoj temperaturi, rastvor je izlivan u staklenu Petri šolju prečnika 9 cm i ostavljan 24 h na sobnoj temperaturi kako bi sav hloroform ispario. Prilikom pravljenja PLA kompozitnih filmova, u isti rastvor hloroforma je postepeno uz mešanje dodavano 0,1 g suvih Ag/alginatnih mikročestica. U ovoj eksperimentalnoj seriji korišćene su suve Ag/alginatne mikročestice dobijene iz koloidnog rastvora sintetisanog hidrotermalnom metodom. Iz dobijenih filmova su isecani jednaki delovi dimenzija 2 cm x 3 cm koji su dalje korišćeni u eksperimentima.

3.3.5. Dobijanje filmova na bazi PVA

Filmovi na bazi PVA su dobijeni istom metodom isparavanja rastvarača kao PLA filmovi. Nakon rastvaranja 2 g PVA u 20 cm^3 dH_2O uz mešanje na $100 \text{ }^\circ\text{C}$, rastvor se izliva u staklenu Petri šolju prečnika 9 cm i ostavlja se oko nedelju dana na sobnoj temperaturi kako bi sva voda isparila do postizanja konstantne mase. Prilikom pravljenja PVA kompozitnih filmova, u isti ohlađeni rastvor PVA dodaje se postepeno uz mešanje 0,1 g suvih Ag/alginatnih mikročestica. I u ovoj eksperimentalnoj seriji korišćene su mikročestice dobijene iz koloidnog rastvora sintetisanog hidrotermalnom metodom. Iz filma se dalje isecaju jednaki delovi filmova dimenzija 2 cm x 3 cm koji su dalje korišćeni u eksperimentima.

3.4. METODE KARAKTERIZACIJE Ag/ALGINATNIH NANOKOMPOZITA

3.4.1. Optička mikroskopija

Prečnici mikročestica kao i površinska struktura diskova i filmova su određeni pomoću optičkog mikroskopa (*Olympus CX41RF, Tokio, Japan*). Srednji prečnik mikročestica je izračunat na osnovu merenja najmanje 20 mikročestica, pomoću programa za analizu slike „Cell^A” (*Olympus, Tokio, Japan*).

3.4.2. Transmisiona elektronska mikroskopija

Veličina i oblik nanočestica srebra analizirani su pomoću transmisiona elektronske mikroskopije (TEM) korišćenjem „100 CX Electron” mikroskopa (*JEOL Ltd., Tokio, Japan*), na radnom naponu od 100 kV. Snimani su početno sintetisani Ag/alginatni koloidni rastvori sintetisani pomoću obe metode korišćene u ovom radu. Uzorci za TEM analizu su postavljeni na bakarnim mrežama prekrivenim ugljenikom (*SPI Supplies/Structure Probe Inc., West Chester, PA, SAD*).

3.4.3. FE-skenirajuća elektronska mikroskopija

Prisustvo nanočestica srebra u Ag/alginatnim diskovima je ispitano primenom FE - skenirajuće elektronske mikroskopije (*Field-emission scanning electron microscopy*, FE - SEM). Hidrogel je fiksiran sukcesivnim potapanjem u sledeće vodene rastvore: i) 3 zap. % sirćetne kiseline; ii) 3 zap. % sirćetne kiseline i 25 zap. % etanola; iii) 3 zap. % sirćetne kiseline i 50 zap. % etanola; iv) 70 zap. % etanola. Diskovi su zatim čuvani u vodenom rastvoru 70 zap. % etanola na sobnoj temperaturi do sečenja na tanke listiće koji su postavljeni na komadiće mikroskopskog stakla, gde su se sušili, a zatim koristili za FE-SEM analizu.

Kompozitni PLA i PVA filmovi sa suvim Ag/alginatnim mikročesticama su presečeni, a zatim su poprečni preseki takođe ispitani primenom FE-SEM analize.

FE-SEM analiza je izvedena korišćenjem elektronskog mikroskopa *MIRA 3 XMU field emission scanning electron microscope* (Tescan USA Inc., Cranberry Twp, PA, SAD).

3.4.4. Određivanje koncentracije srebra

Ag/alginate mikročestice su rastvorene u 2 mas. % rastvoru Na-citrata (0,1 g vlažnih mikročestica u 3 cm³, odnosno 10 mg suvih mikročestica u 3 cm³). Ukupna koncentracija srebra u Ag/alginatnim mikročesticama, napravljenim od koloidnog rastvora elektrohemijском sintezom, je zatim utvrđena nakon oksidacije svih nanočestica dodavanjem rastvora amonijum hidroksida (25 mas.%) i to oko 10 cm³ rastvora na 0,1 g mase rastvorenog vlažnog hidrogela. Koncentracija ukupnog srebra u Ag/alginatnim mikročesticama, napravljenim od koloidnog rastvora hidrotermalnom sintezom je utvrđena nakon dodavanja 10 cm³ koncentrovane 65 mas. % HNO₃ na 0,1 g mase rastvorenog vlažnog hidrogela. Koncentracija srebra u Ag/alginatnom koloidnom rastvoru dobijenom elektrohemijском sintezom je određena nakon oksidacije nanočestica srebra dodatkom 10 cm³ amonijum-hidroksida (25 mas. %) u 0,1 cm³ koloida, a koncentracija srebra u Ag/alginatnom koloidnom rastvoru dobijenim hidrotermalnom sintezom je određena nakon oksidacije nanočestica srebra dodatkom 10 cm³ HNO₃ (65 mas. %). Ukupan sadržaj oslobođenog srebra u vodi u eksperimentima određivanja kinetike otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih nanokompozita određen je posle dodavanja koncentrovane kiseline HNO₃ (65 mas. %) u višku i to na 1 cm³ vode, dodaje se oko 0,5 cm³ kiseline kako bi se osiguralo da je prisutno svo srebro u bilo kom obliku prevedeno u jonski oblik.

Ukupni sadržaj oslobođenog srebra u fiziološkom rastvoru u eksperimentima praćenja kinetike otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih nanokompozita je određen posle dodavanja amonijum hidroksida (25 mas. %) u višku (0,5 cm³ amonijum hidroksida na 1 cm³ rastvora) direktno u Petri šolje u kojima su eksperimenti izvođeni kako bi se rastvorio eventualni precipitat AgCl i oksidovale nanočestice.

U eksperimentima ispitivanja migracije nanočestica srebra iz Ag/alginatnih diskova u alginate diskove ukupan sadržaj srebra u alginatnom disku je određen nakon rastvaranja celog diska (0,3 g diska u 0,7 cm³ 10 mas. % natrijum-citata) uz dodatak 3 cm³ amonijum-hidroksida (25 mas. %).

Koncentracije jona srebra u svim navedenim rastvorima su tada određene sa tačnošću 10^{-3} atomskom apsorpcionom spektroskopijom (AAS) pomoću Perkin Elmer 3100 spektrometra (*Perkin Elmer, MA, SAD*).

Ukupan sadržaj srebra u PVA kompozitnim filmovima je izmeren rastvaranjem PVA kompozitnog filma u 3 cm^3 2 mas. % Na-citrata na $80 \text{ }^\circ\text{C}$ nakon čega je u 1 cm^3 rastvorenog filma dodato 5 cm^3 koncentrovane azotne kiseline i uzorak meren AAS metodom. Ukupan sadržaj srebra u PLA kompozitnim filmovima je izmeren rastvaranjem PLA kompozitnog filma u 5 cm^3 hloroforma na sobnoj temperaturi pri čemu dolazi do rastvaranja samo PLA polimera dok suve Ag/alginatne mikročestice ostaju nerastvorne. Rastvoreni PLA polimer se zatim dekantuje, a zaostale Ag/alginatne mikročestice se rastvaraju u 3 cm^3 2 mas. % Na-citrata. U 1 cm^3 rastvorenih mikročestica je dodato 5 cm^3 koncentrovane azotne kiseline i uzorak je meren AAS metodom.

Ukupan sadržaj oslobođenog srebra iz PLA i PVA kompozitnih filmova u vodenim rastvorima etanola (10 zap. % rastvor etanola i 95 zap. % rastvor etanola) je određen pomoću optičke emisijske spektrometrije sa indukovanom kuplovanom plazmom ICP-OES (engl., *inductively coupled plasma optical emission spectrometry, Thermo Scientific, iCAP 6500, Engleska*) nakon potpunog uparavanja etanola i dodavanja 10 cm^3 HNO_3 (65 mas. %), dok je sadržaj oslobođenog srebra u 3 % zap. rastvoru sirćetne kiseline meren direktno takođe pomoću ICP-OES metode.

3.4.5. UV-vidljiva spektroskopija

Prisustvo nanočestica srebra u koloidnom rastvoru, kao i u Ag/alginatnim hidrogelovima i PLA i PVA kompozitnim filmovima nakon rastvaranja je ispitano i UV-vidljivom spektroskopijom, pomoću UV-vidljivog spektrofotometra (*UV3100, Mapada, Shanghai, Kina*). Pri tome su Ag/alginatni koloidni rastvori razblaženi destilovanom vodom i to $100 \text{ } \mu\text{l}$ koloidnog rastvora u $2,9 \text{ cm}^3$ dH_2O . Sa druge strane, Ag/alginatne mikročestice kao i diskovi su rastvoreni u 2 mas.% rastvoru natrijum-citrata i to $0,1 \text{ g}$ vlažnog hidrogela u $2,9 \text{ cm}^3$ rastvora, odnosno 10 mg suvog hidrogela u 3 cm^3 rastvora.

PLA kompozitni filmovi su rastvarani u 5 cm³ hloroforma pri čemu dolazi do rastvaranja PLA a mikročestice ostaju nerastvorene. Iz takve smeše se izdvaja hloroform dekantovanjem, a zatim se dodaje 3 cm³ natrijum-citrata (2 mas. %) uz intenzivno mešanje 30 min kako bi došlo do rastvaranja mikročestica. Pipetom se zatim izdvaja 1 cm³ gornje vodene faze i analizira primenom UV-vidljive spektroskopije.

PVA kompozitni filmovi su rastvarani u 3 cm³ rastvora natrijum-citrata (2 mas. %) na 70 °C pri čemu dolazi do potpunog rastvaranja. Uzorci ovog rastvora su zatim analizirani primenom UV-vidljive spektroskopije.

3.4.5.1. *Korelisanje koncentracije srebra u koloidnim rastvorima i dobijenim Ag/alginatnim mikročesticama*

U ovom radu je prvo ispitana mogućnost korelisanja maksimalnih vrednosti apsorbance UV-vidljivih spektara u rastvorima sa nanočesticama srebra i koncentracije nanočestica. Pri tome, pošto u datim eksperimentalnim sistemima nije bilo moguće direktno odrediti koncentraciju nanočestica srebra, ta koncentracija je određivana na osnovu merenja koncentracije jona srebra u rastvoru nakon oksidacije nanočestica uz određene pretpostavke. Prvo, pretpostavljeno je da tokom elektrohemijske sinteze dolazi do potpune redukcije Ag⁺ do nanočestica. Uz tu pretpostavku, napravljena je serija koloidnih rastvora alginata sa različitim koncentracijama nanočestica polazeći od elektrohemijski sintetisanog koloidnog rastvora sa početnom koncentracijom AgNO₃ od 3,9 mM. Ovaj rastvor je razblažen 1,73 mas. % rastvorom natrijum-alginata srednje viskoznosti tako da su nominalne koncentracije srebra iznosile 0,5; 1; 1,5; 2 i 3 mM. Ovi rastvori su analizirani primenom UV-vidljive spektroskopije, dok je ukupna koncentracija srebra određena primenom AAS nakon oksidacije nanočestica dodavanjem 10 cm³ amonijum-hidroksida (25 mas. %) u 0,1 cm³ koloida. Posle toga, od datih koloidnih rastvora napravljene su Ag/alginatne mikročestice koje su nakon rastvaranja takođe analizirane primenom UV-vidljive spektroskopije dok je ukupna koncentracija srebra određena primenom AAS nakon što je 0,1 g vlažnih mikročestica rastvoreno u 2,9 cm³ 2 mas. % Na-citrata, a potom dodato 10 cm³ 25 mas. % NH₄OH.

Po istoj metodi je analiziran Ag/alginatni koloidni rastvor dobijen hidrotermalnom metodom s tim što je u ovom slučaju početni rastvor koloida je bio razblažen 2 mas. %

rastvorom natrijum - alginata srednje viskoznosti koji je tretiran na isti način kao alginatni rastvor tokom hidrotermalne sinteze. Naime, rastvor je autoklaviran 5 h u autoklavu, a potom centrifugiran 10 minuta na $11000 \text{ obr min}^{-1}$. Napravljeni su koloidi različitih razblaženja čije su koncentracije bile određene primenom AAS nakon oksidacije nanočestica srebra dodavanjem 10 cm^3 65 mas. % HNO_3 u $0,1 \text{ cm}^3$ koloidnog rastvora. Pored toga, od datih koloidnih rastvora napravljene su Ag/alginatne mikročestice koje su nakon rastvaranja takođe analizirane primenom UV-vidljive spektroskopije dok je ukupna koncentracija srebra određena primenom AAS nakon što je $0,1 \text{ g}$ vlažnih mikročestica rastvoreno u $2,9 \text{ cm}^3$ 2 mas. % Na-citrata, a potom dodato 10 cm^3 65 mas. % HNO_3 .

3.4.6. Antimikrobna aktivnost PLA i PVA kompozitnih filmova

Antimikrobna aktivnost PLA i PVA kompozitnih filmova je ispitivana prema jednom odabranom soju Gram-pozitivnih bakterija *Staphylococcus aureus TL* i jednom soju Gram-negativnih bakterija *Escherichia coli ATCC 25922*. PLA, odnosno PVA filmovi su služili kao kontrola.

Napravljen je hranljivi bujon sledećeg sastava: pepton – 15 g l^{-1} , mesni ekstrakt 3 g l^{-1} , natrijum hlorid 5 g l^{-1} , kalijum fosfat $0,3 \text{ g l}^{-1}$. Napravljen je hranljivi agar (hranljivi bujon sa 1,8 % agara) i hranljivi top agar (hranljivi bujon sa 0,7 % agara). Hranljivi agar je izliven u sterilnu staklenu Petri šolju i ostavljen oko 30 min na sobnoj temperaturi da se stvrdne. Sve podloge sterilisane su 30 min na $120 \text{ }^\circ\text{C}$ i pri nadpritisku od 1,5 bar.

Prekonoćne bakterijske kulture, ne starije od 18 h, su razblažene fiziološkim rastvorom tako da finalna koncentracija bakterija u hranljivom top agaru bude $\sim 10^5 \text{ CFU cm}^{-3}$ (oko 2 %). Hranljivi top agar sa bakterijama je bio izliven na prethodno izliveni hranljivi agar i ostavljen 15 min da se stvrdne na sobnoj temperaturi nakon čega su filmovi bili stavljeni na površinu i inkubirani 24 h na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Antimikrobna aktivnost je ocenjena na osnovu merenja širine inhibicione zone. Svi ispitivani filmovi su napravljeni po proceduri koja je prethodno opisana u odeljcima 3.3.4. i 3.3.5 samo što su za potrebe antimikrobne aktivnosti ovi filmovi držani 3 h pod vakuumom kako bi bili sigurni da je sav hloroform ispario. Potom su filmovi sterilisani pod UV lampama u laminarnoj

komori u toku 2 sata i kao takvi su korišćeni za test antimikrobne aktivnosti. Za sve vrste filmova, test antimikrobne aktivnosti je urađen u duplikatu.

3.5. ISPITIVANJE KINETIKE OTPUŠTANJA SREBRA

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitana je kinetika otpuštanja srebra iz:

- I. vlažnih Ag/alginatnih mikročestica (proizvedenih iz koloidnog rastvora dobijenog elektrohemijском sintezom korišćenjem alginata srednje viskoznosti) u dH₂O i fiziološki rastvor u statičkim uslovima i pri mešanju u vodenom kupatilu na 37 °C;
- II. suvih mikročestica (proizvedenih iz od koloidnog rastvora dobijenog elektrohemijском sintezom korišćenjem alginata srednje viskoznosti) u fiziološki rastvor u statičkim uslovima na 37 °C;
- III. vlažnih Ag/alginatnih mikročestica (proizvedenih iz koloidnog rastvora dobijenog elektrohemijском sintezom korišćenjem alginata niske viskoznosti) u dH₂O u statičkim uslovima i u pakovanom sloju pri kontinualnom protoku vode na 37 °C;
- IV. suvih Ag/alginatnih mikročestica (proizvedenih od koloidnog rastvora dobijenog hidrotermalnom sintezom) u dH₂O, 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline, 10 zap. % rastvoru etanola i 95 zap. % rastvoru etanola, na 20 °C;

Pored toga, izmerene su krajnje koncentracije otpuštenog srebra iz PLA i PVA kompozitnih filmova nakon 10 dana u 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline na 20 °C u statičkim uslovima kao i u dH₂O, 10 zap. % rastvoru etanola, 95 zap. % rastvoru etanola u statičkim uslovima na 4 °C, 20 °C i 40 °C.

Najzad, ispitana je i migracija nanočestica srebra iz Ag/alginatnih diskova (proizvedenih iz koloidnog rastvora dobijenog elektrohemijском sintezom korišćenjem alginata srednje viskoznosti) u alginatne diskove u direktnom kontaktu u statičkim uslovima, na sobnoj temperaturi.

3.5.1. Kinetika otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih mikročestica proizvedenih iz koloidnog rastvora dobijenog elektrohemijском metodom korišćenjem alginata srednje viskoznosti

3.5.1.1. Otpuštanje srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica u dH₂O u statičkim uslovima i uslovima mešanja u vodenom kupatilu

Eksperiment praćenja otpuštanja srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica, početne nominalne koncentracije srebra od 1 mM, u statičkim uslovima i uslovima sa mešanjem je izveden tako što je 4,000 ± 0,001 g vlažnih mikročestica i 10 cm³ rastvora stavljeno u Petri šolju prečnika 8 cm obezbeđujući da sve mikročestice budu ravnomerno raspoređene u monosloju ili u balone od 100 ml obezbeđujući konstantno mešanje od 125 obr min⁻¹ u vodenom kupatilu sa tresilicom (*Memmert, Germany*). Eksperiment u statičkim uslovima je kao i eksperiment u vodenom kupatilu postavljen u triplicatu i praćena je kinetika otpuštanja srebra tako što je posle određenog vremenskog intervala uzimana cela zapremina vode i ista tolika zapremina nove vode dodavana ponovo u svaki sud sa česticama. Da bi se izmerilo kolika je koncentracija difundovalog srebra u vodi pomoću AAS, u svaku izdvojenu zapreminu je dodavana kiselina po proceduri opisanoj u odeljku 3.4.4. Oba eksperimenta su trajala oko 21 dan na temperaturi od 37 ± 0,1 °C.

3.5.1.2. Otpuštanje srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica u fiziološkom rastvoru u statičkim uslovima i uslovima mešanja u vodenom kupatilu

Eksperiment otpuštanja srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica početne nominalne koncentracije srebra 1 mM u fiziološkom rastvoru je izveden tako što je 4,000 ± 0,001 g vlažnih mikročestica i 10 cm³ fiziološkog rastvora stavljeno u Petri šolje prečnika 8 cm ili stakleni balon zapremine 100 ml uz mešanje od 125 obr min⁻¹. Postavljeno je 8 eksperimenata u statičkim uslovima koji su trajali 1 h, 3 h, 5 h, 1 dan, 2 dana, 3 dana, 4 dana i 5 dana. Postavljeno je 11 eksperimenata u uslovima mešanja u vodenom kupatilu koji su trajali 1 h, 3 h, 5 h, 10 h, 1 dan, 2 dana, 3 dana, 4 dana, 5 dana i 7 dana. Svaki eksperiment je izveden u triplicatu na temperaturi od 37 ± 0,1 °C. Svaki eksperiment je kompletno analiziran gde je uziman totalni medijum i stavljen amonijum-hidroksid da bi svo srebro i talog AgCl bili pretvoreni u jonski oblik nakon čega je određena totalna

koncentracija srebra u medijumu primenom AAS (odjeljak 3.4.4). Takođe su mikročestice bile rastvarane u 2,9 cm³ 2 mas. % Na-citrata da bi se odredio sadržaj nanočestica srebra korišćenjem UV-vidljive spektroskopije. Princip rastvaranja Ag/alginatnih mikročestica je opisan u odeljku 3.4.4., a koncentracija nanočestica srebra je izračunata iz odgovarajuće korelacije za mikročestice dobijene kako je opisano u odeljku 3.4.5.1.

3.5.1.3. Otpuštanje srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica u statičkim uslovima u fiziološkom rastvoru

Ispitana je i kinetika otpuštanja srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica tako što je stavljeno 150 ± 10 mg suvih mikročestica (što predstavlja upravo 4,000 ± 0,001 g osušenih vlažnih Ag/alginatnih mikročestica) u Petri šolju prečnika 8 cm sa 10 cm³ fiziološkog rastvora. Postavljeno je 9 eksperimenata koji su trajali 1 h, 3 h, 5 h, 8 h, 10 h, 1 dan, 3 dana, 5 dana i 7 dana. Svi eksperimenti su izvedeni u triplikatu na temperaturi od 37 ± 0,1 °C. Svaki eksperiment je kompletno analiziran gde je uziman ceo medijum i stavljen amonijum-hidroksid da bi svo srebro i talog AgCl bili pretvoreni u jonski oblik nakon čega je određena ukupna koncentracija srebra u medijumu primenom AAS (odjeljak 3.4.4). Takođe su mikročestice bile rastvarane u 2,9 cm³ 2 mas. % Na-citrata da bi se odredio sadržaj nanočestica srebra korišćenjem UV-vidljive spektroskopije. Princip rastvaranja Ag/alginatnih mikročestica je opisan u odeljku 3.4.4., a koncentracija nanočestica srebra je izračunata iz odgovarajuće korelacije za mikročestice dobijene kako je opisano u odeljku 3.4.5.1.

3.5.2. Kinetika otpuštanja srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica proizvedenih iz koloidnog rastvora dobijenog elektrohemijskom metodom korišćenjem alginata niske viskoznosti

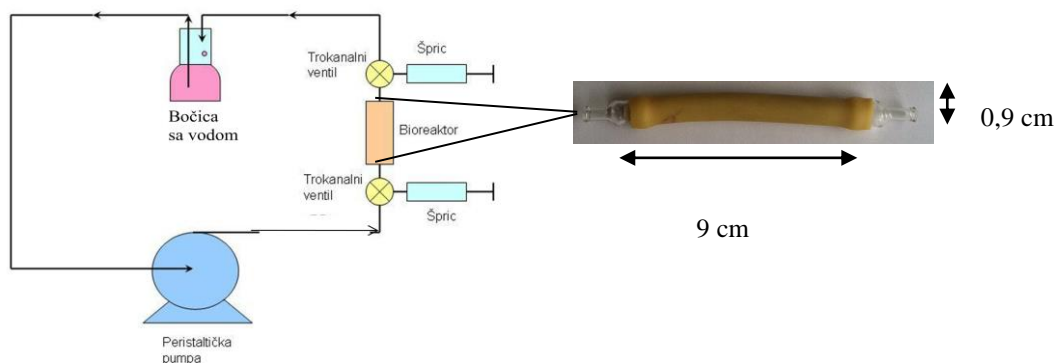
3.5.2.1. Otpuštanje srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica u statičkim uslovima u dH₂O

Eksperiment praćenja otpuštanja srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica, početne nominalne koncentracije od 1 mM, u statičkim uslovima je izveden tako što je 4,000 ± 0,001 g vlažnih mikročestica i 10 cm³ dH₂O sipano u Petri šolju prečnika 8 cm obezbeđujući tako da sve mikročestice budu ravnomerno raspoređene u monosloju. Eksperiment je trajao 21 dan na temperaturi od 37 ± 0,1 °C i izveden je u triplikatu. Praćena je kinetika otpuštanja srebra tako što je svakog određenog vremenskog intervala uzimana cela zapremina vode i ista tolika zapremina nove vode dodavana ponovo u svaki sud sa česticama. Da bi se izmerila koncentracija otpuštenog srebra u vodi pomoću AAS, u svaku izdvojenu zapreminu je dodavana kiselina po proceduri opisanoj u odeljku 3.4.4

3.5.2.2. Otpuštanje srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica u pakovanom sloju kontinualnom protoku dH₂O

Da bi se ispitaio uticaj hidrodinamičkih uslova na transport nanočestica srebra iz hidrogelova ispitano je otpuštanje srebra iz pakovanog sloja Ag/alginatnih mikročestica pri kontinualnom protoku vode. Postavljeno je po 4,000 ± 0,001 g Ag/alginatnih čestica u 10 cm³ dH₂O u dva bioreaktora sa kontinualnim protokom od 0,4 ml min⁻¹. Svaki bioreaktor je bio povezan silikonskim crevima sa rezervoarom za vodu i višekanalnom peristaltičkom pumpom (slika 3.4.). Bioreaktori (Tehnološko – metalurški fakultet, Beograd) su se sastojali od dva staklena dela na čijim krajevima su stopljene pločice od sinterovanog stakla radi onemogućavanja odnošenja mikročestica. Ta dva dela su spojena silikonskim crevom tako da je obrazovana komora za smeštanje pakovanog sloja. Bioreaktorski sistemi su bili postavljeni u inkubator na temperaturi od 37 °C pri čemu je peristaltička pumpa bila van inkubatora. Sistemi su sadržali i po dva šprica za eventualnu zamenu medijuma i izbacivanje mehurića vazduha. Postavljeno je 9 eksperimenata koji su trajali 1 h, 3 h, 5 h, 1 dan, 2 dana, 4 dana, 5 dana i 7 dana nakon

čega je svaki eksperiment kompletno analiziran. Da bi se izmerila koncentracija otpuštenog srebra u vodi pomoću AAS, u svaku izdvojenu zapreminu je dodavana kiselina po proceduri opisanoj u odeljku 3.4.4.



Slika 3.4. Šematski prikaz bioreaktorskog sistema koji se sastoji iz bioreaktora sa pakovanim slojem Ag/alginatnih mikročestica, dva šprica, rezervoara za vodu i perfuzione pumpe kojom je omogućen kontinualni protok kroz sistem.

3.5.3. Kinetika otpuštanja srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica proizvedenih iz koloidnog rastvora dobijenog hidrotermalnom sintezom

3.5.3.1. Otpuštanje srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica u statičkim uslovima u simulantima hrane na bazi vode

Ispitana je kinetika otpuštanja srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica u 4 različita rastvora: 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline, dH₂O, 10 zap. % rastvoru etanola i 95 zap. % rastvoru etanola u statičkim uslovima. Sva četiri eksperimenta su izvedena tako što je 20 ± 1 mg suvih mikročestica stavljeno u bunariće posuda sa 6 otvora u koje je dodato po 10 cm³ odgovarajućeg rastvora na 20 °C. Eksperimenti su trajali 10 dana, izvedeni su u triplikatu i svaki je imao po 9 eksperimentalnih tačaka. Kinetika je praćena tako što je nakon 1 h, 3 h, 5 h, 8 h, 1 dana, 3 dana, 5 dana, 7 dana i 10 dana uzimana cela zapremina medijuma i dodavana ista tolika zapremina medijuma, a uzorci pripremani za analizu određivanja koncentracije ukupnog srebra na ICP-OES uređaju po proceduri objašnjenjnoj u poglavlju 3.4.4., a zatim je u svaki sistem dodata ista zapremina svežeg medijuma.

3.5.4. Otpuštanje srebra iz PLA i PVA kompozitnih filmova

PLA i PVA kompozitni filmovi, dimenzija 3 cm x 2 cm, su postavljeni uspravno u staklenim bočicama sa šlifovanim zatvaračem u statičkim uslovima tako da su obe površine filma (12 cm²) bile direktno izložene medijumu u kome se film nalazio. Praćena je kinetika otpuštanja srebra iz PLA i PVA kompozitnih filmova na 20 °C u 10 cm³ 3 zap. % rastvora sirćetne kiseline postavljenih u triplikatu. Kinetika je praćena tako što je nakon 1 h, 3 h, 5 h, 1 dana, 3 dana, 5 dana, 7 dana i 10 dana svaki put izolovano 10 cm³ medijuma iz svakog sistema kako bi se izmerila koncentracija srebra pomoću ICP-OES, a u sistem je zatim dodavano 10 cm³ novog svežeg medijuma. Izmerene su i krajnje koncentracije otpuštenog srebra iz kompozitnih filmova u dH₂O, 10 zap. % rastvoru etanola i 95 zap. % rastvor etanola nakon 10 dana na 4 °C, 20 °C i 40 °C u triplikatu pri čemu medijumi nisu menjani tokom vremena. Praćene su promene dimenzija filmova i mase, kao i promene u dimenziji mikročestica koje su se nalazile u filmovima pomoću optičkog mikroskopa.

3.5.5. Ispitivanje migracije nanočestica srebra iz Ag/alginatnog diska u alginatni disk u direktnom kontaktu

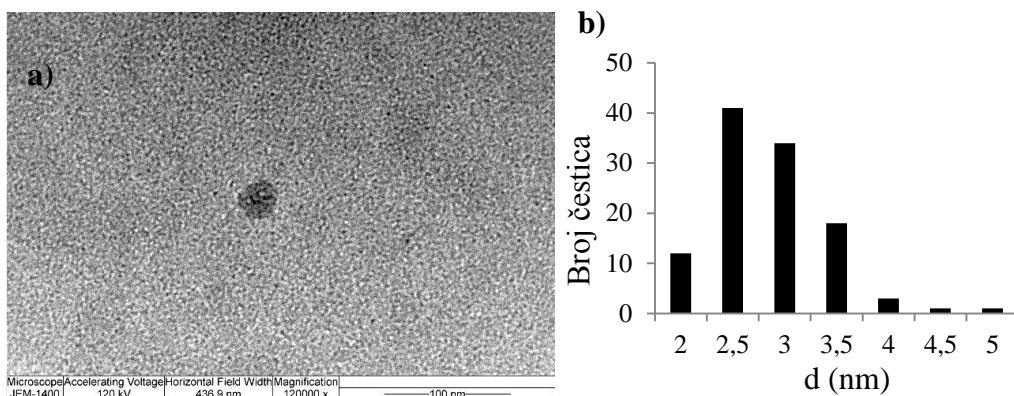
Ispitana je migracija nanočestica srebra iz Ag/alginatnih diskova napravljenih od koloidnog rastvora sintetisanog elektrohemijskom metodom od alginatnog rastvora srednje viskoznosti sa nominalnom koncentracijom srebra od 3,9 mM u čist alginatni disk u direktnom kontaktu. Diskovi su postavljeni tako što je Ag/alginatni disk stavljen preko čistog alginatnog diska u bunarić suda sa 6 otvora, a zatim je Ag/alginatni disk pritisnut gumom sa gornje strane kako bi se ostvario direktan kontakt diskova. U bunarić je zatim dodato 10 cm³ destilovane vode kako bi se izbeglo sušenje hidrogelova i obezbedila njihova stalna hidratacija. Eksperiment je izveden u triplikatu i ukupno je trajao 14 dana na sobnoj temperaturi (25 °C) u mraku. Postavljeno je po tri bunarića za svaku vremensku tačku odnosno 1, 3, 5, 7, 10 i 14 dana tako da je nakon svakog tog vremenskog intervala analizirano po 3 uzoraka Ag/alginatnih odnosno alginatnih diskova. Diskovi su rastvarani po proceduri opisanoj u odeljku 3.4.4. Takođe je izmerena i koncentracija srebra u dH₂O u kojoj su se nalazili diskovi.

4. REZULTATI

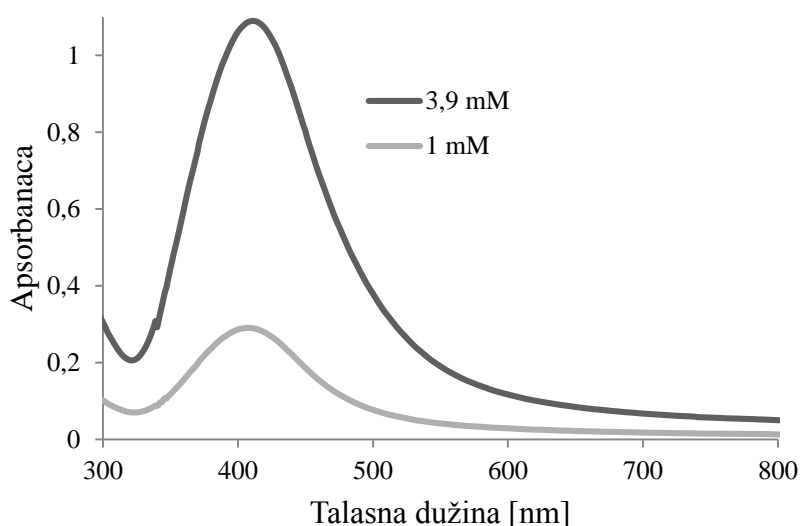
Cilj ovog rada je bio razvoj i karakterizacija novih materijala na bazi hidrogelova alginata sa nanočesticama srebra i to posebno u pogledu mehanizma i kinetike otpuštanja srebra. Pri tome su primenjene dve metode sinteze nanočestica srebra u rastvorima alginata iz kojih su zatim dobijeni nanokompozitni Ag/alginatni hidrogelovi u obliku diskova i mikročestica. Ovi oblici hidrogelova su naročito atraktivni za primenu u biomedicini gde mogu da se koriste kao implantati za meka tkiva pri čemu diskovi mogu da se oblikuju prema veličini i obliku defekta tkiva dok mikročestice mogu da služe kao injektabilni materijali. Mikročestice su takođe pogodan oblik za primenu u smešama sa drugim polimerima tako da je u ovom radu ispitana mogućnost dobijanja kompozitnih filmova PVA i PLA sa umetnutim Ag/alginatnim mikročesticama. Ovi filmovi su posebno atraktivni za potencijalnu primenu kao antimikrobna pakovanja za hranu. Svi ovi različiti oblici nanokompozitnih materijala su okarakterisani i posebno ispitani sa stanovišta mehanizma i kinetike otpuštanja srebra u uslovima koji su relevantni za odgovarajuću primenu.

4.1. KOLOIDNI RASTVOR ALGINATA SA ELEKTROHEMIJSKI SINTETISANIM NANOČESTICAMA SREBRA

U ovoj tezi je korišćen koloidni rastvor alginata sa elektrohemijski sintetisanim nanočesticama srebra polazeći od 2 mas. % rastvora natrijum-alginata srednje viskoznosti sa 3,9 mM koncentracijom AgNO_3 . Dobijeni koloidni rastvor je razblažen 1,73 mas. % rastvorom natrijum-alginata do teorijske koncentracije srebra od 1 mM koloida. TEM analiza koloidnog rastvora nominalne koncentracije srebra od 1 mM je pokazala prisustvo jako sitnih nanočestica srebra veličine $2,8 \pm 0,5$ nm (slika 4.1.). UV-vidljivi spektri ovih rastvora su predstavljeni na slici 4.2. Može se uočiti maksimum apsorbance od $1,09 \pm 0,13$ na 411 nm i $0,29 \pm 0,02$ na 410 nm za početni koloidni rastvor nominalne koncentracije srebra od 3,9 mM i razblaženi rastvor nominalne koncentracije srebra od 1 mM, redom. Pri tome su određene koncentracije ukupnog srebra primenom AAS kao $3,92 \pm 0,04$ mM i $1,20 \pm 0,01$ mM, redom.



Slika 4.1. Nanočestice srebra sintetisane elektrohemijском metodom u koloidnom rastvoru alginata sa nominalnom koncentracijom srebra od 1 mM: a) TEM mikrofotografija koloidnog rastvora (razmernik:100 nm), b) raspodela veličina nanočestica srebra

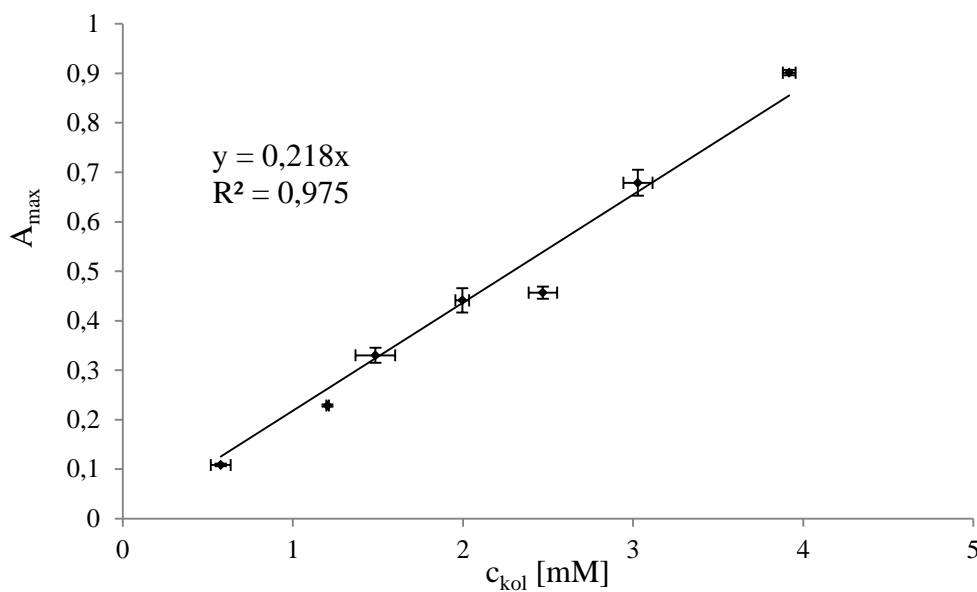


Slika 4.2. UV – vidljivi spektri koloidnih rastvora nominalne koncentracije srebra od 3,9 mM i 1 mM (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ($\leq 15\%$) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji)

Pošto je vrednost maksimuma apsorbance UV-vidljivog spektra proporcionalna koncentraciji nanočestica srebra (Stojkowska i sar., 2012) ispitana je mogućnost povezivanja ove dve veličine za koloidne rastvore razblažene 1,73 mas. % rastvorom natrijum-alginata srednje viskoznosti kako bi se dobile različite koncentracije

nanočestica srebra. Pri tome je ukupna koncentracija srebra određena primenom AAS, a pretpostavljeno je da je došlo do potpune redukcije srebra u rastvoru.

Na slici 4.3 prikazana je zavisnost maksimalne apsorbance koja je bila na talasnim dužinama oko 410 nm i ukupne koncentracije srebra.



Slika 4.3. Zavisnost maksimalne apsorbance UV-vidljivog spektra (A_{max}) od ukupne koncentracije srebra u elektrohemijski sintetisanim koloidnim rastvorima izmerene primenom AAS, (c_{kol}).

Iz ove zavisnosti može se uočiti dobro slaganje sa linearnom zavisnošću ($R^2=0,975$).

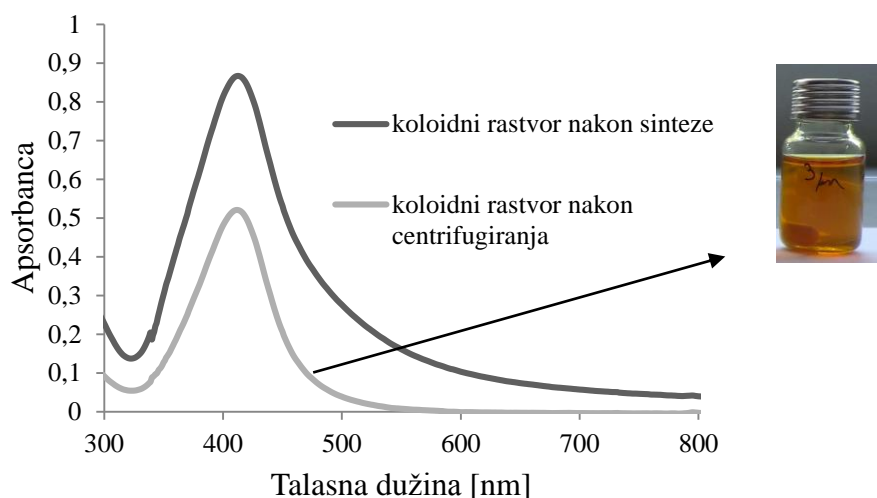
Pretpostavljajući da je prilikom sinteze došlo do potpune redukcije srebra, ova zavisnost može da se primeni za određivanje koncentracije nanočestica srebra u koloidnom rastvoru (c_n) u zavisnosti od očitane maksimalne apsorbance:

$$C_n = \frac{A_{max}}{0,218} \quad (3.1)$$

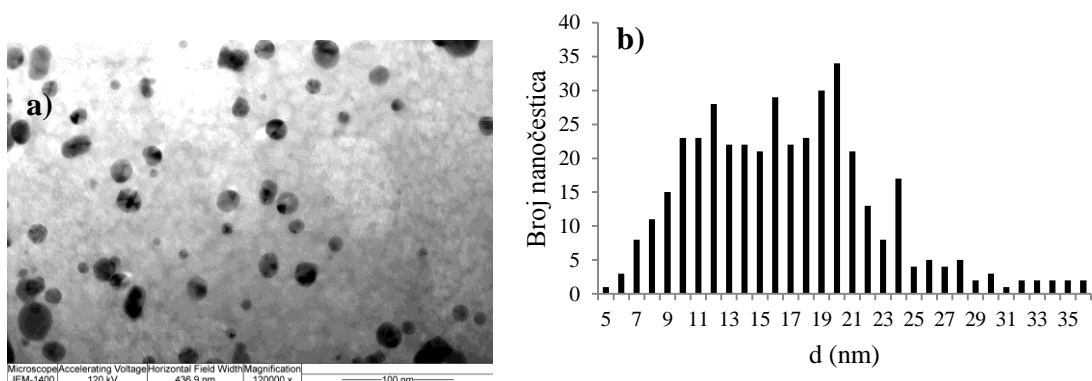
4.2. KOLOIDNI RASTVOR ALGINATA SA HIDROTERMALNO SINTETISANIM NANOČESTICAMA SREBRA

U ovom radu je primenjena metoda hidrotermalne sinteze nanočestica srebra u rastvoru alginata sa ciljem da se dobije koloidni rastvor sa približnom koncentracijom

nanočestica srebra kao u slučaju eletrohemijske sinteze. Polazeći od 2 mas. % rastvora natrijum-alginata srednje viskoznosti sa koncentracijom AgNO_3 od 3,9 mM dobijen je koloidni rastvor koji je sadržao nanočestice srebra prema UV-vidljivom spektru prikazanom na slici 4.4. Pretpostavljeno je da je tokom sinteze došlo do formiranja i drugih primesa koje su odstranjene centrifugiranjem na $11000 \text{ obr min}^{-1}$. Na taj način dobijen je potpuno providan koloidni rastvor sa nižim apsorpcionim pikom na UV-vidljivom spektru (slika 4.4.). Maksimum apsorbanca za početni koloidni rastvor je bio $0,87 \pm 0,03$ na talasnoj dužini od 413 nm dok je za razblaženi rastvor maksimalna apsorbanca bila $0,52 \pm 0,02$ izmerena na talasnoj dužini od 412 nm. Ovo smanjenje pika od oko 1,7 puta ukazuje na proporcionalno nižu koncentraciju nanočestica. Sa druge strane, primenom AAS izmerena je ukupna koncentracija srebra u koloidnom rastvoru od $4,36 \pm 0,28 \text{ mM}$, dok je posle centrifugiranja ta koncentracija iznosila $1,16 \pm 0,03 \text{ mM}$, što znači da se izmerena koncentracija srebra smanjila oko 4 puta. Ovi rezultati navode na zaključak da su sintezom u autoklavu dobijene nanočestice srebra ali i druge primese kao što su agregati, aglomerati ili čestice srebro-oksida koje su uklonjene centrifugiranjem uz taloženje i jednog dela nanočestica. Koloidni rastvor nakon centrifugiranja je analiziran primenom TEM mikroskopije. Dobijene su nanočestice srebra sfernog oblika dimenzija $17,4 \pm 6,1 \text{ nm}$ (slika 4.5).



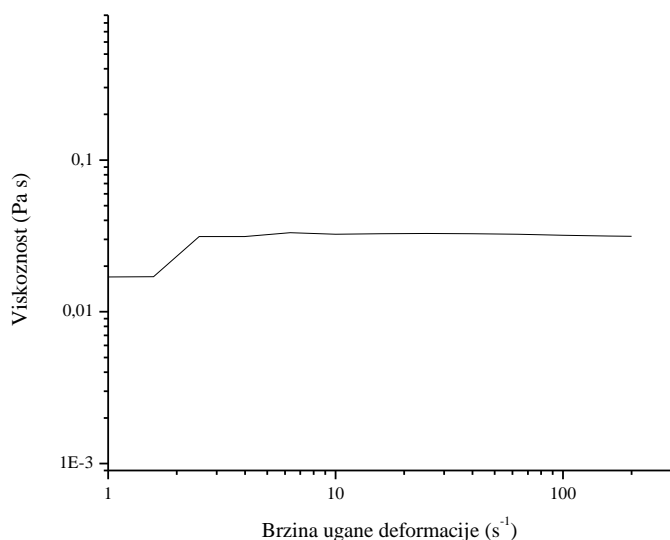
Slika 4.4. UV-vidljivi spektar Ag/alginatnih koloidnih rastvora nakon hidrotermalne sinteze sa nominalnom koncentracijom srebra od 4 mM i nakon centrifugiranja (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardne devijacije ($\leq 15\%$) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji)



Slika 4.5. Nanočestice srebra dobijene hidrotermalnom sintezom nakon centrifugiranja koloidnog rastvora: a) TEM mikrofotografija (razmernik: 100 nm), b) raspodela veličina nanočestica srebra

Uočeno je da je nakon hidrotermalne sinteze pa i centrifugiranja koloida, viskoznost koloidnog rastvora 2 mas. % alginata naglo opala. Izmerena je viskoznost 2 mas. % alginatnog rastvora nakon 5 h autoklaviranja pod pritiskom od 2 bara i na temperaturi od 100 °C i iznosila je oko 0,03 Pa s (slika 4.6). Viskoznost početnog 2 mas. %

alginatnog rastvora srednje viskoznosti na sobnoj temperaturi iznosi oko 2 Pa s (kao podatak dostupan od proizvođača za korišćeni alginat).



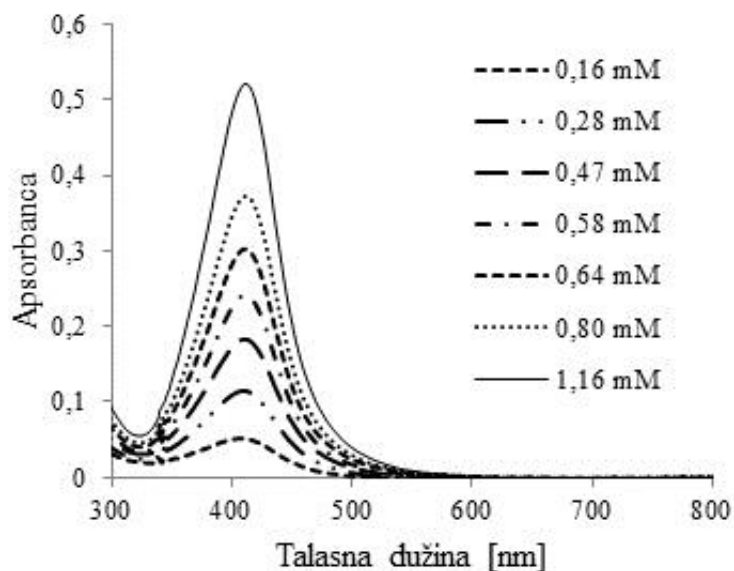
Slika 4.6. Viskoznost 2 mas. % rastvora alginata srednje viskoznosti nakon 5 h autoklaviranja na tempareturi od 100 °C i pritisku od 2 bara u zavisnosti od brzine ugaone deformacije

Viskoznost koloidnog rastvora je moguće povećati dodatnim razblaživanjem vodenim rastvorom natrijum-alginata veće viskoznosti.

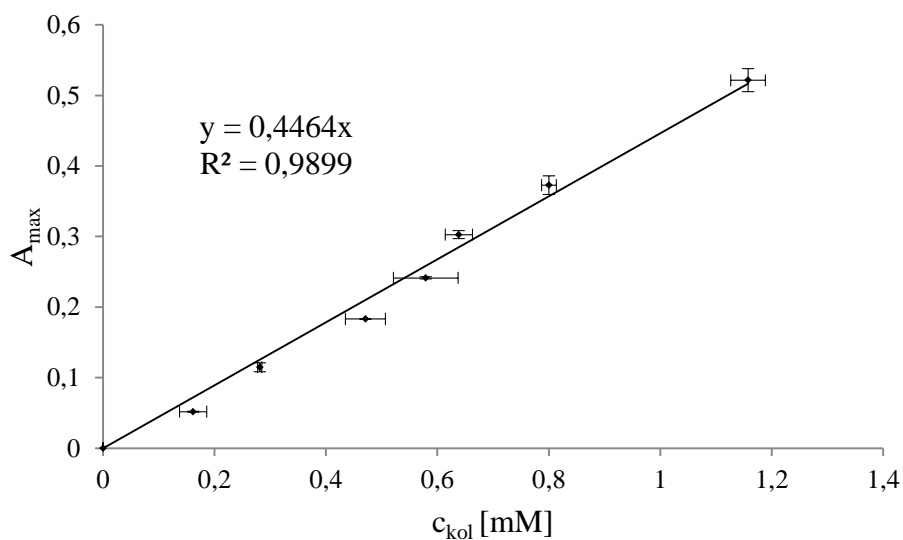
I u ovom slučaju je ispitana mogućnost povezivanja maksimalne apsorbance i koncentracije srebra za koloidne rastvore. I ovde je ukupna koncentracija srebra određena primenom AAS, a pretpostavljeno je da je došlo do potpune redukcije srebra u rastvoru.

Koloidni rastvor je razblažen 2 mas. % rastvorom autoklaviranog natrijum-alginata srednje viskoznosti kako bi se dobile različite koncentracije nanočestica srebra (slika 4.7).

Na slici 4.8. prikazana je zavisnost maksimalne apsorbance koja je bila na talasnim dužinama od 407 do 412 nm i ukupne koncentracije srebra.



Slika 4.7. UV – vidljivi spektri razblaženih koloidnih rastvora sintetisanih hidrotermalnom metodom sa različitim koncentracijama srebra određenih primenom AAS (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ($\leq 15\%$) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji)



Slika 4.8. Zavisnost maksimalne apsorbance UV-vidljivog spektra (A_{\max}) od ukupne koncentracije srebra u hidrotermalno sintetisanim koloidnim rastvorima izmerene primenom AAS (c_{kol})

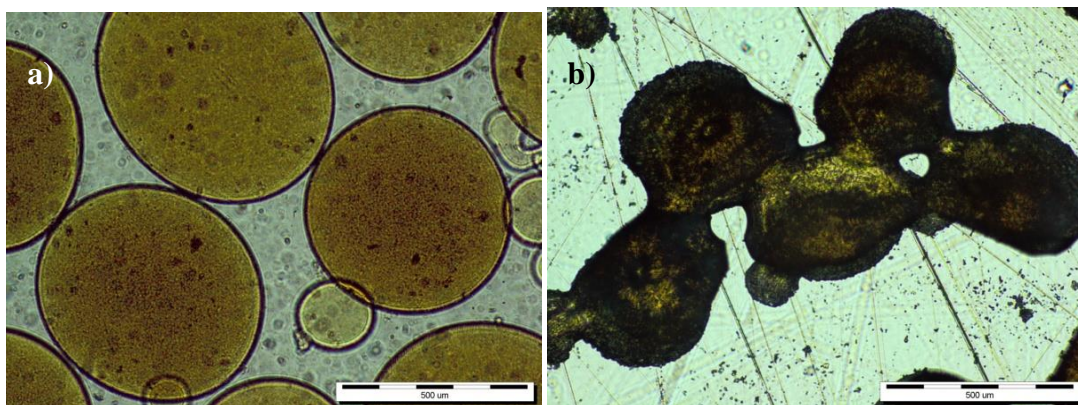
I u ovom slučaju je dobijeno dobro slaganje sa linearnom zavisnošću ($R^2 = 0,90$).

Pretpostavljajući potpunu redukciju srebra dobijena zavisnost se može primeniti za određivanje koncentracije nanočestica (c_n) iz očitane maksimalne apsorbanse (A_{max}):

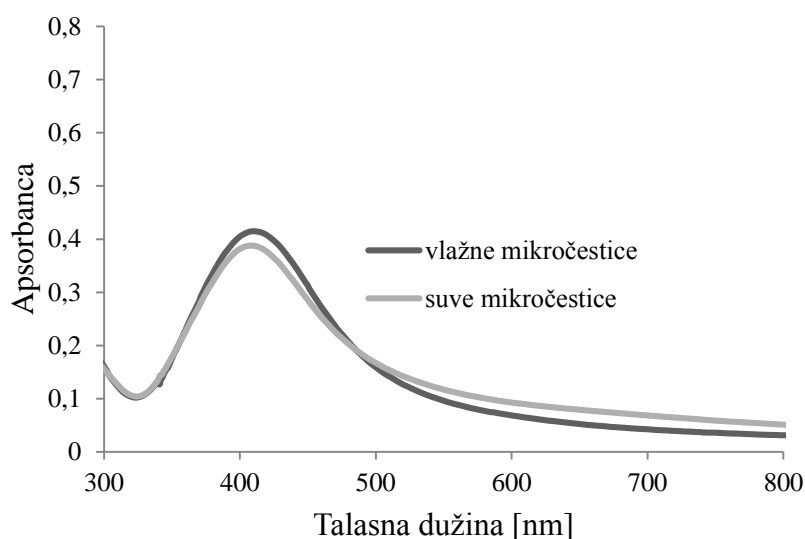
$$C_n = \frac{A_{max}}{0,446} \quad (3.2)$$

4.3. MIKROČESTICE DOBIJENE IZ KOLOIDNOG RASTVORA SINTETISANOG ELEKTROHEMIJSKOM METODOM

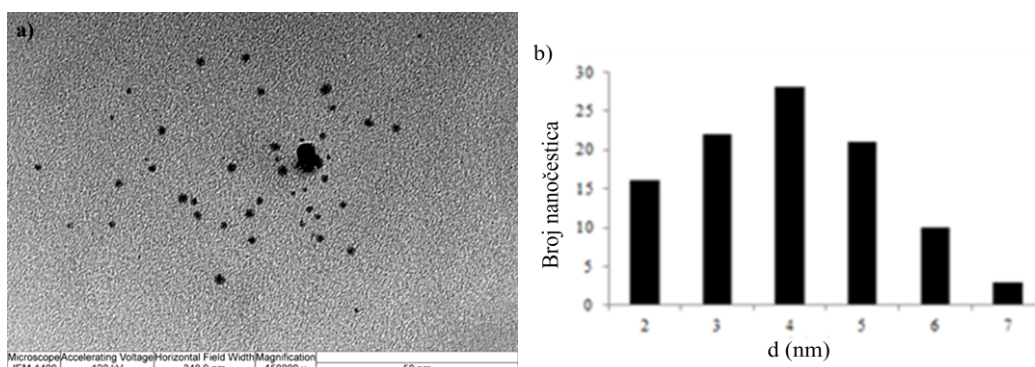
Od razblaženog koloida sintetisanog elektrohemijom, nominalne vrednosti 1 mM, moguće je napraviti Ag/alginate mikročestice elektrostatičkom ekstruzijom kao što je opisano u odeljku 3.3.1. Ove čestice je moguće i osušiti i tako dobiti u vidu praha u suvoj formi (slika 4.9.). Rastvaranjem vlažnih i suvih mikročestica određeni su njihovi UV-vidljivi spektri predstavljeni na slici 4.10. pri čemu su maksimalni apsorpcioni pikovi za vlažne i suve mikročestice iznosili $0,41 \pm 0,02$ na 410 nm i $0,39 \pm 0,07$ na 408 nm, redom. Tokom sušenja mikročestica, maksimalni apsorpcioni pik se smanjio za 6,6 % što ne predstavlja statistički značajnu razliku. Vlažne Ag/alginate mikročestice su rastvorene i primenom SEM analize određena je veličina nanočestica srebra od $3,9 \pm 1,3$ nm (slika 4.11).



Slika 4.9. Ag/alginate mikročestice: a) vlažne mikročestice ($570 \pm 60 \mu\text{m}$), b) suve mikročestice ($400 \pm 50 \mu\text{m}$) (razmernik: $500 \mu\text{m}$)



Slika 4.10. UV-vidljivi spektri rastvorenih vlažnih i suvih Ag/alginatnih mikročestica (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ($\leq 15\%$) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji)

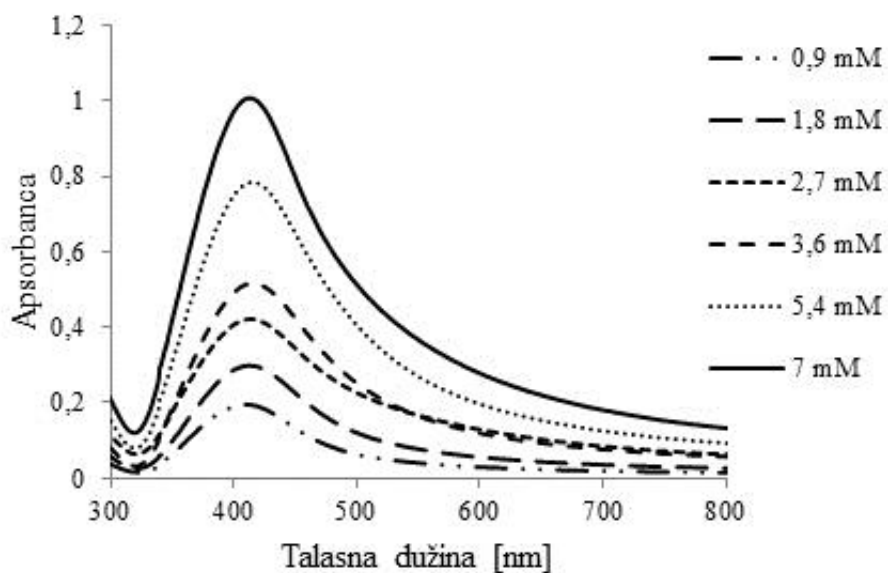


Slika 4.11. Nanočestice srebra u rastvorenim vlažnim Ag/alginatnim česticama: a) TEM mikrofotografija (razmernik: 100 nm), b) raspodela veličina nanočestica srebra

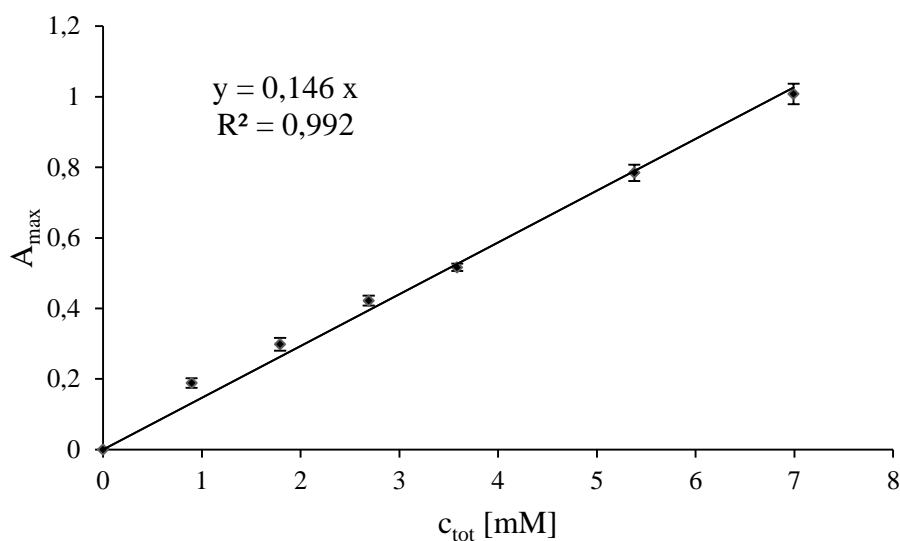
I u slučaju Ag/alginatnih mikročestica ispitana je mogućnost povezivanja maksimalne apsorbanca i koncentracije nanočestica. Pri tome je ukupna koncentracija srebra određena primenom AAS, a pretpostavljeno je da mikročestice sadrže nanočestice srebra kao jedini oblik srebra.

Koloidni rastvor je razblažen 1,73 mas. % rastvorom natrijum-alginata srednje viskoznosti kako bi se dobile različite koncentracije nanočestica srebra. Od ovih koloidnih rastvora napravljene su Ag/alginatne mikročestice koje su potom rastvorene

da bi se odredili UV-vidljivi spektri (slika 4.12). Na slici 4.13 prikazana je zavisnost maksimalne apsorbance rastvorenih mikročestica izmerena na talasnoj dužini od 410 nm i ukupne koncentracije srebra izmerene primenom AAS.



Slika 4.12. UV – vidljivi spektri rastvorenih Ag/alginatnih mikročestica sa različitim koncentracijama srebra određenih primenom AAS (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ($\leq 15\%$) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji)



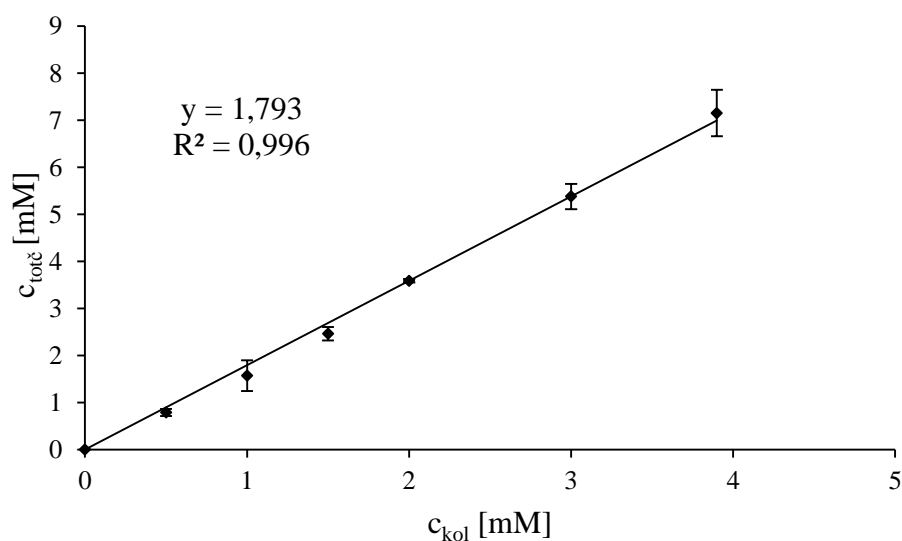
Slika 4.13. Zavisnost maksimalne apsorbance UV-vidljivog spektra od ukupne koncentracije srebra u rastvorenim Ag/alginatnim mikročesticama izmerene primenom AAS.

Sa slike 4.13 može se uočiti dobro slaganje sa linearnom zavisnošću ($R^2 = 0,992$).

Iz ove zavisnosti može se odrediti koncentracija nanočestica srebra u mikročesticama (c_n) u zavisnosti od maksimalne apsorbance (A_{max}) uz pretpostavku da početne mikročestice prikazane na slici 4.13 sadrže samo nanočestice:

$$C_n = \frac{A_{\text{max}}}{0,146} \quad (3.3)$$

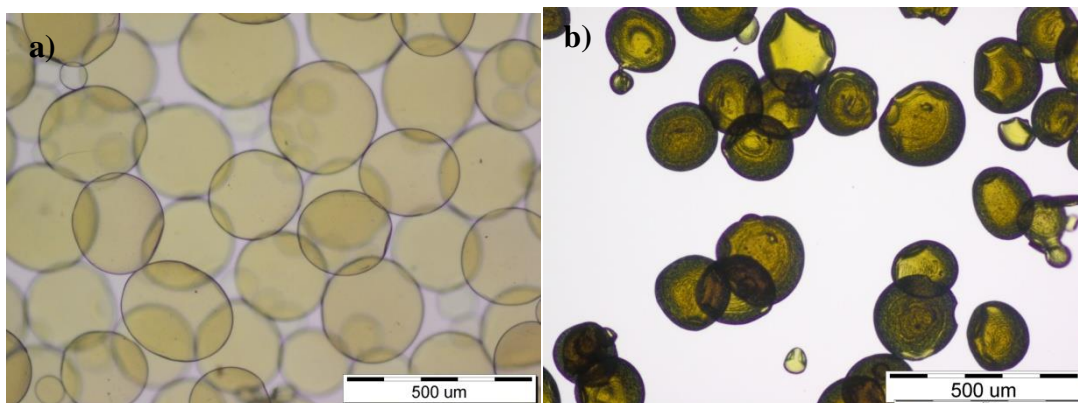
Ako se uporede koncentracije ukupnog srebra u rastvorenim mikročesticama i koloidnim rastvorima iz kojih su mikročestice dobijene može se uočiti da se dobije linearna zavisnost pri čemu je koncentracija srebra u mikročesticama za oko 80 % veća nego u odgovarajućim koloidnim rastvorima (slika 4.14).



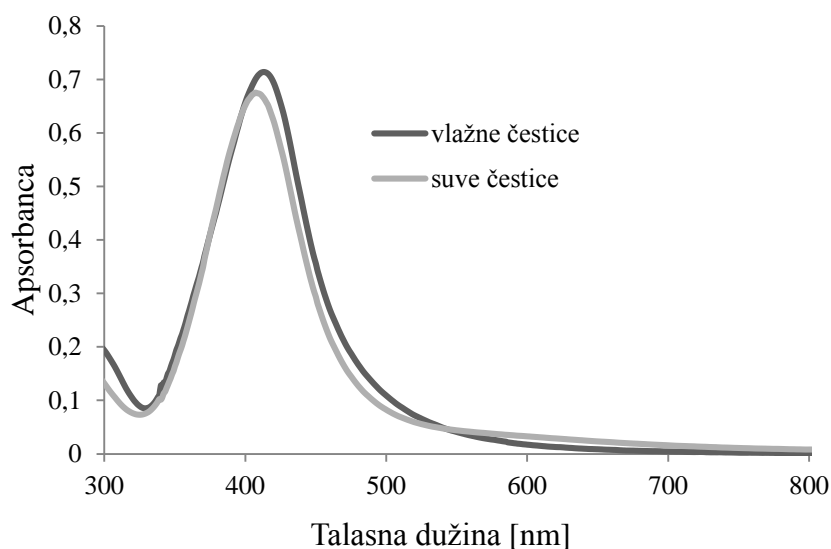
Slika 4.14. Zavisnost ukupne koncentracije srebra u Ag/alginatnim mikročesticama od ukupne koncentracije srebra u koloidnim rastvorima iz kojih su dobijene mikročestice

4.4. MIKROČESTICE DOBIJENE IZ KOLOIDNOG RASTVORA SINTETISANOG HIDROTERMALNOM METODOM

Elektrostatičkom ekstruzijom koloidnog rastvora sintetisanog hidrotermalnom metodom dobijaju se Ag/alginatne mikročestice (slika 4.15) koje su sitnije od čestica napravljenih od koloidnog rastvora srednje viskoznosti sa elektrohemijski sintetisanim nanočesticama srebra iako se elektrostatička ekstruzija obavljala pod istim uslovima ($260 \pm 30 \mu\text{m}$ i $570 \pm 60 \mu\text{m}$, redom). Samim tim i suve Ag/alginatne mikročestice su bile manjih dimenzija ($190 \pm 20 \mu\text{m}$ i $400 \pm 50 \mu\text{m}$, redom), slike 4.9 i 4.15 redom. Spektar rastvorenih mikročestica dobijenih hidrotermalnom metodom je predstavljen na slici 4.16. gde se može uočiti maksimalna apsorbanca rastvorenih vlažnih mikročestica od $0,71 \pm 0,07$ na 414 nm i maksimalna apsorbanca rastvorenih suvih mikročestica $0,68 \pm 0,08$ na 408 nm. Pri tome je primenom AAS izmerena ukupna koncentracija srebra od $1,22 \pm 0,10$ mM. Tokom sušenja mikročestica, dolazi do neznatnog smanjenja maksimalnog apsorpcionog pika za 5,4 % u odnosu na apsorpcioni pik rastvorenih vlažnih Ag/alginatnih mikročestica (slika 4.16).



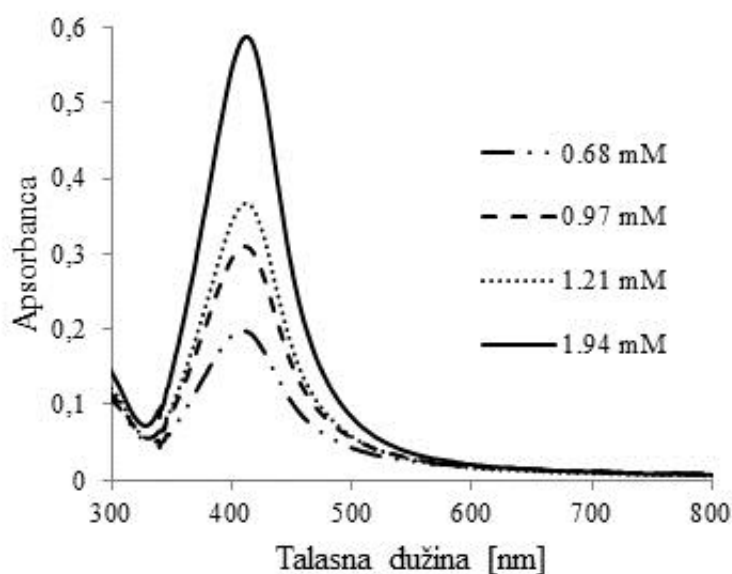
Slika 4.15. Ag/alginate mikročestice dobijene iz koloidnog rastvora sintetisanog hidrotermalnom metodom: a) vlažne mikročestice ($260 \pm 30 \mu\text{m}$), b) suve mikročestice ($190 \pm 20 \mu\text{m}$)



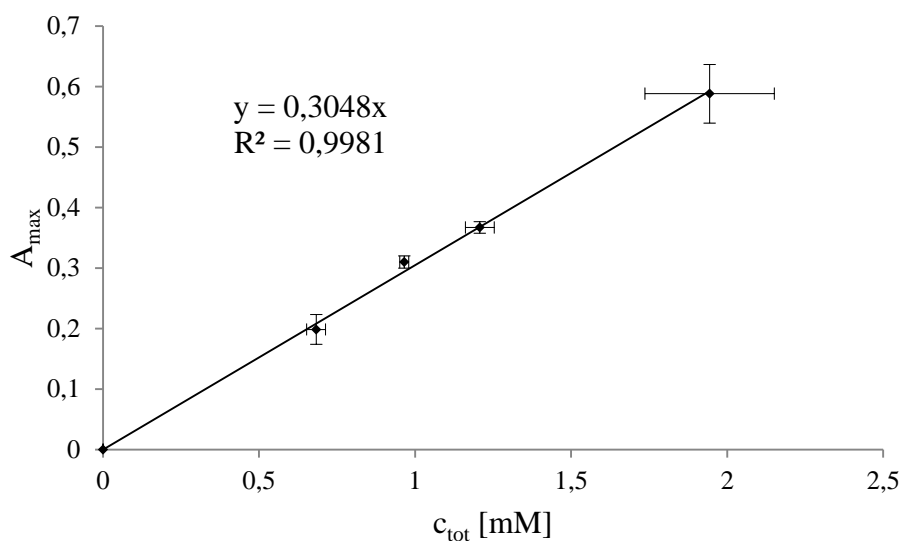
Slika 4.16. UV-vidljivi spektri rastvorenih vlažnih i suvih Ag/alginatnih mikročestica dobijenih iz koloidnog rastvora sintetisanog hidrotermalnom metodom (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ($\leq 15\%$) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji)

I u ovom slučaju ispitana je mogućnost povezivanja koncentracije nanočestica srebra i maksimalne apsorbance UV – vidljivog spektra. Pri tome je ukupna koncentracija srebra određena primenom AAS, a i ovde je pretpostavljeno da su u mikročesticama prisutne samo nanočestice srebra kao jedini oblik srebra.

Koloidni rastvor je razblažen 2 mas. % rastvorom autoklaviranog natrijum-alginata srednje viskoznosti kako bi se dobile različite koncentracije nanočestica srebra. Od ovih koloidnih rastvora napravljene su Ag/alginatne mikročestice koje su potom rastvorene da bi im se odredio UV-vidljivi spektar (slika 4.17). Na slici 4.18 prikazana je zavisnost maksimalne apsorbance rastvorenih mikročestica koja je bila na talasnoj dužini u opsegu od 406 do 413 nm i ukupne koncentracije srebra određene primenom AAS.



4.17. UV – vidljivi spektri rastvorenih Ag/alginatnih mikročestica sa različitim koncentracijama srebra određenih primenom AAS (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ($\leq 15\%$) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji)



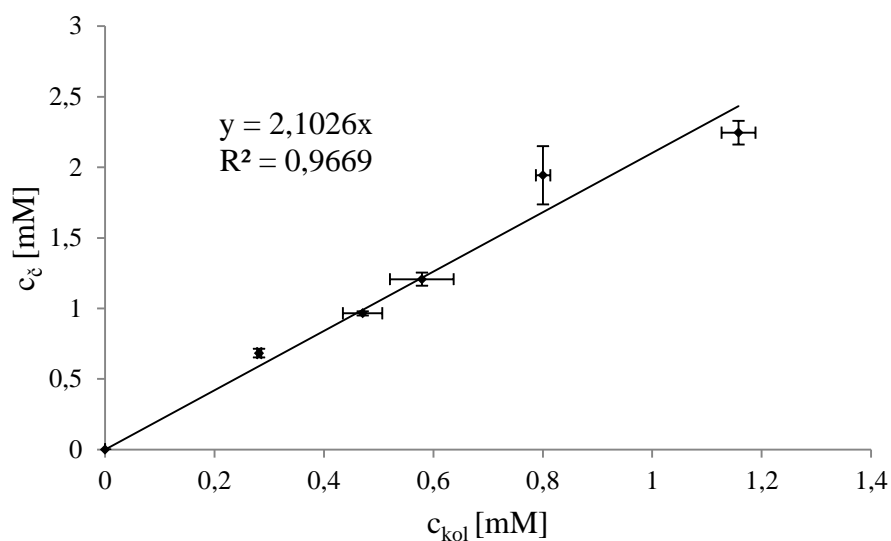
Slika 4.18. Zavisnost maksimalne apsorbance UV-vidljivog spektra od ukupne koncentracije srebra u rastvorenim Ag/alginatnim mikročesticama izmerene primenom AAS.

Sa slike 4.18 uočava se dobro slaganje sa linearnom zavisnošću ($R^2 = 0,998$)

Iz ove zavisnosti se i u ovom slučaju može odrediti koncentracija nanočestica srebra (c_n) u Ag/alginatnim mikročesticama na osnovu izmerene maksimalne apsorbance, A_{max} :

$$C_n = \frac{A_{max}}{0,304} \quad (3.4)$$

Poređenje ukupne koncentracije srebra u rastvorenim mikročesticama i koloidnim rastvorima iz kojih su mikročestice dobijene je prikazano na slici 4.19 gde se može uočiti linearna zavisnost pri čemu je koncentracija srebra u mikročesticama za oko dva puta veća nego u odgovarajućim koloidnim rastvorima.



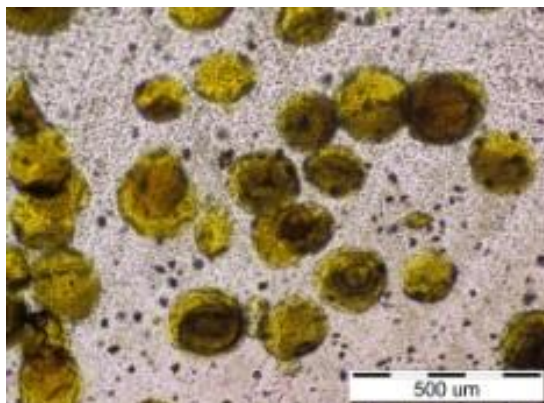
Slika 4.19. Zavisnost ukupne koncentracije srebra u Ag/alginatnim mikročesticama od ukupne koncentracije srebra u koloidnim rastvorima iz kojih su dobijene mikročestice

4.5. PLA KOMPOZITNI FILMOVI

Mešanjem suvih Ag/alginatnih mikročestica i rastvora PLA, a zatim sušenjem, dobijeni su PLA kompozitni filmovi sa inkorporisanim suvim Ag/alginatnim mikročesticama.

4.5.1. Optička mikroskopija PLA kompozitnih filmova

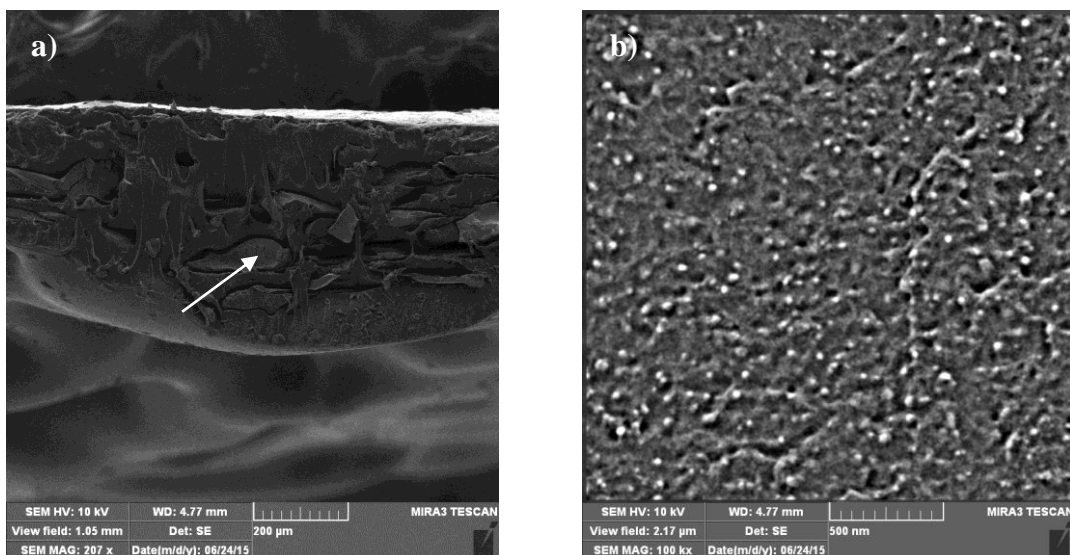
Na slici 4.20 je prikazana mikrofotografija jednog PLA kompozitnog filma koji je dobijen polazeći od vlažnih Ag/alginatnih mikročestica dobijenih iz koloidnih rastvora sintetisanog hidrotermalnom metodom, ($260 \pm 30 \mu\text{m}$). Ove mikročestice su osušene do konstantne mase pri čemu su dobijene suve mikročestice prečnika $190 \pm 20 \mu\text{m}$ koje su zatim pomešane sa polimernim rastvorom PLA u hloroformu. Nakon sušenja dobijen je kompozitni film i prečnik mikročestica je bio $180 \pm 20 \mu\text{m}$ (slika 4.20.).



Slika 4.20. Optička mikrofotografija PLA kompozitnog filma na kojoj se uočavaju Ag/alginatne mikročestice (razmernik: 500 μm)

4.5.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija PLA kompozitnih filmova

Primenom skenirajuće elektronske mikroskopije na preseke PLA kompozitnih filmova analizirana je struktura filmova i inkorporisanih Ag/alginatnih mikročestica (slika 4.21). Na poprečnom preseku filmova lako se uočavaju Ag/alginatne mikročestice (slika 4.21 a) dok se na većim uvećanjima unutar mikročestica uočavaju nanočestice srebra veličina u opsegu od 5 – 40 nm (slika 4.21 b).

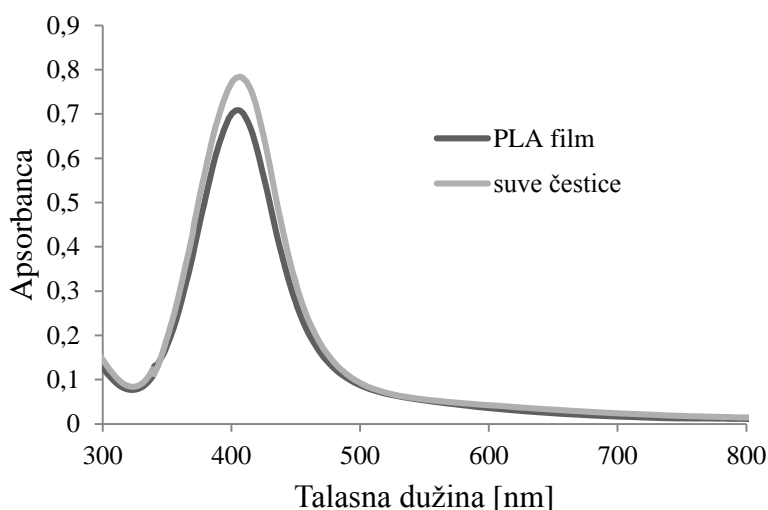


Slika 4.21. SEM mikrofotografije: a) poprečnog preseka PLA kompozitnog filma (razmernik 200 μm) i b) poprečnog preseka suve Ag/alginatne mikročestice unutar PLA filma (razmernik 500 μm)

4.5.3. Uv-vidljiva spektroskopija

PLA kompozitni filmovi sa Ag/alginatnim mikročesticama su rastvoreni u hloroformu kako bi došlo do rastvaranja PLA polimera dok su mikročestice ostale nerastvorne. Rastvor je zatim uklonjen, a mikročestice su rastvorene u 2 mas. % rastvoru Na-citrata. Na slici 4.22 prikazani su apsorpcioni spektri ovako rastvorenih mikročestica iz filma dimenzija 2 cm x 3 cm i polaznih rastvorenih suvih mikročestica (10 mg). Uočava se da su spektri gotovo identični sa približnim vrednostima maksimuma apsorbanca što ukazuje na sličnu količinu mikročestica u filmu. Obzirom da je u 64 cm² stavljeno 0,1 g mikročestica, može se očekivati da će 6 cm² filma sadržati 10 mg suvih mikročestica.

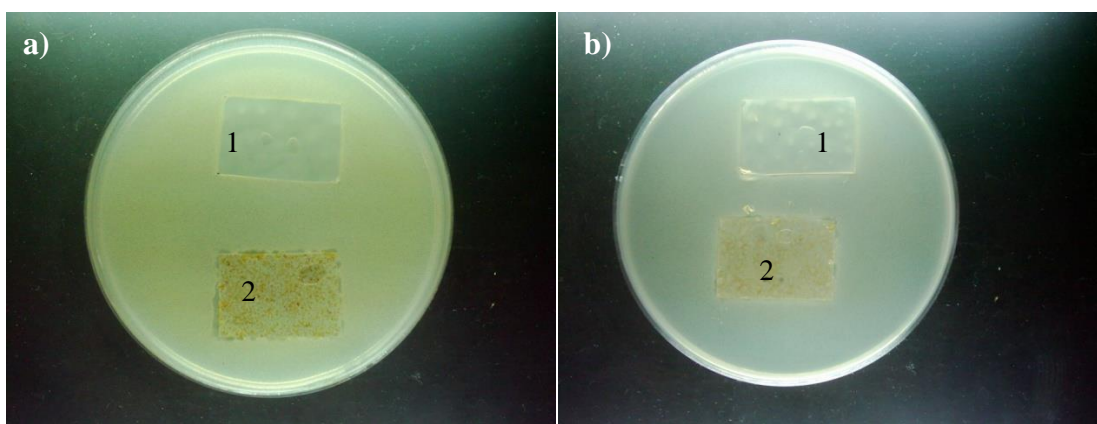
Maksimalni apsorpcioni pik za PLA kompozitni film je bio $0,71 \pm 0,01$ na 405 nm, a za suve Ag/alginate mikročestice $0,78 \pm 0,02$ na 407 nm. Određena je i koncentracija ukupnog srebra u PLA filmovima primenom AAS koja je iznosila $0,020 \pm 0,001$ mas. %.



Slika 4.22. UV-vidljivi spektar rastvorenih polaznih suvih Ag/alginatnih mikročestica (10 mg) i rastvorenog PLA kompozitnog filma dimenzija 2 cm x 3 cm (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije (≤ 15 %) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji)

4.5.4. Antibakterijska aktivnost PLA kompozitnih filmova

Antimikrobna aktivnost PLA kompozitnih filmova je ispitivana agar-difuzionim testom na dva soja bakterija: *E. coli* i *S. aureus*. Na soju *S. aureus* je uočena inhibiciona zona od 1-2 mm oko PLA kompozitnog filma što pokazuje doduše slabo, ali uočljivo antimikrobno dejstvo (slika 4.23 a). Sa druge strane, nije primećen nikakav efekat PLA kompozitnog filma na soj *E. coli*, ukazujući da je otpuštena koncentracija srebra difundovala iz ovih filmova očigledno bila preniska da bi ispoljila antimikrobni efekat i uticala na ovaj soj bakterija (slika 4.23 b).



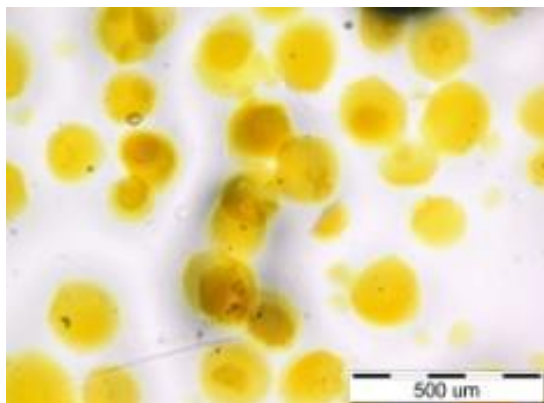
Slika 4.23. Agar difuzioni test PLA kompozitnih filmova na dva soja bakterija: a) *S. aureus* b) *E. coli*; (1) kontrolni PLA film i (2) PLA kompozitni film

4.6. PVA KOMPOZITNI FILMOVI

Mešanjem suvih Ag/alginatnih mikročestica i rastvora PVA, a zatim sušenjem, dobijeni su PVA kompozitni filmovi sa inkorporisanim suvim Ag/alginatnim mikročesticama.

4.6.1. Optička mikroskopija PVA kompozitnih filmova

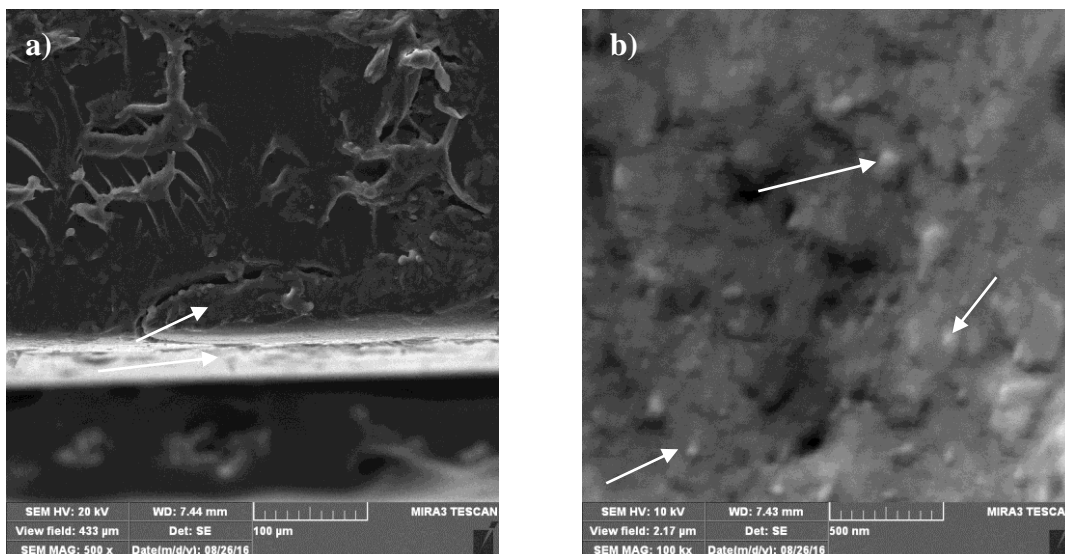
Na slici 4.24 prikazana je optička mikrofotografija PVA kompozitnog filma dobijenog polazeći od iste šarže osušenih Ag/alginatnih mikročestica ($190 \pm 20 \mu\text{m}$) kao u slučaju PLA kompozitnih filmova. Suve mikročestice su pomešane sa vodenim rastvorom PVA i nakon sušenja je dobijen kompozitni film sa mikročesticama prečnika $170 \pm 20 \mu\text{m}$ (slika 4.24.).



Slika 4.24. Optička mikrofotografija PVA kompozitnog filma na kojoj se uočavaju Ag/alginatne mikročestice (razmernik: 500 μm)

4.6.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija PVA kompozitnih filmova

Primenom skenirajuće elektronske mikroskopije na preseke PVA kompozitnih filmova analizirana je struktura filmova i inkorporisanih Ag/alginatnih mikročestica (slika 4.25). I ovde se mogu uočiti inkorporisane mikročestice (slika 4.25 a) dok se pri većim uvećanjima mogu uočiti nanočestice srebra unutar mikročestica (slika 4.25 b) ali njihovu veličinu nije bilo moguće odrediti jer su nanočestice bile zaklonjene polimerom.

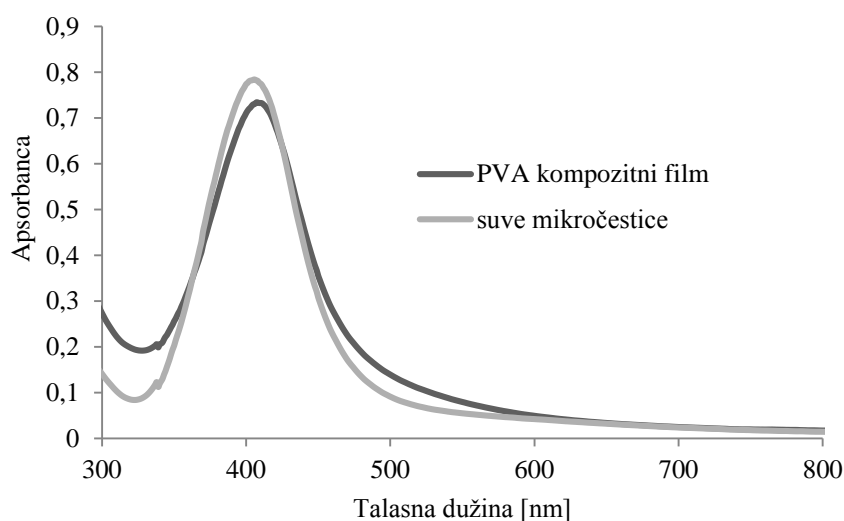


Slika 4.25. SEM mikrofotografije: a) poprečnog preseka PVA kompozitnog filma gde strelica označava Ag/alginatne mikročestice unutar filma (razmernik: 100 μm) i b) poprečnog preseka suve Ag/alginatne mikročestice unutar PVA filma gde strelice označavaju nanočestice (razmernik 500 nm)

4.6.3. Uv-vidljiva spektroskopija

PVA kompozitni filmovi sa Ag/alginatnim mikročesticama su rastvoreni u 2 mas. % rastvoru Na-citarta na 70 °C kako bi se ceo film rastvorio. I u ovom slučaju kao i kod PLA kompozitnih filmova na slici 4.26 prikazani su apsorpcioni spektri ovako rastvorenih mikročestica iz filma dimenzija 2 cm x 3 cm i polaznih rastvorenih suvih mikročestica (10 mg). Uočava se da su spektri gotovo identični sa približnim vrednostima maksimuma apsorbanace što ukazuje na sličnu količinu mikročestica u filmu. Obzirom da je u 64 cm^2 stavljeno 0,1 g mikročestica, može se očekivati da će 6 cm^2 filma sadržati 10 mg suvih mikročestica.

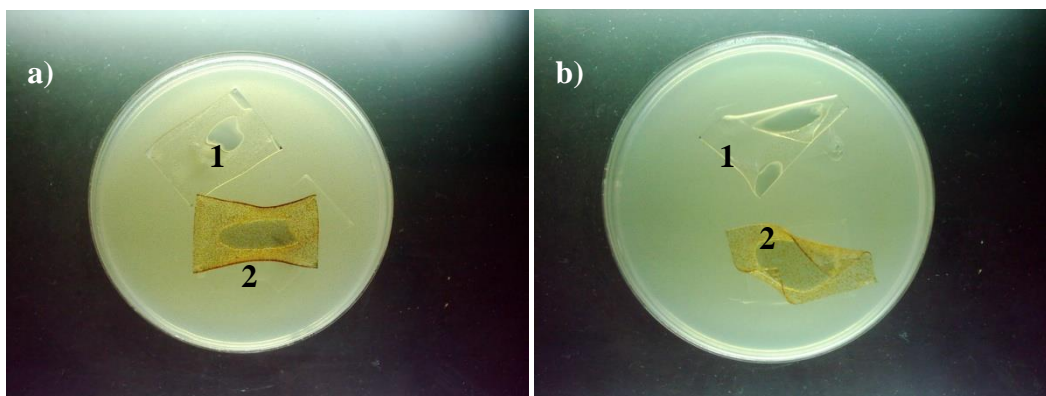
Maksimalni apsorpcioni pik za PVA kompozitni film je bio $0,73 \pm 0,04$ na 408 nm, a za suve Ag/alginatne mikročestice $0,78 \pm 0,02$ na 407 nm. Određena je i koncentracija ukupnog srebra u PVA filmovima primenom AAS koja je iznosila $0,020 \pm 0,001$ mas. %



Slika 4.26. UV-vidljivi spektar rastvorenih polaznih suvih Ag/alginatnih mikročestica (10 mg) i rastvorenog PLA kompozitnog filma dimenzija 2 cm x 3 cm (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ($\leq 15\%$) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji)

4.6.4. Antibakterijska aktivnost PVA kompozitnih filmova

Antimikrobna aktivnost PVA kompozitnih filmova je kao i u slučaju PLA kompozitnih filmova ispitivana agar-difuzionim testom na dva soja bakterija: *S. aureus* i *E. coli*. Ni na jednom od ova dva soja bakterija nije uočen nikakav antibakterijski efekat filmova (slika 4.27). Ne može se tvrditi da ovi filmovi nemaju antibakterijsku aktivnost pošto su usled vlage nabubrela i izvili su se pa nije bilo moguće tačno odrediti površinu filma kojoj je agar bio izložen.



Slika 4.27. Agar difuzioni test PVA kompozitnih filmova na dva soja bakterija: a) *S. aureus* b) *E. coli*; (1) kontrolni PVA film i (2) PVA kompozitni film

4.7. ISPITIVANJE KINETIKE OTPUŠTANJA SREBRA IZ KOMPOZITNIH MATERIJALA SA NANOČESTICAMA SREBRA

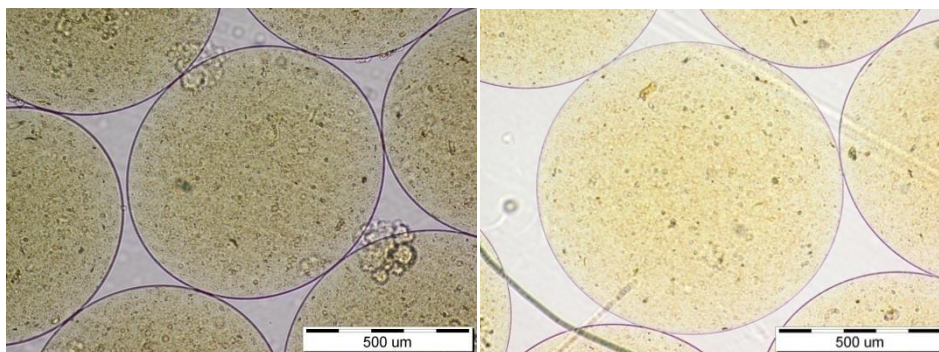
4.7.1. Kinetika otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih mikročestica proizvedenih iz koloidnog rastvora dobijenog elektrohemijском metodom korišćenjem alginata srednje viskoznosti

U prvoj eksperimentalnoj seriji praćena je kinetika otpuštanja srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica u statičkim uslovima u dH₂O, a potom i u uslovima mešanja u vodenom kupatilu kako bi se utvrdilo da li i koliko brzina prenosa mase sa čestica ima uticaj na ukupnu brzinu otpuštanja srebra iz vlažnih mikročestica. U drugoj eksperimentalnoj seriji praćena je kinetika otpuštanja srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica u fiziološkom rastvoru takođe u statičkim uslovima i uslovima sa mešanjem kako bi se odredio uticaj Cl⁻ jona prisutnim u svim telesnim tečnostima na otpuštanje srebra. U trećoj eksperimentalnoj seriji praćena je kinetika otpuštanja srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica u fiziološki rastvor kako bi ispitali efekat naglog bubrenja čestica pa tako i otpuštanja srebra i njegove reakcije sa jonima hlora. Sve čestice su napravljene od koloida sintetisanog elektrohemijском metodom, a koncentracije nanočestica u mikročesticama su određene primenom UV-vidljive spektroskopije i zavisnosti koncentracije nanočestica od maksimalne apsorbance, jednačina (3.3). Na taj način je bilo moguće pratiti kinetiku nestajanja nanočestica srebra unutar Ag/alginatnih mikročestica na osnovu smanjenja maksimalne apsorbance.

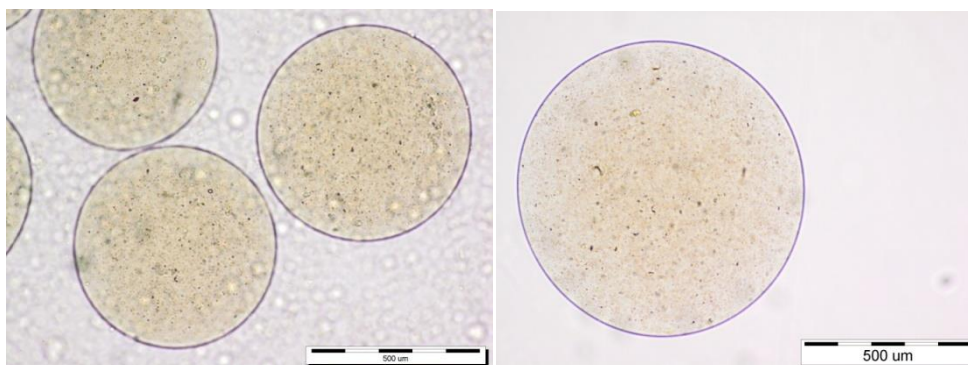
4.7.1.1. *Otpuštanje srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica u dH₂O u statičkim uslovima i u uslovima mešanja u vodenom kupatilu*

Početne koncentracije nanočestica srebra u Ag/alginatnim mikročesticama su bile $2,44 \pm 0,13$ mM i $2,28 \pm 0,10$ mM u statičkim uslovima i u vodenom kupatilu, redom, određene na osnovu maksimalne apsorbance rastvorenih mikročestica i primenom jednačine 3.3. Vlažne Ag/alginate mikročestice su otpustile veoma malu količinu srebra tako da su izmerene koncentracije u vodi od $14,8 \pm 0,8$ μ M i $22,1 \pm 1,5$ μ M nakon 21 dana u statičkim uslovima i u vodenom kupatilu, redom. Ove koncentracije odgovaraju 1,3 % i 2,1 % od ukupne početne količine srebra u mikročesticama. Uz to, Ag/alginate mikročestice u vodi nisu značajno bubrile i povećanje prečnika mikročestica je bilo do 10 % odnosno, od 780 ± 40 do 880 ± 50 μ m u statičkim uslovima, kao i u vodenom kupatilu od 630 ± 50 μ m do 790 ± 70 μ m posle 21-og dana (slika 4.28.). Trebalo bi dodati da se nanočestice srebra nisu mogle detektovati u vodi koristeći UV-vidljivu spektroskopiju. Sa druge strane, nanočestice srebra unutar mikročestica su ostale prilično stabilne uz delimičnu agregaciju što je dovelo do blagog smanjenja maksimalne apsorbance (za oko 30 % i 15 % u statičkim uslovima i u uslovima mešanja, redom) (slika 4.29.).

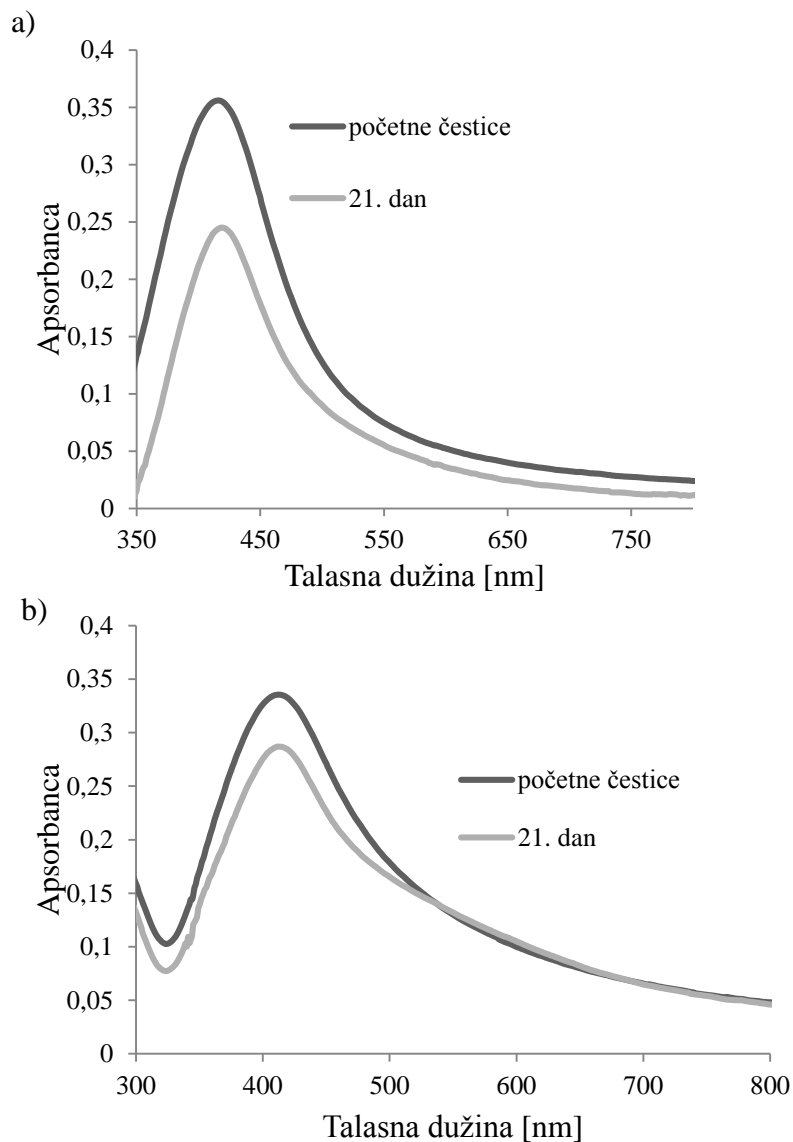
a)



b)

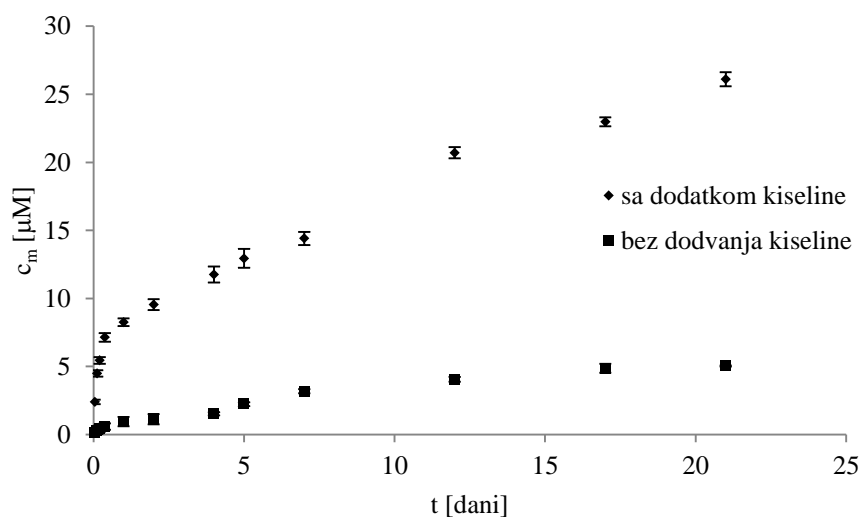


Slika 4.28. Vlažne Ag/alginatne mikročestice na početku (levo) i nakon 21-og dana (desno) u vodi na 37 °C: a) u statičkim uslovima, b) u vodenom kupatilu (razmernik: 500 µm)

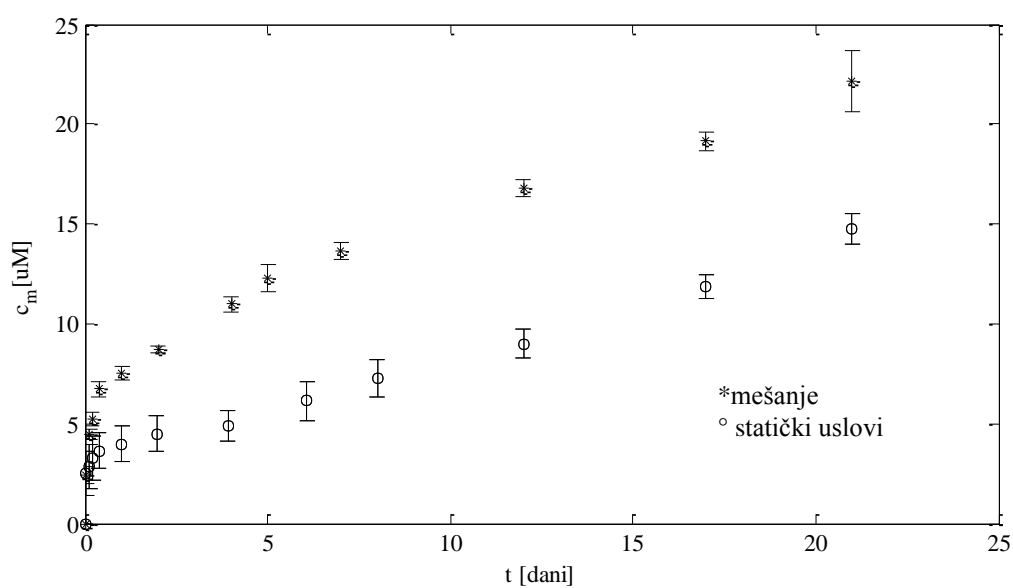


Slika 4.29. Uv-vidljivi spektri početnih rastvorenih vlažnih Ag/alginatnih mikročestica i nakon 21-og dana na 37 °C: a) u statičkim uslovima i b) vodenom kupatilu

Interesantno je da su merenjem koncentracije otpuštenog srebra u vodi primenom AAS sa i bez dodatka azotne kiseline u vodu dobijene različite vrednosti (slika 4.30). Veće vrednosti pri dodatku kiseline ukazuju na postojanje zaostalih formi srebra u vodi koje nisu u jonskom obliku. Na osnovu ovih vrednosti je stoga određena kinetika otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih mikročestica u vodu u statičkim uslovima i uslovima sa mešanjem (slika 4.31.).



Slika 4.30. Koncentracija otpuštenog srebra iz Ag/alginatnih mikročestica u vodi tokom vremena u vodenom kupatilu određena primenom AAS pri čemu su uzorci direktno mereni ili je dodavana azotna kiselina

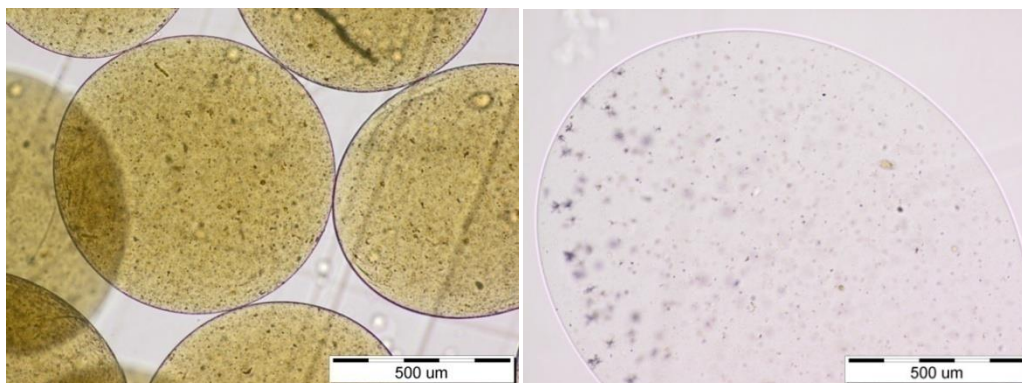


Slika 4.31. Koncentracije otpuštenog srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica u vodi (c_m) u statičkim uslovima i u vodenom kupatilu sa mešanjem na 37 °C u toku vremena

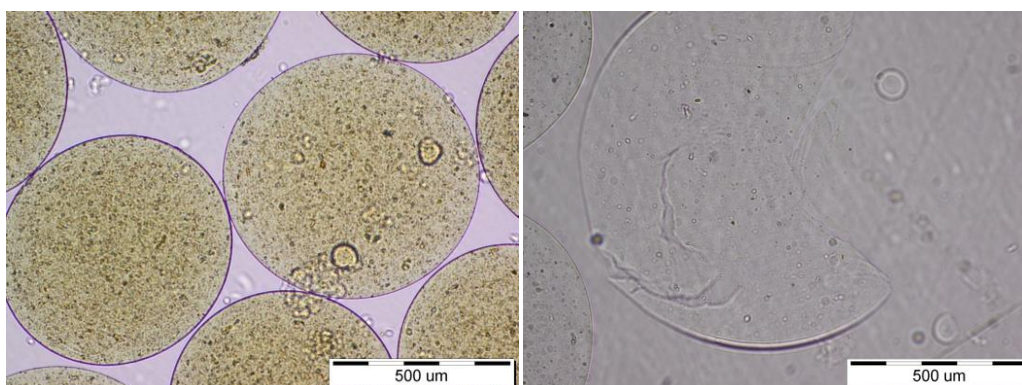
4.7.1.2. *Otpuštanje srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica u fiziološkom rastvoru u statičkim uslovima i uslovima mešanja u vodenom kupatilu*

Otpuštanje srebra u fiziološkom rastvoru je složen proces praćen oksidacijom nanočestica srebra unutar alginatnih mikročestica uz formiranje AgCl soli i drugih oblika $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ formi kao što je objašnjeno u literaturi (Levard i sar., 2013). Stajanjem u fiziološkom rastvoru Ag/alginate mikročestice su promenile boju iz žute u mlečno belu kao što je prikazano na slici 4.32 verovatno zbog formiranja AgCl soli unutar mikročestica. Vlažne mikročestice su nakon prvog sata od inkubacije naglo nabubrele u fiziološkom rastvoru od veličine od $790 \pm 60 \mu\text{m}$ do $1160 \pm 110 \mu\text{m}$ u statičkim uslovima i od $680 \pm 50 \mu\text{m}$ do $960 \pm 60 \mu\text{m}$ u uslovima mešanja u vodenom kupatilu (slika 4.33). U statičkim uslovima, veličina čestica dostignuta nakon prvog sata je zatim ostala konstantna svih 7 dana, dok su u vodenom kupatilu nakon 4 dana mikročestice počele da pucaju i da se raspadaju. Početna koncentracija nanočestica srebra u vlažnim mikročesticama je bila u statičkim uslovima i u uslovima sa mešanjem $2,20 \pm 0,07 \text{ mM}$ i $2,40 \pm 0,20 \text{ mM}$, redom. Ove koncentracije su određene na osnovu UV-vidljive spektroskopije i primenom jednačine (3.3). Koncentracija nanočestica srebra unutar Ag/alginatnih mikročestica se tokom stajanja u fiziološkom rastvoru konstantno smanjivala tokom vremena na osnovu merenja maksimalne apsorbanse što zbog difuzije nanočestica srebra iz alginatne matrice, što zbog oksidacije nanočestica srebra i reakcije sa jonima hlora (slika 4.34). Preko zavisnosti predstavljene jednačinom (3.3) izračunate su koncentracije nanočestica srebra u mikročesticama na osnovu izmerenih apsorpcionih maksimuma (slika 4.35). Koncentracija ukupno otpuštenog srebra u statičkim uslovima i u uslovima mešanja u vodenom kupatilu nakon 3 dana je bila $0,18 \pm 0,12 \text{ mM}$ i $0,15 \pm 0,11 \text{ mM}$, redom što predstavlja oko 16 % od početne količine srebra u mikročesticama. Treba primetiti da su koncentracije otpuštenog srebra u fiziološkom rastvoru bile za red veličine veće od koncentracija otpuštenog srebra u destilovanoj vodi (slike 4.31 i 4.36 redom).

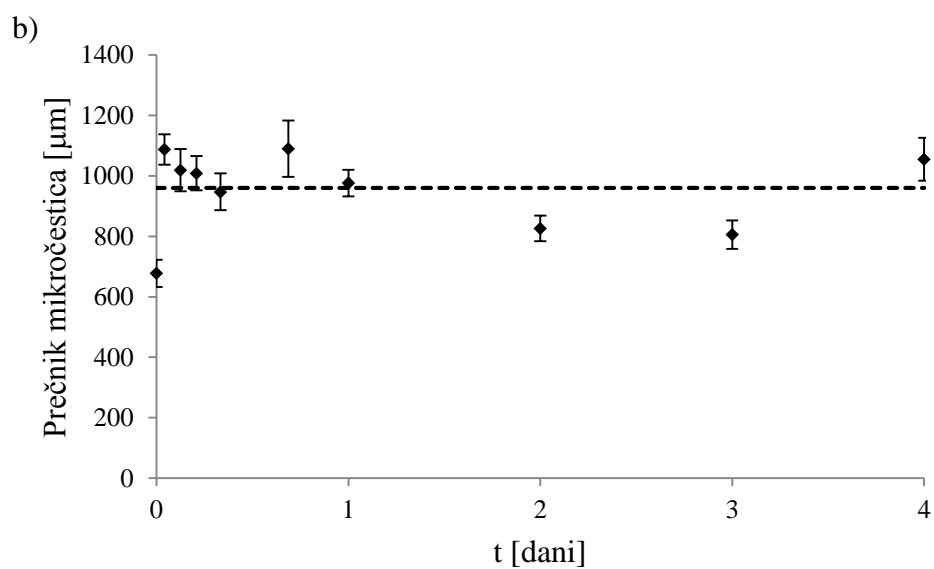
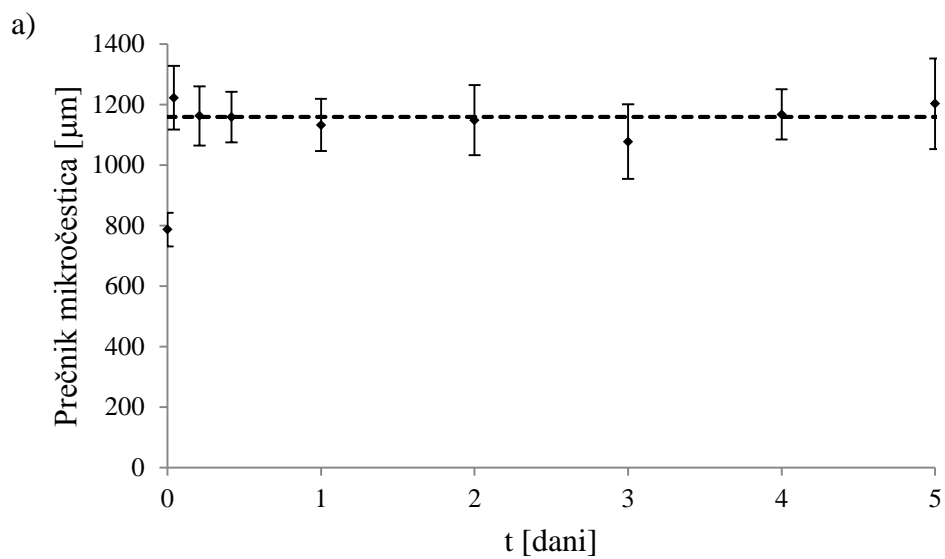
a)



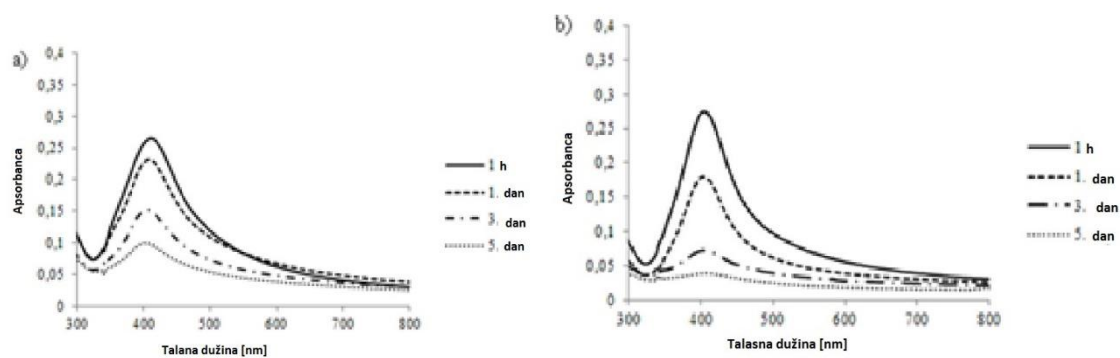
b)



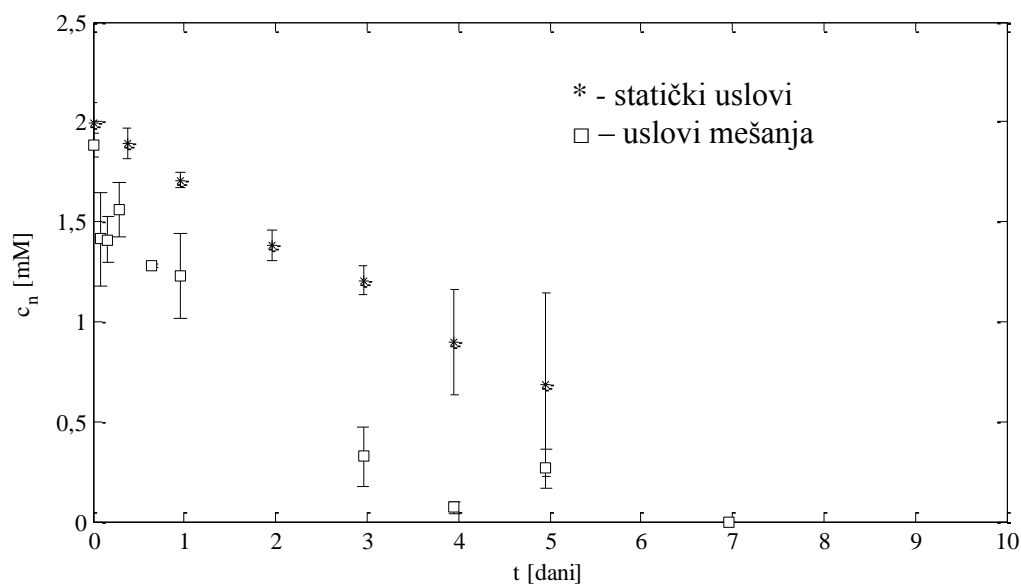
Slika 4.32. Vlažne Ag/alginate mikročestice na početku (levo) i nakon 7 dana (desno):
a) u statičkim uslovima, b) usled mešanja u vodenom kupatilu (razmernik: 500 μm)



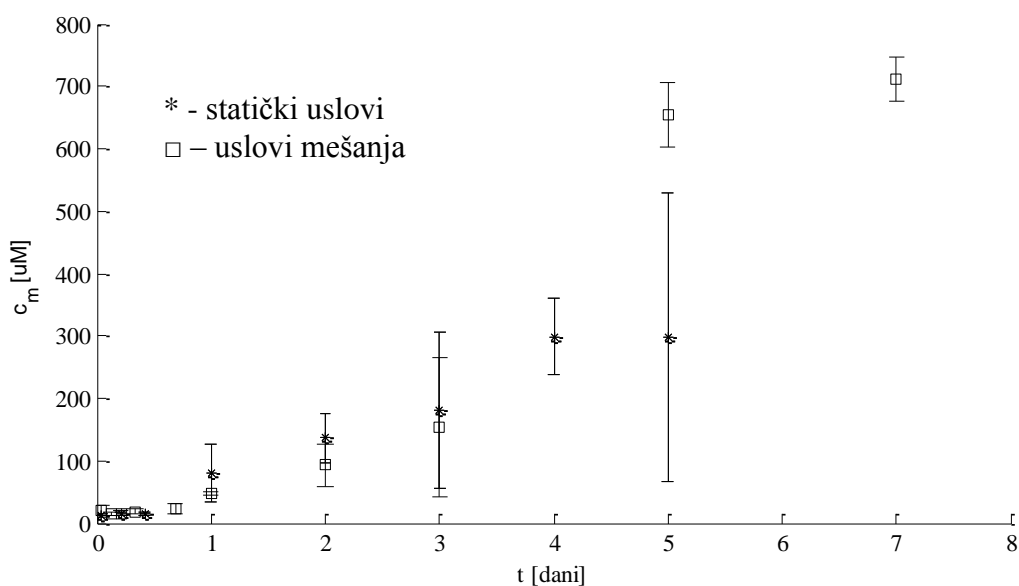
Slika 4.33. Prečnici Ag/alginatnih mikročestica u fiziološkom rastvoru u na 37 C: a) u statičkim uslovima, b) u uslovima mešanja u vodenom kupatilu (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja)



Slika 4.34. UV-vidljivi spektri rastvorenih vlažnih Ag/alginatnih mikročestica tokom vremena u fiziološkom rastvoru na 37 °C u: a) statičkim uslovima; b) uslovima sa mešanjem (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ($\leq 15\%$) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji)



Slika 4.35. Koncentracija nanočestica srebra (c_n) u vlažnim Ag/alginatnim mikročesticama u fiziološkom rastvoru u statičkim uslovima i u uslovima mešanja u vodenom kupatilu na 37 °C (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja)

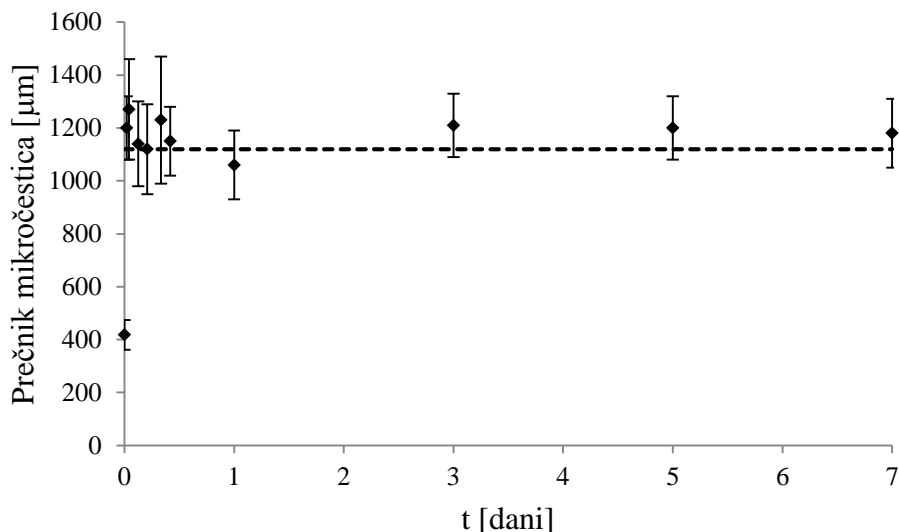


Slika 4.36. Koncentracije otpuštenog srebra (c_m) iz Ag/alginatnih mikročestica u fiziološki rastvor na 37 °C u statičkim uslovima i u uslovima mešanja u vodenom kupatilu (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja)

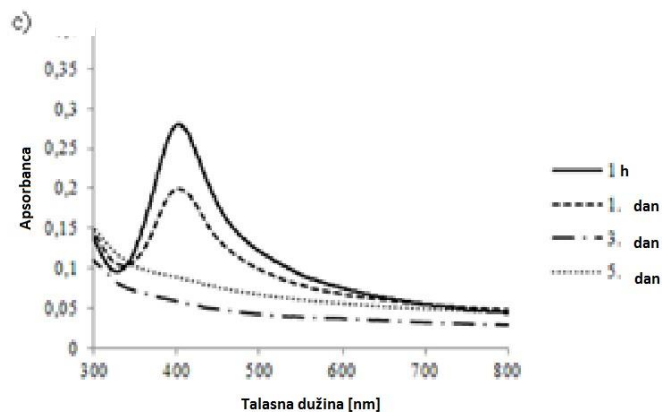
4.7.1.3. Otpuštanje srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica u statičkim uslovima u fiziološkom rastvoru

Eksperiment sa suvim mikročesticama je urađen da bi se imitirali uslovi rehidracije suvih Ag/alginatnih mikročestica kao praha pogodnog za tretiranje rana sa lučenjem. U tom eksperimentu bilo je potrebno prvo osušiti vlažne mikročestice do konstantne mase tako da se prečnik vlažnih mikročestica od $1040 \pm 130 \mu\text{m}$ smanjio na $420 \pm 60 \mu\text{m}$. Sa druge strane, suve mikročestice u fiziološkom rastvoru, su momentalno bubrile u prvih sat vremena gde su dostigle početni prečnik vlažnih mikročestica od $1120 \pm 130 \mu\text{m}$, nakon čega se veličina ovako nabubrelih mikročestica više nije menjala (slika 4.37). Početna koncentracija srebra u Ag/alginatnim mikročesticama je bila $2,10 \pm 0,02 \text{ mM}$, a nakon 1h $1,92 \text{ mM}$. Pri tome je otpuštanje srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica u fiziološkom rastvoru bilo znatno sporije nego iz vlažnih mikročestica u statičkim uslovima i u uslovima mešanja. Koncentracija nanočestica srebra unutar Ag/alginatnih mikročestica se i u ovom slučaju konstantno smanjivala tokom vremena na osnovu izmerenih apsorpcionih maksimuma (slika 4.38). Primenom zavisnosti predstavljene jednačinom (3.3) izračunate su koncentracije nanočestica srebra u mikročesticama na

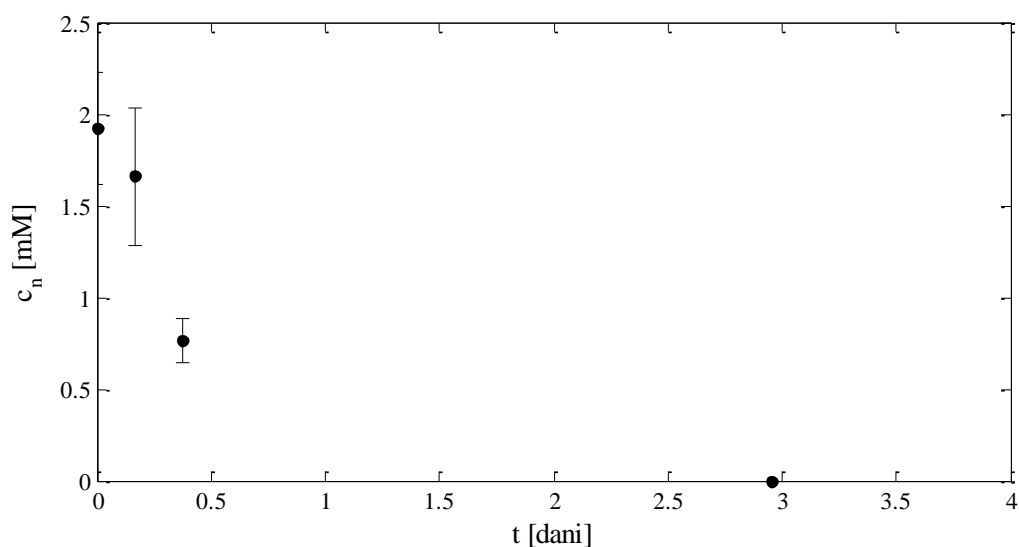
osnovu izmerenih apsorpcionih maksimuma (slika 4.39). Koncentracija ukupno otpuštenog srebra nakon 7 dana je bila $0,044 \pm 0,01$ mM, što predstavlja oko 3,5 % od početne količine srebra u mikročesticama, dok je kinetika otpuštanja srebra u fiziološkom rastvoru predstavljena na slici 4.40.



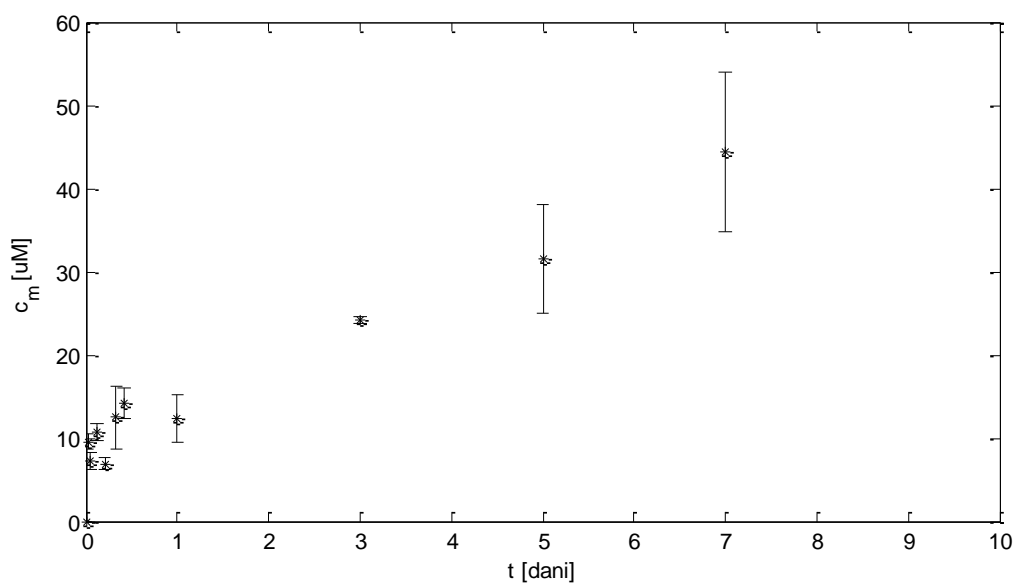
Slika 4.37. Prečnici rehidriranih Ag/alginatnih mikročestica u fiziološkom rastvoru u na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u statičkim uslovima (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja)



Slika 4.38. UV-vidljivi spektri rastvorenih Ag/alginatnih mikročestica tokom vremena u fiziološkom rastvoru na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ tokom vremena u statičkim uslovima (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ($\leq 15\%$) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji)



Slika 4.39. Koncentracija nanočestica srebra (c_n) u rehidriranim Ag/alginatnim mikročesticama u fiziološkom rastvoru u statičkim uslovima na 37 °C (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja)

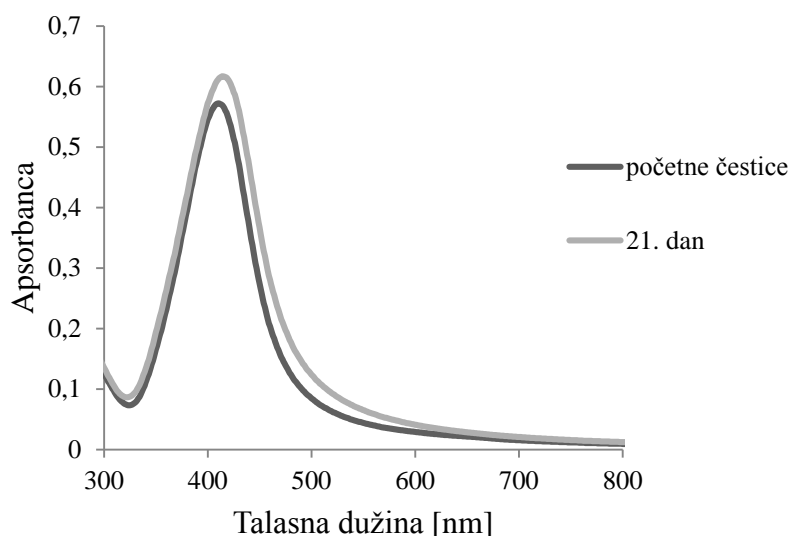


Slika 4.40. Koncentracije otpuštenog srebra (c_m) iz rehidriranih suvih Ag/alginatnih mikročestica u fiziološkom rastvoru na 37 °C u statičkim uslovima (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja)

4.7.2. Kinetika otpuštanja srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica proizvedenih iz koloidnog rastvora dobijenog elektrohemijском metodom korišćenjem alginata niske viskoznosti

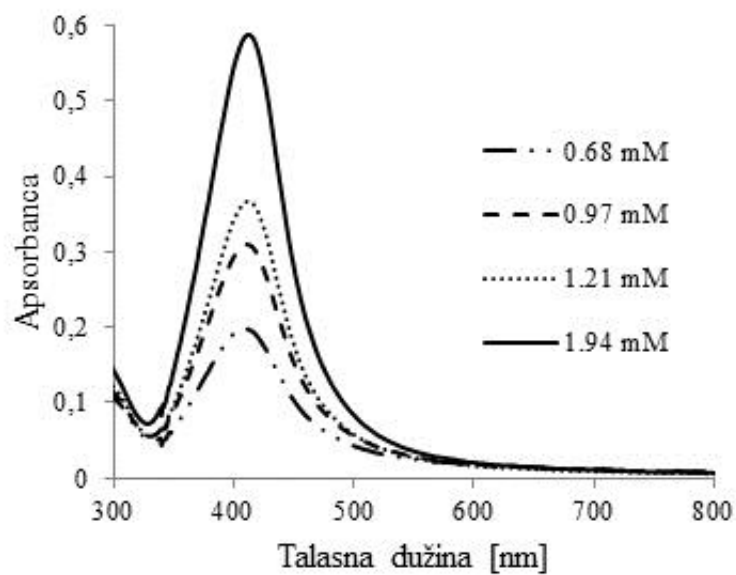
4.7.2.1. Otpuštanje srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica u dH₂O u statičkim uslovima i u pakovanom sloju pri kontinualnom protoku

Otpuštanje srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica sa elektrohemijски sintetisanim nanočesticama srebra je ispitivano u statičkim uslovima i u sistemu sa pakovanim slojem mikročestica što imitira uslove implantacije u vaskularizovanim tkivima. Ag/alginatne mikročestice su dobijene od alginata niske viskoznosti sa nanočesticama srebra dimenzija 10-30 nm (Jovanovic i sar., 2012). Srednji prečnik mikročestica je bio $590 \pm 60 \mu\text{m}$ dok je početna koncentracija srebra u mikročesticama određena preko AAS bila $1,2 \pm 0,1 \text{ mM}$. Otpuštanje srebra iz Ag/alginatnih mikročestica u statičkim uslovima je bilo veoma sporo i finalna koncentracija otpuštenog srebra u vodi posle 21-og dana je bila $6,1 \pm 0,7 \mu\text{M}$. Ova otpuštena koncentracija predstavljala je 1,3 % od ukupne početne količine srebra koja se nalazila u Ag/alginatnim mikročesticama. Ipak, nanočestice srebra su ostale stabilne tokom 21-og dana na osnovu UV-vidljive spektroskopije (slika 4.41). Kroz sistem sa pakovanim slojem voda je kontinualno proticala protokom $0,4 \text{ ml min}^{-1}$ što odgovara površinskoj brzini od $1 \times 10^{-4} \text{ m s}^{-1}$. Usled izlaganja kontinualnom protoku, otpuštanje srebra je bilo značajno veće i to već nakon 12 dana kada je koncentracija srebra u vodi iznosila $38,8 \pm 0,7 \mu\text{M}$. Ova otpuštena koncentracija odgovarala je količini 8,1 % od ukupne početne količine srebra u mikročesticama.

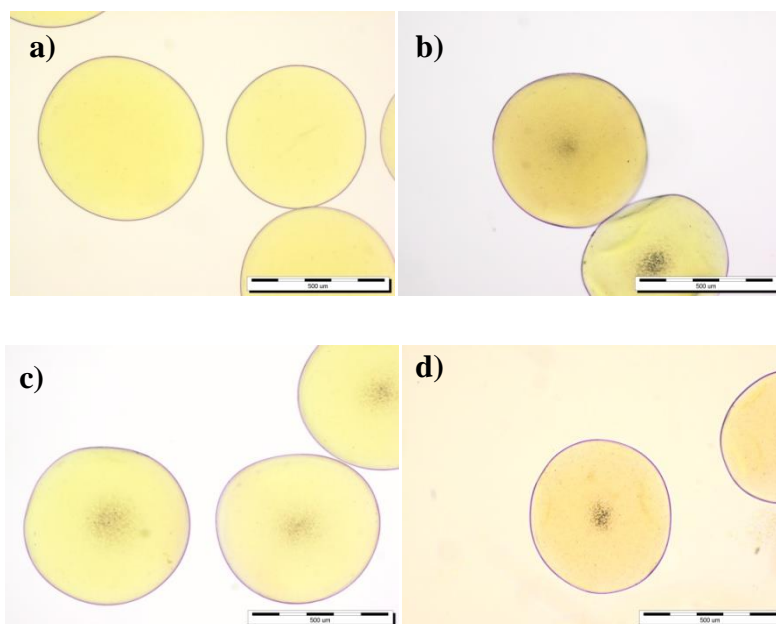


Slika 4.41. Spektar rastvorenih Ag/alginatnih mikročestica na početku i nakon 21-og dana u vodi u statičkim uslovima (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardne devijacije ($\leq 15\%$) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji)

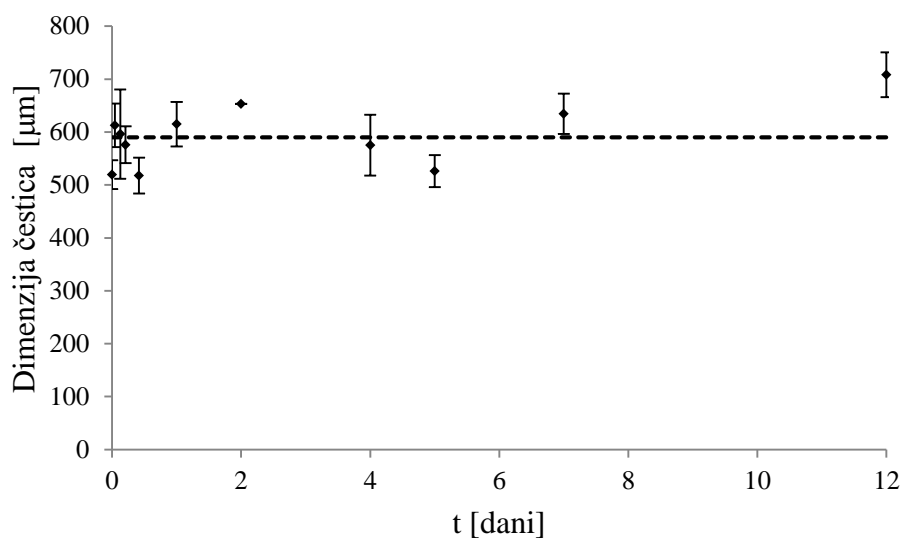
Nestajanje nanočestica iz Ag/alginatnih mikročestica koje su bile izložene toku fluida je praćeno na osnovu UV- vidljive spektroskopije rastvorenih mikročestica za različite vremenske intervale. Spektri rastvorenih Ag/alginatnih mikročestica tokom vremena jasno pokazuju da dolazi do smanjenja apsorpcionog maksimuma u česticama usled toka što može biti posledica naglog spiranja nanočestica iz Ag/alginatnih mikročestica, nagle oksidacije nanočestica ili agregacije nanočestica unutar Ag/alginatnih mikročestica (slika 4.42). Na osnovu optičke mikroskopije može se zaključiti da je treća pretpostavka tačna, odnosno da dolazi do agregacije nanočestica u mikročesticama (slika 4.43). Pri tome je veličina mikročestica ostala nepromenjena tokom vremena (slika 4.44), a otpuštanje srebra je pratilo linearni trend (slika 4.45).



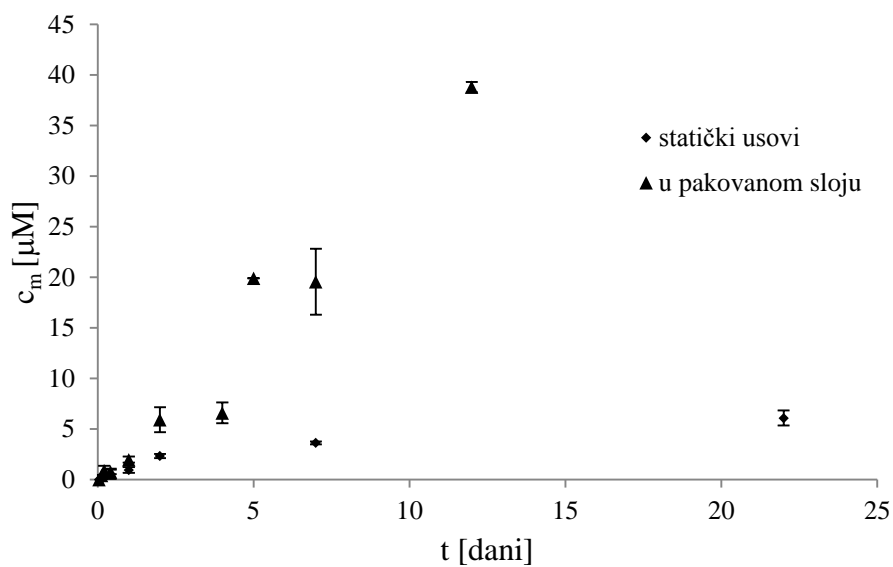
Slika 4.42. UV-vidljivi spektri rastvorenih Ag/alginatnih mikročestica u sistemu sa pakovanim slojem tokom vremena (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja; standardne devijacije (<15 %) su izostavljene kako bi spektri bili uočljivi)



Slika 4.43. Ag/alginatne mikročestice u sistemu sa pakovanim slojem: a) početne, b) nakon 4 dana, c) nakon 7 dana, d) nakon 12 dana (razmernik: 500 μm)



Slika 4.44. Srednji prečnici Ag/alginatnih mikročestica tokom vremena u sistemu sa pakovanim slojem (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja)

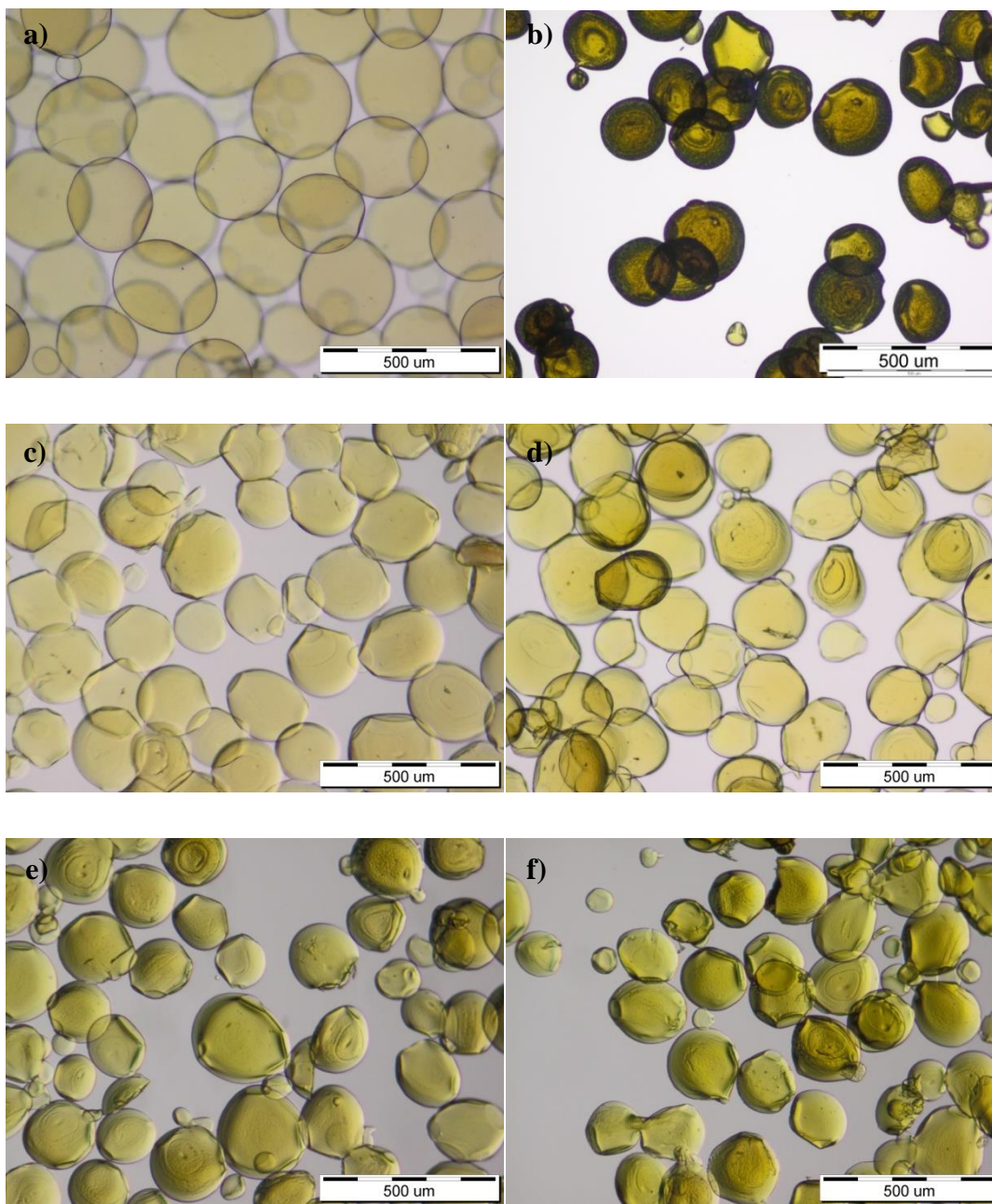


Slika 4.45. Koncentracije otpuštenog srebra u vodi (c_m) iz Ag/alginatnih mikročestica u statičkim uslovima i u pakovanom sloju (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja)

4.7.3. Kinetika otpuštanja srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica proizvedenih iz koloidnog rastvora dobijenog hidrotermalnom sintezom

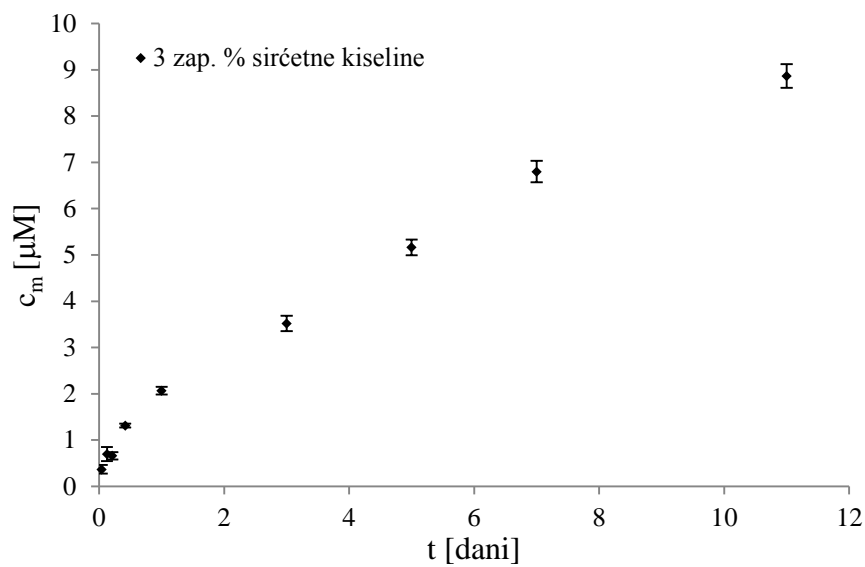
4.7.3.1. Otpuštanje srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica u statičkim uslovima u simulantima hrane na bazi vode

Kinetika otpuštanja srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica napravljenih od koloida sintetisanog hidrotermalnom metodom je ispitana tokom 10 dana u statičkim uslovima na 20 °C u 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline, dH₂O, 10 zap. % rastvoru etanola i 95 zap. % rastvoru etanola koji su korišćeni kao simulanti hrane na bazi vode. Početna koncentracija nanočestica srebra u suvim Ag/alginatnim mikročesticama je određena preko AAS i iznosila je $0,34 \pm 0,04$ mas. % (tj. $1,22 \pm 0,10$ mM na bazi vlažnog hidrogela). Početni prečnik Ag/alginatnih mikročestica je bio 190 ± 20 μm i nakon 10 dana stajanja u prethodno spomenutim rastvorima se nije značajno promenio (220 ± 20 μm u 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline, 210 ± 20 μm u dH₂O, 200 ± 30 μm u 10 zap. % rastvoru etanola i 190 ± 20 μm u 95 zap. % rastvoru etanola) (slika 4.46). Ukupna otpuštena koncentracija srebra nakon 10 dana u 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline, dH₂O, 10 zap. % rastvoru etanola i 95 zap. % rastvoru etanola je bila $8,87 \pm 0,25$ μM ($0,957 \pm 0,027$ μg Ag/g), $1,08 \pm 0,22$ μM ($0,117 \pm 0,024$ μg Ag/g), $0,70 \pm 0,13$ μM ($0,09 \pm 0,02$ μg Ag/g), i $0,40 \pm 0,08$ μM ($0,050 \pm 0,009$ μg Ag/g) redom. Ova koncentracija odgovara 13,7; 1,67; 1,09; i 0,61 % od početne koncentracije srebra u Ag/alginatnim mikročesticama, redom. Kinetika otpuštanja srebra u ovim rastvorima je predstavljena na slici 4.47. UV-vidljivom spektroskopijom je pokazano da je koncentracija nanočestica srebra u suvim Ag/alginatnim mikročesticama nakon 10 dana stajanja u svim medijumima bila vrlo slična ali za ~ 33 % niža nego na početku (slika 4.48). Ipak, smanjenje maksimalne apsorbance ne odgovara procentu otpuštenog srebra u medijumu što znači da nanočestice verovatno agregiraju unutar Ag/alginatnih mikročestica tokom stajanja u ispitivanim rastvorima kao što je to uočeno u eksperimentu otpuštanja srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica u dH₂O (odjeljak 4.7.1.1, slika 4.29).

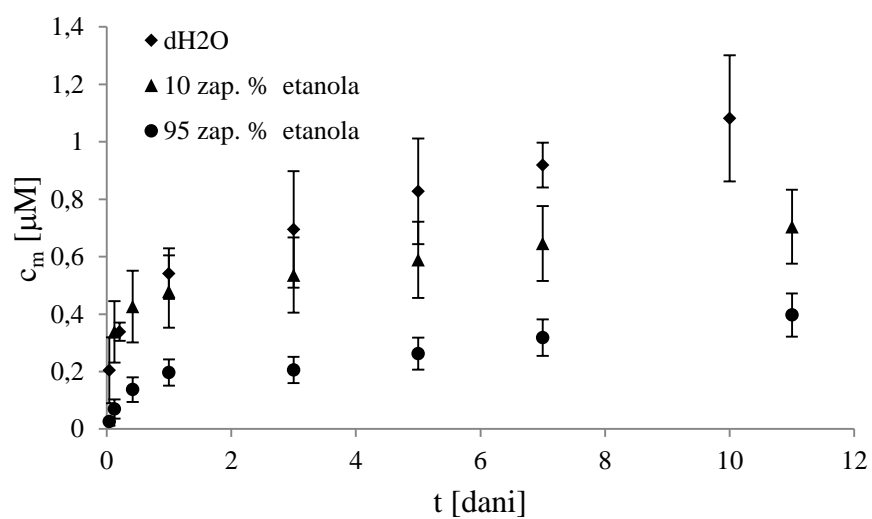


Slika 4.46. Ag/alginate mikročestice: a) početne vlažne, b) početne suve mikročestice, c) suve nakon 10 dana u 3 % zap. rastvoru sirćetne kiseline, d) suve nakon 10 dana u dH₂O c) suve nakon 10 dana u 10 % zap. rastvoru etanola d) suve nakon 10 dana u 95 % zap. rastvoru etanola (razmernik: 500 µm)

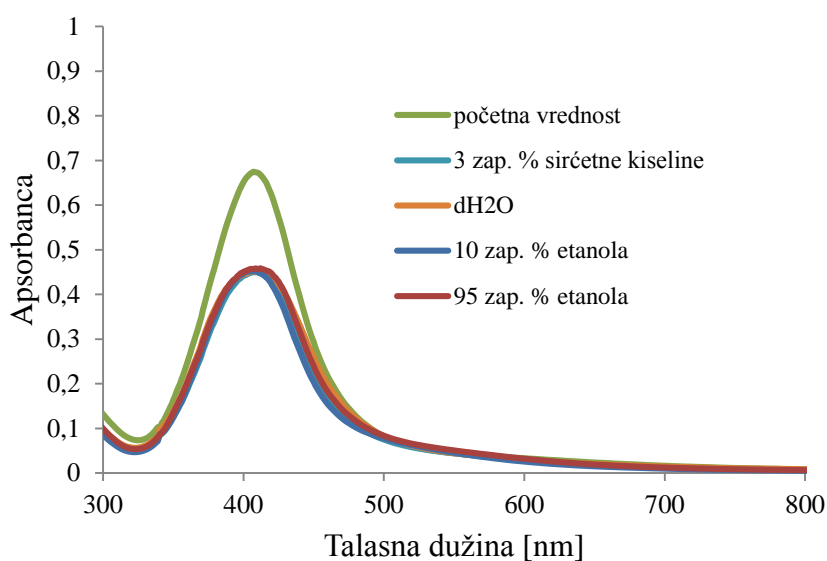
a)



b)



Slika 4.47. Koncentracije otpuštenog srebra (c_m) iz suvih Ag/alginatnih mikročestica tokom vremena u: a) 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline, b) dH₂O, 10 zap. % rastvoru etanola i 95 zap. % rastvora etanola



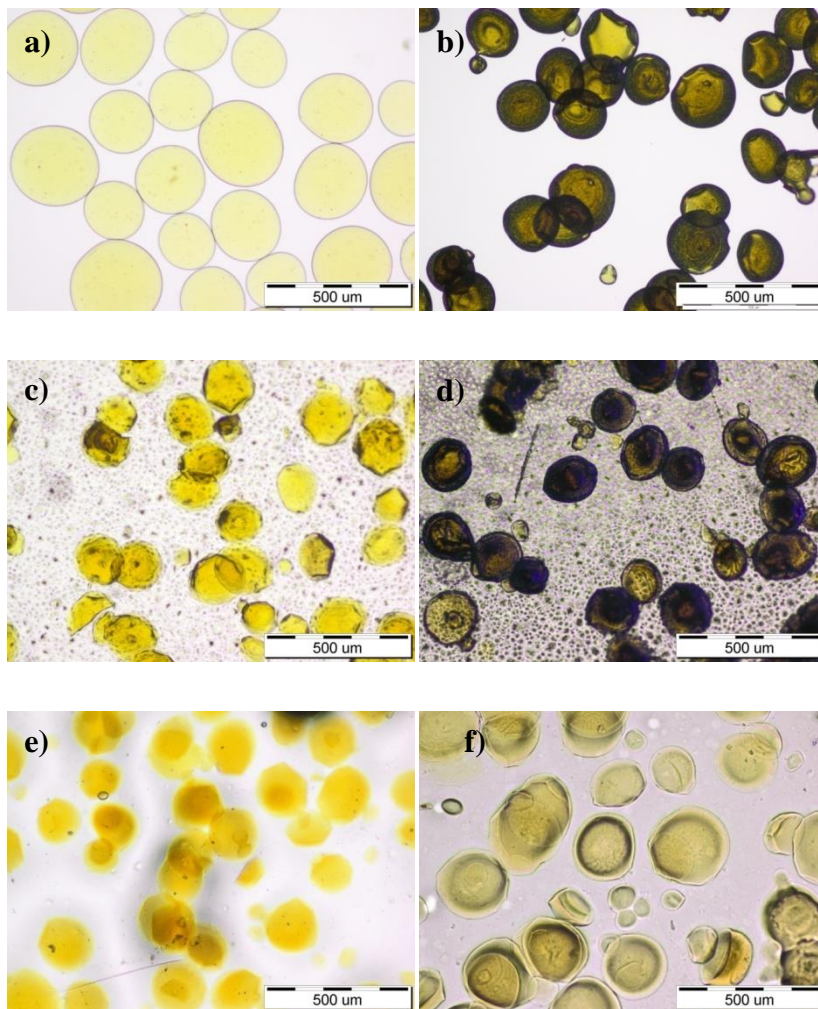
Slika 4.48. UV-vidljivi spektar rastvorenih suvih početnih Ag/alginatnih mikročestica i nakon 10 dana stajanja u različitim model rastvorima u statičkim uslovima na 20 °C

4.7.4. Otpuštanje srebra iz PLA i PVA kompozitnih filmova

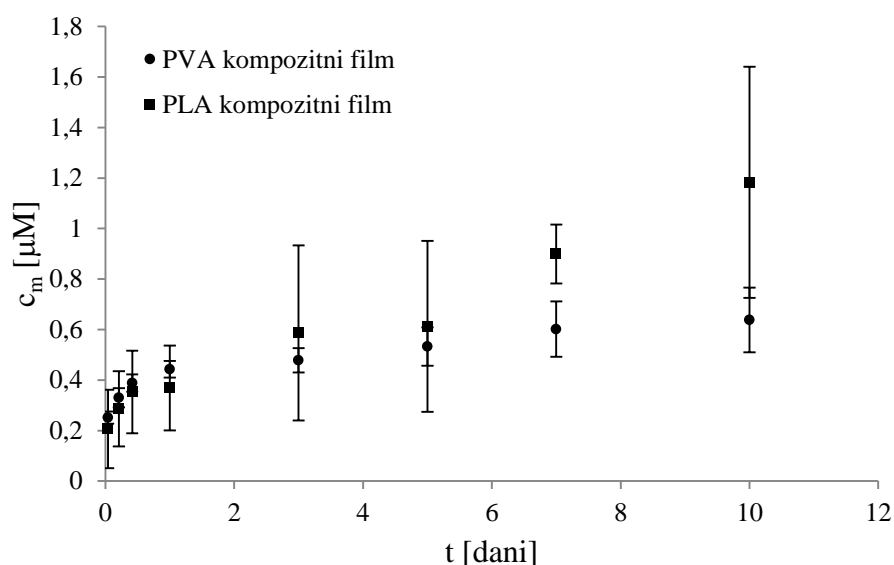
4.7.4.1. Kinetika otpuštanja srebra iz PLA i PVA kompozitnih filmova u 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline na 20 °C

Ispitana je i kinetika otpuštanja srebra iz PLA i PVA kompozitnih filmova nakon 10 dana stajanja u 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline na 20 °C. Početna koncentracija srebra u PLA i PVA kompozitnim filmovima je bila $0,020 \pm 0,001$ mas. % i $0,017 \pm 0,001$ mas. %, redom, što je određeno primenom ICP-OES. Koncentracija otpuštenog srebra iz PLA i PVA kompozitnih filmova u sirćetnoj kiselini je bila $1,18 \pm 0,46$ μM ($0,128 \pm 0,049$ $\mu\text{g Ag/g}$) i $0,64 \pm 0,13$ μM ($0,07 \pm 0,01$ $\mu\text{g/g}$), redom, što predstavlja 3,4 % i 2,1 % početne količine srebra u filmovima, redom. Praćena je promena mase PLA i PVA kompozitnih filmova kao i debljina filmova nakon 10 dana. Masa PLA kompozitnih filmova se nije bitno promenila od početne vrednosti od $0,208 \pm 0,027$ g i nakon 10 dana je iznosila $0,185 \pm 0,006$ g. U slučaju PVA kompozitnih filmova došlo je do značajne promene mase od $0,210 \pm 0,030$ g do $0,657 \pm 0,120$ g nakon 10 dana. Slično, veličina Ag/alginatnih mikročestica unutar PLA filmova je ostala nepromenjena i iznosila je kao na početku 170 ± 20 μm dok je unutar PVA filmova došlo do povećanja prečnika na vrednost 260 ± 50 μm (slika 4.49). Debljina PLA kompozitnih filmova se

takođe nije bitno promenila dok je debljina PVA kompozitnih filmova porasla kako je masa filmova porasla ali nije mogla da se izmeri zbog velikog udela vode u ovom materijalu. Kinetika otpuštanja srebra iz ovih kompozitnih filmova u 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline je predstavljena na slici 4.50.



Slika 4.49. Ag/alginate mikročestice: a) vlažne početne ($270 \pm 30 \mu\text{m}$), b) osušene vlažne ($190 \pm 20 \mu\text{m}$), c) početne u PLA filmu ($180 \pm 20 \mu\text{m}$), d) u PLA filmu nakon 10 dana stajanja u 3 zap.% rastvoru sirćetne kiseline ($170 \pm 20 \mu\text{m}$), e) početne u PVA filmu ($170 \pm 20 \mu\text{m}$), f) u PVA filmu nakon 10 dana stajanja u 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline ($260 \pm 50 \mu\text{m}$) (razmernik: 500 µm)



Slika 4.50. Koncentracije otpuštenog srebra (c_m) iz PLA i PVA kompozitnih filmova u 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline na 20 °C tokom vremena

Kada se uporede rezultati otpuštanja srebra iz 10 mg suvih Ag/alginatnih mikročestica (slika 4.47a) i PLA i PVA kompozitnih filmova u 3 zap. % sirćetnoj kiselinu na 20 °C (slika 4.50) može se zaključiti da je otpuštanje iz PLA kompozitnih filmova veće nego u slučaju PVA kompozitnih filmova, ali da je svakako najveće otpuštanje iz suvih Ag/alginatnih mikročestica. Ipak koncentracije otpuštenog srebra iz PLA i PVA filmova nisu statički značajno različite (slika 4.50).

4.7.4.2. Koncentracije otpuštenog srebra iz PLA i PVA kompozitnih filmova nakon 10 dana u različitim simulantima hrane na bazi vode na različitim temperaturama

U ovom radu su izmerene koncentracije otpuštenog srebra iz PLA i PVA kompozitnih filmova nakon 10 dana stajanja u dH₂O, 10 zap. % rastvoru etanola i 95 zap. % rastvoru etanola na 4 °C, 20 °C i 40 °C. Početna koncentracija srebra u PLA i PVA kompozitnim filmovima je bila $0,020 \pm 0,001$ mas. % i $0,017 \pm 0,001$ mas. % redom, određena pomoću ICP-OES. Praćene su promene u mase filmova, mikročestica i filmova kao i debljine filmova, a rezultati su sumirani u tabelama 4.1. i 4.2. Takođe, otpuštene koncentracije srebra u dH₂O i oba rastvora etanola, su sumirane u tabeli 4.3. kao i procenat otpuštanja u odnosu na početnu količinu srebra u filmovima. Otpuštene koncentracije u ispitivanim medijumima nakon 10 dana su prikazane na slici 4.51.

Tabela 4.1. Sumirane vrednosti mase, prečnika mikročestica i debljine kompozitnih PLA filmova nakon 10 dana u dH₂O, 10 zap. % rastvoru etanola i 95 zap. % rastvoru etanola na 4 °C, 20 °C i 40 °C (početni prečnik mikročestica je iznosio u svim slučajevima 180 ± 20 μm, a početna debljina filmova 0,270 ± 0,015

Medijum	Temperatura		4 °C	20 °C	40 °C
dH ₂ O	Masa filmova (g)	Početna	0,208 ± 0,027	0,185 ± 0,006	0,189 ± 0,012
		Nakon 10 dana	0,213 ± 0,023	0,189 ± 0,011	0,188 ± 0,011
	Prečnik mikročestica u filmovima [μm]	Nakon 10 dana	208 ± 27	189 ± 18	177 ± 22
	Debljina filmova [mm]	Nakon 10 dana	0,280 ± 0,018	0,270 ± 0,017	0,283 ± 0,015
10 % EtOH	Masa filmova [g]	Početna	0,210 ± 0,020	0,178 ± 0,016	0,218 ± 0,004
		Nakon 10 dana	0,211 ± 0,020	0,181 ± 0,017	0,212 ± 0,005
	Prečnik mikročestica u filmovima [μm]	Nakon 10 dana	210 ± 31	191 ± 24	175 ± 32
	Debljina filmova [mm]	Nakon 10 dana	0,272 ± 0,012	0,267 ± 0,021	0,298 ± 0,010
95 % EtOH	Masa filmova [g]	Početna	0,186 ± 0,01	0,201 ± 0,011	0,183 ± 0,011
		Nakon 10 dana	0,187 ± 0,012	0,204 ± 0,008	0,182 ± 0,025
	Prečnik mikročestica u filmovima [μm]	Nakon 10 dana	184 ± 16	181 ± 21	191 ± 30
	Debljina filmova [mm]	Nakon 10 dana	0,263 ± 0,015	0,260 ± 0,000	0,257 ± 0,006

Tabela 4.2. Sumirane vrednosti mase, prečnika mikročestica i debljine kompozitnih PVA filmova nakon 10 dana u dH₂O, 10 zap. % rastvoru etanola i 95 zap. % rastvoru etanola na 4 °C, 20 °C i 40 °C (početni prečnik mikročestica je iznosio u svim slučajevima 180 ± 20 μm, a početna debljina filmova 0,270 ± 0,015 mm)

Medijum	Temperatura		4 °C	20 °C	40 °C
dH ₂ O	Masa filmova [g]	Početna	0,144 ± 0,028	0,216 ± 0,018	0,179 ± 0,030
		Nakon 10 dana	0,499 ± 0,199	0,569 ± 0,127	0,689 ± 0,184
	Prečnik mikročestica u filmovima [μm]	Nakon 10 dana	249 ± 34	228 ± 45	224 ± 33
	Debljina filmova [mm]	Početna	0,250 ± 0,000	0,290 ± 0,010	0,253 ± 0,046
		Nakon 10 dana	/	/	/
	10 % EtOH	Masa filmova [g]	Početna	0,188 ± 0,011	0,220 ± 0,010
Nakon 10 dana			0,641 ± 0,031	0,709 ± 0,008	0,882 ± 0,09
Prečnik mikročestica u filmovima [μm]		Nakon 10 dana	260 ± 45	258 ± 41	254 ± 44
Debljina filmova [mm]		Početna	0,263 ± 0,006	0,310 ± 0,017	0,283 ± 0,058
		Nakon 10 dana	/	/	/
95 % EtOH		Masa filmova [g]	Početna	0,246 ± 0,015	0,195 ± 0,009
	Nakon 10 dana		0,252 ± 0,021	0,199 ± 0,010	0,882 ± 0,090
	Prečnik mikročestica u filmovima [μm]	Nakon 10 dana	175 ± 23	195 ± 31	196 ± 36
	Debljina filmova [mm]	Početna	0,323 ± 0,031	0,270 ± 0,020	0,243 ± 0,032
		Nakon 10 dana	0,325 ± 0,020	0,310 ± 0,010	0,238 ± 0,032

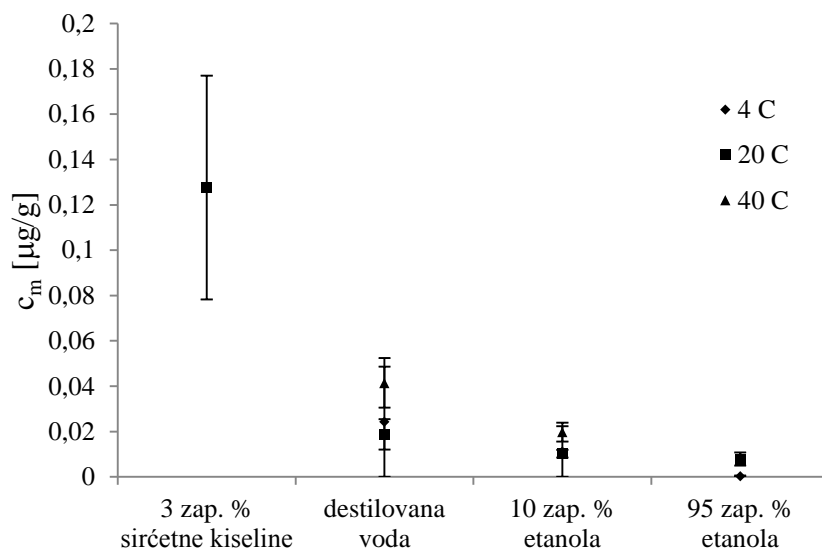
Tabela 4.3. Otpuštene koncentracije srebra iz PLA i PVA kompozitnih filmova i procenat otpuštanja nakon 10 dana u dH₂O, 10 zap. % rastvoru etanola i 95 zap. % rastvoru etanola na 4 °C, 20 °C i 40 °C

		4 °C			20 °C			40 °C		
Otpuštene koncentracije										
		[μM]	[μg/kg]	[%]	[μM]	[μg/kg]	[%]	[μM]	[μg/kg]	[%]
PLA	dH ₂ O	0,23 ± 0,14	0,024 ± 0,015	0,64	0,17± 0,06	0,019 ± 0,007	0,50	0,38± 0,03	0,041 ± 0,003	1,09
	10 zap. % etanol	0,10 ± 0,01	0,011 ± 0,001	0,29	0,095± 0,015	0,010 ± 0,002	0,27	0,183 ± 0,010	0,020 ± 0,011	0,52
	95 zap. % etanol	0,003± 0,013	0,0003 ± 0,0014	0,01	0,073± 0,027	0,008 ± 0,003	0,21	0,075± 0,04	0,008 ± 0,004	0,21
PVA	dH ₂ O	0,33 ± 0,32	0,036 ± 0,035	1,08	0,29 ± 0,08	0,031 ± 0,009	0,93	0,37 ± 0,19	0,040 ± 0,020	1,20
	10 zap. % etanol	0,38 ± 0,13	0,041 ± 0,014	1,25	1,42 ± 0,73	0,153 ± 0,080	4,63	1,54 ± 0,12	0,167 ± 0,013	5,03
	95 zap. % etanol	0,14 ± 0,03	0,015 ± 0,003	0,46	0,09 ±0,10	0,010 ± 0,011	0,30	0,09 ±0,05	0,010 ± 0,005	0,28

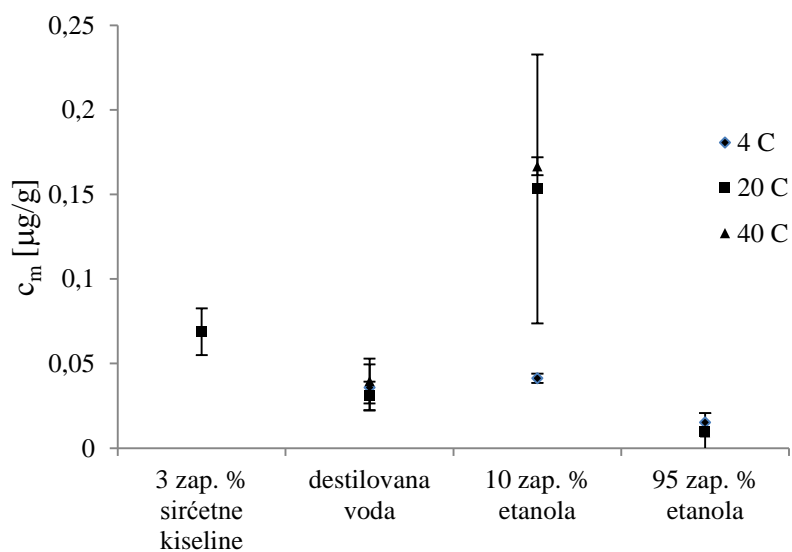
Na osnovu podataka iz tabele 4.3 može se zaključiti da sa povećanjem temperature raste i koncentracija otpuštenog srebra u sva tri medijuma, ali da je ipak koncentracija otpuštenog srebra u 10 zap. % rastvoru etanola veća od one otpuštene u 95 zap. % rastvoru etanola u oba filma. Takođe, pokazano je i da je generalno otpuštanje iz PVA

kompozitnog filma u ovim medijumima veće nego u slučaju PLA filmova verovatno zbog toga što PVA filmovi u ovim vodenim rastvorima bubre. Treba primetiti iz tabele 4.3. da je u slučaju PVA kompozitnih filmova, otpuštanje u 10 zap. % rastvoru etanola na 20 °C i 40 °C veće nego u slučaju kada je medijum bila sirćetna kiselina. Ovakav trend nije očekivan i pretpostavlja se da je rezultat eksperimentalne greške.

a)



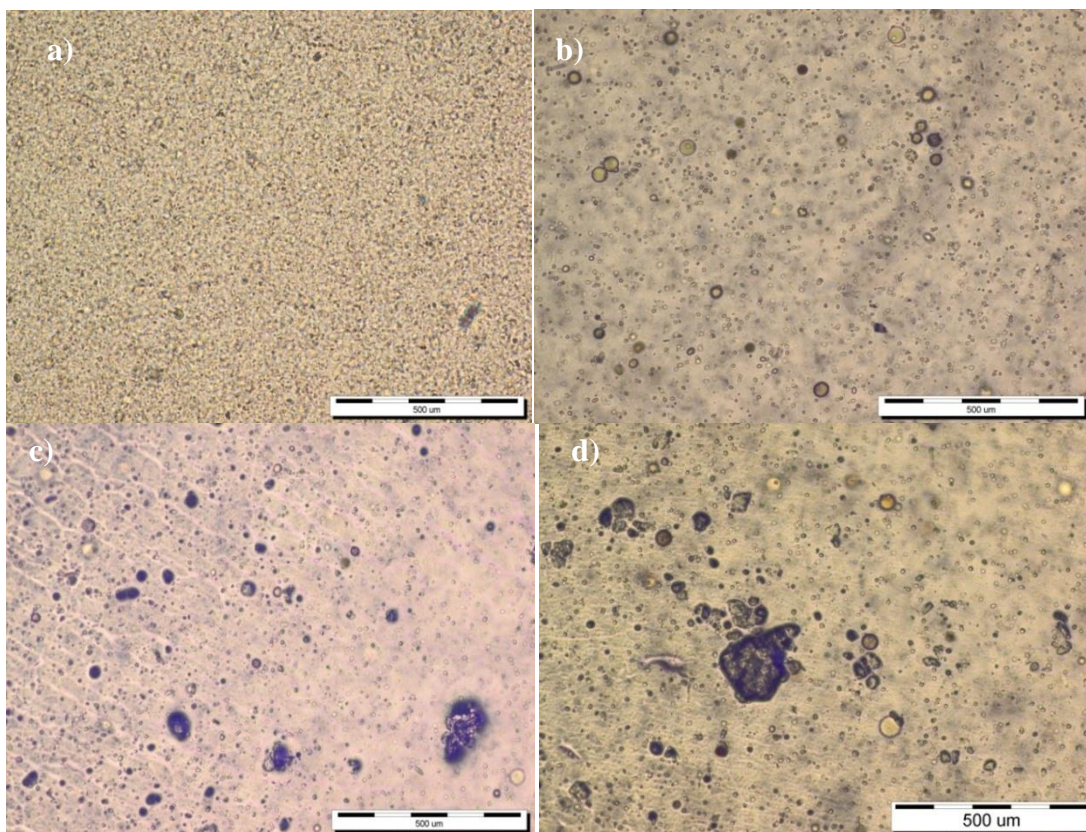
b)



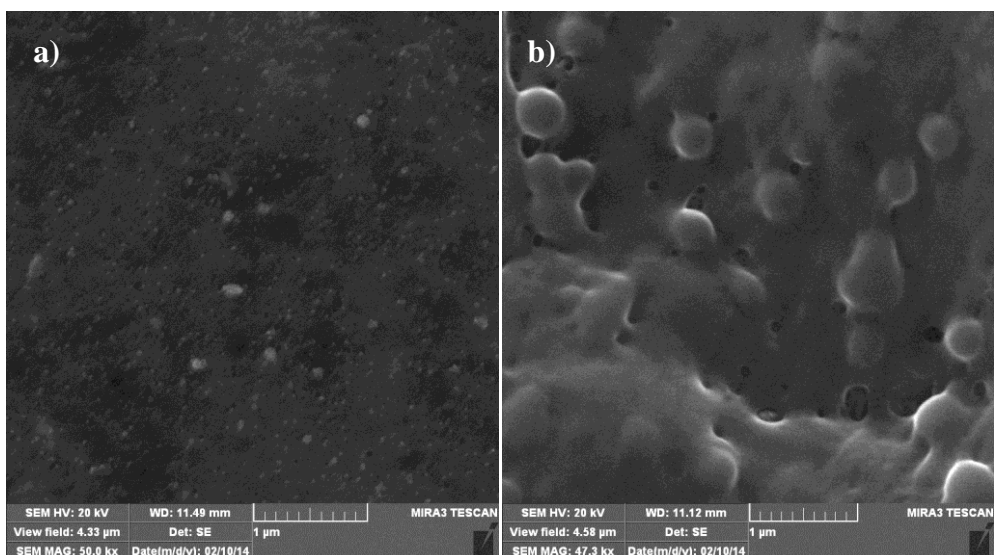
Slika 4.51. Koncentracije otpuštenog srebra (c_m) iz: a) PLA i b) PVA kompozitnih filmova nakon 10 dana u 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline, dH₂O, 10 zap. % rastvoru etanola i 95 zap. % rastvoru etanola

4.7.5. Kinetika difuzije srebra iz jednog u drugi hidrogel

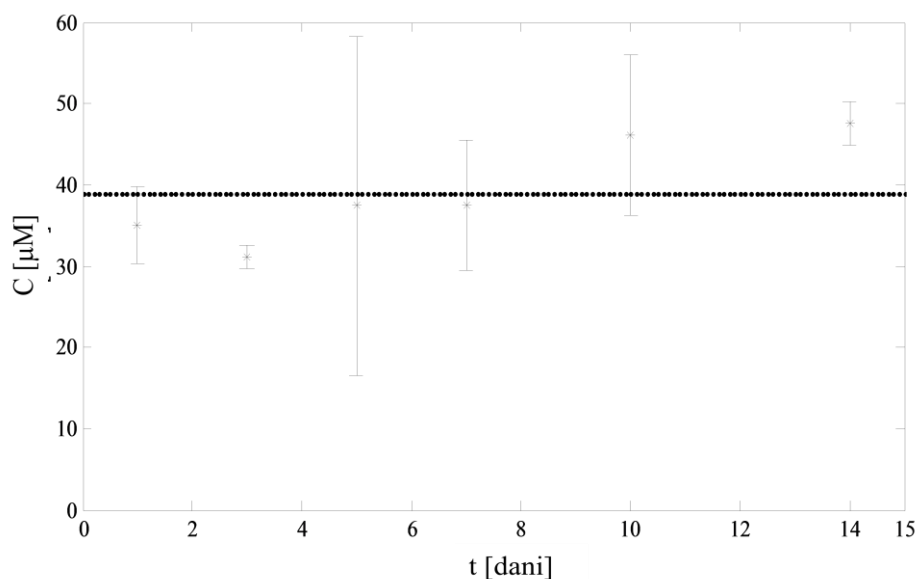
U ovom radu je ispitana migracija nanočestica srebra iz nanokompozitnih Ag/alginatnih hidrogelova u alginatni hidrogel postavljen u direktnom kontaktu ispod nanokompozita kako bi se imitirali uslovi implantacije nanokompozita u meka tkiva. Pri tome su optičkom mikroskopijom praćene promene na površini alginatnih diskova zbog difuzije nanočestica iz Ag/alginatnih diskova. Tokom vremena primećeni su agregati na površini alginatnih diskova koji su se tokom vremena uvećavali (slika 4.52). Praćenjem mase i dimenzija alginatnih diskova utvrđeno je da nije došlo do značajnih promena tokom 14 dana eksperimenta. Odnosno srednja masa početnih alginatnih diskova bila $0,56 \pm 0,09$ g, nakon 14 dana iznosila je $0,58 \pm 0,05$ g. Masa početnih Ag/alginatnih diskova je bila $0,58 \pm 0,05$ g, a nakon 14 dana iznosila je $0,58 \pm 0,06$ g. Prisustvo nanočestica srebra u okolnoj vodi nije moglo biti dokazano UV-vidljivom spektroskopijom ali su nanočestice detektovane u unutrašnjosti hidrogela primenom SEM analize poprečnog preseka alginatnog hidrogela nakon 14 dana eksperimenta (slika 4.53). Izmerene koncentracije srebra u rastvorenim alginatnim hidrogelovima tokom vremena prikazane su na slici 4.54. gde se uočava da su ove koncentracije približno slične. Srednja vrednost koncentracije srebra u alginatnom hidrogelu je iznosila $39 \pm 6 \mu\text{M}$ što je već nakon prvog dana približno postignuto kada je ta vrednost bila $35 \mu\text{M}$ (slika 4.54). Ova otpuštena koncentracija srebra iz jednog u drugi hidrogel predstavlja 0,7 % od početne količine srebra u Ag/alginatnom disku.



Slika 4.52. Optičke mikrofotografije površine alginatnog diska: a) na početku, c) nakon 3 dana, d) nakon 7 dana, g) nakon 14 dana (razmernik: 500 µm)



Slika 4.53. SEM mikrofotografija poprečnog preseka diskova nakon 14 dana eksperimenta: a) Ag/alginatni disk, b) alginatni disk (razmernik: 1 µm)



Slika 4.54. Koncentracija ukupnog srebra u alginatnim diskovima u kontaktu sa Ag/alginatnim diskovima u toku vremena; simboli predstavljaju eksperimentalne vrednosti (3 merenja) dok isprekidana linija predstavlja srednju vrednost svih merenja

4.8. MATEMATIČKO MODELOVANJE OTPUŠTANJA SREBRA

Cilj ove doktorske disertacije je bio opis mehanizma i kinetike otpuštanja nanočestica i/ili jona srebra iz vlažnih i suvih Ag/alginatnih mikročestica u fiziološkom rastvoru kroz niz eksperimenata izvedenih pod različitim hidrodinamičkim uslovima. Nadalje su razvijeni i ispitivani komplikovaniji sistemi u formi kompozitnih PLA i PVA filmova sa suvim Ag/alginatnim mikročesticama pa u ovom slučaju prvenstveno za primenu u pakovanju hrane otpuštanje je praćeno u različitim medijumima kao simulantima hrane.

Model koji se odnosi na otpuštanje srebra iz vlažnih i suvih Ag/alginatnih mikročestica u vodi kao i simulantima hrane (3 zap. % rastvor sirćetne kiseline, 10 zap. % rastvor etanola i 95 zap. % rastvor etanola) bazira se na pretpostavci da je otpuštanje srebra u vodi limitirano difuzijom nanočestica srebra unutar alginatne matrice. Isti model difuzije je primenjen i na otpuštanje srebra iz PLA i PVA kompozitnih filmova u rastvoru sirćetne kiseline.

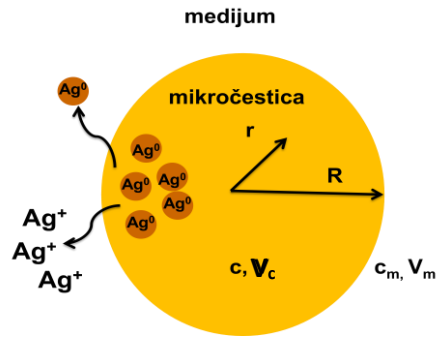
Model otpuštanja srebra iz vlažnih i suvih mikročestica u fiziološki rastvor bazira se na pretpostavkama:

1. kretanje nanočestica srebra unutar Ag/alginatnih mikročestica je limitirano difuzijom kroz alginatnu matricu;
2. otpuštanje srebra u fiziološkom rastvoru je rezultat difuzije i nanočestica srebra i različitih oblika $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ koji se formiraju nakon oksidacije nanočestica srebra u jonski oblik i njihove momentalne reakcije sa jonima hlora;
3. bubrenje suvih i vlažnih Ag/alginatnih mikročestica u fiziološkom rastvoru se odigrava u toku prvog sata inkubacije nakon čega, prečnik mikročestica ostaje konstantan

4.8.1. Matematički model otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih mikročestica proizvedenih iz koloidnog rastvora dobijenog elektrohemijском metodom korišćenjem alginata srednje viskoznosti

4.8.1.1. Vlažne Ag/alginatne mikročestice u $d\text{H}_2\text{O}$ u statičkim uslovima i u uslovima mešanja u vodenom kupatilu

Pri analizi otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih mikročestica razmatrano je otpuštanje ukupnog srebra koje uključuje srebro u nano obliku i u jonskom obliku (slika 4.55).



Slika 4.55. Šematski prikaz difuzije nanočestica srebra iz Ag/alginatne mikročestice u okolni medijum, gde je r – radijus od centra Ag/alginatne mikročestice, R – poluprečnik mikročestice, c – koncentracija ukupnog srebra u Ag/alginatnoj mikročestici, c_m – koncentracija ukupnog srebra u medijumu, V_c –zapremina Ag/alginatne mikročestice, V_m –zapremina medijuma

Na osnovu II Fikovog zakona za difuziju jedne komponente u sferičnim koordinatama, postavljena je jednačina difuzije nanočestica srebra kroz sfernu alginatnu mikročesticu u radijalnom pravcu:

$$\frac{\partial c_n}{\partial t} = D_n \left[\frac{\partial^2 c_n}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_n}{\partial r} \right] \quad (4.1)$$

gde je c_n – koncentracija nanočestica srebra i/ili jona u mikročesticama, a D_n – koeficijent difuzije nanočestica srebra i/ili jona kroz alginatnu matricu.

Brzina akumulacije ukupno otpuštenog srebra u vodi je rezultat difuzije nanočestica srebra iz mikročestica:

$$V_m \frac{dc_m}{dt} = -A D \left(\frac{\partial c}{\partial r} \right)_{r=R} \quad (4.2)$$

pri čemu je c_m - koncentracija srebra u vodi, V_m - ukupna zapremina vode, A – ukupna površina svih mikročestica, R – poluprečnik mikročestice.

Ukupna površina i zapremina mikročestica su date jednačinama:

$$A = 4N\pi R^2 \quad (4.3)$$

$$V = N \frac{4}{3} \pi R^3 \quad (4.4)$$

gde je N – ukupan broj mikročestica, V- ukupna zapremina svih mikročestica

Zamenom jednačina (4.3) i (4.4) u jednačinu (4.2) dobija se jednačina za određivanje koncentracije srebra u vodi:

$$\frac{\partial c_m}{\partial t} = \frac{-3V}{RV_m} D_n \left(\frac{\partial c}{\partial r} \right)_{r=R} \quad (4.5)$$

Diferencijalne jednačine (4.1) i (4.5) su povezane graničnim uslovom da je koncentracija srebra na površini mikročestice jednaka koncentraciji srebra u vodi, odnosno:

$$r = R; \quad c = c_m \quad (4.6)$$

Uz to, drugi granični uslov za jednačinu (4.1) predstavlja uslov simetrije u centru mikročestice, odnosno:

$$r = 0 \quad \frac{\partial c}{\partial r} = 0 \quad (4.7)$$

Jednačine (4.1) i (4.5) predstavljaju sistem od jedne parcijalne diferencijalne jednačine i jedne obične diferencijalne jednačine koje su rešene numerički koristeći MatLab 7.11. (*The MathWorks, Inc, SAD*) primenom konačnih razlika najmanjih kvadrata sa korakom u nazad za diferencijal koncentracije prvog reda. Jedini parametar u modelu koji je potrebno odrediti bio je koeficijent difuzije nanočestica srebra, D_n , i određen je metodom najmanjih kvadrata odstupanja modela od eksperimentalnih podataka. Sistem diferencijalnih jednačina je onda u obliku:

$$\frac{dc_i}{dt} = D_n \left[\frac{c_{i+1} - 2c_i + c_{i-1}}{\Delta r^2} + \frac{2}{r} \frac{c_{i+1} - c_{i-1}}{\Delta r} \right] \quad (4.8)$$

$$\frac{dc_m}{dt} = \frac{-3 \cdot V \cdot D_n}{R \cdot V_m} \cdot \frac{c_R - c_{R-\Delta r}}{\Delta r} \quad (4.9)$$

gde je Δr korak prostorne promenljive r .

Početni i granični uslovi

Na početku, distribucija nanočestica srebra u mikročesticama je uniformna sa početnom koncentracijom c_0 , kao:

$$c_n = c_0 \quad \text{za} \quad t = 0; \quad 0 < r < R \quad (4.10)$$

gde $t = 0$ odgovara prvom satu inkubacije kao što je to već naznačeno u pretpostavkama modela. Izmerene koncentracije srebra u medijumu nakon prvog sata su iznosile:

$$c_{m0} = 0,0030 \text{ mM za } t = 0; \quad r = R \quad \text{za statičke uslove} \quad (4.11)$$

$$c_{m0} = 0,0024 \text{ mM za } t = 0; \quad r = R \quad \text{za uslove sa mešanjem} \quad (4.12)$$

Kao što je prikazano u odeljku 4.7.1.1. ukupna koncentracija srebra u okolnom medijumu je bila zanemarljiva u odnosu na koncentraciju srebra u česticama, tako da se može zanemariti i usvojeno je $c_m=0$ za $t > 0$. Primenom graničnih uslova (4.6) dobija se:

$$c_n = 0 \quad \text{za} \quad t > 0 \quad \text{i} \quad r = R \quad (4.13)$$

Uslov simetrije je postavljen za centar mikročestice kao što je već rečeno jednačinom (4.7).

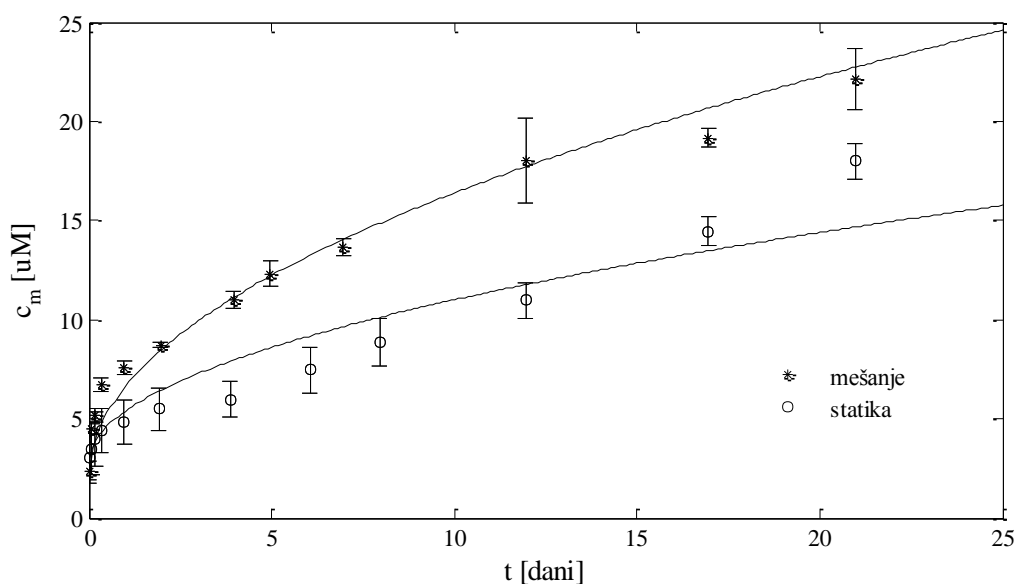
Parametri modela

Prečnici mikročestica su aproksimirani srednjom vrednošću izmerenom nakon 21 dana i za statičke uslove je vrednost bila od $880 \pm 50 \mu\text{m}$ dok je za uslove sa mešanjem srednji prečnik bio od $700 \pm 100 \mu\text{m}$. Zapremina Ag/alginatnih mikročestica je bila izračunata na osnovu izmerene mase nakon jednog sata od inkubacije (odnosno, 5,8 and 5,4 g, redom za statičke uslove i uslove sa mešanjem). Eksperimentalno je određena gustina mikročestica od $1020 \pm 10 \text{ kg m}^{-3}$ pa su zapremine čestica onda izračunate kao 5,7 i 5,3 cm^3 . Zbog početnog bubrenja mikročestica, početna zapremina vode od 10 cm^3 se

smanjila na 8,2 i 8,6 cm³ u statičkim uslovima i uslovima sa mešanjem, redom. Početne koncentracije nanočestica srebra u Ag/alginatnim mikročesticama su bile određene primenom UV-vidljive spektroskopije pomoću jednačine (3.3) kao $2,44 \pm 0,13$ mM i $2,28 \pm 0,10$ mM za mikročestice u statičkim uslovima i uslovima sa mešanjem, redom.

Numeričko rešenje

Na slici 4.56 su prikazana predviđanja modela sa najmanjim odstupanjima pri čemu je koeficijent difuzije u statičkim uslovima iznosio $0,46 \times 10^{-18}$ m²s⁻¹, a u uslovima mešanja u vodenom kupatilu $1,27 \times 10^{-18}$ m²s⁻¹. Standardna devijacija odstupanja modela od eksperimentalnih tačaka je bila u statičkim uslovima 8,0 %, a u uslovima mešanja 7,7 %.



Slika 4.56. Koncentracije otpuštenog srebra u vodi (c_m) u toku vremena u statičkim uslovima i uslovima sa mešanjem: eksperimentalni rezultati (simboli), predviđanja matematičkog modela (linije) (eksperimentalni rezultati su 3 merenja)

4.8.1.2. Ag/alginatne mikročestice u fiziološkom rastvoru u statičkim uslovima i u uslovima mešanja u vodenom kupatilu

Otpuštanje srebra u fiziološkom rastvoru je ispitivano u statičkim uslovima iz vlažnih i suvih Ag/alginatnih mikročestica kao i u uslovima sa mešanjem iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica. Kako je eksperimentalno utvrđeno, bubrenje Ag/alginatnih mikročestica u fiziološkom rastvoru je trajalo do jednog sata u slučaju i suvih i vlažnih Ag/alginatnih mikročestica kao što je i usvojeno u pretpostavkama modela. Joni hlora u fiziološkom rastvoru (0,9 % w/v NaCl) reaguju sa jonima srebra i formiraju različite forme $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$, u zavisnosti od Cl/Ag odnosa (Levard i sar., 2013). Sve ove forme $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ uključujući i primarni $\text{AgCl}_{(s)}$ mogu teorijski difundovati kroz Ag/alginatni hidrogel. Prema tome otpuštanje srebra iz Ag/alginatnih mikročestica u fiziološkom rastvoru je opisano kao difuzija nanočestica srebra i različitih $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ formi. Ovaj proces može biti opisan korišćenjem dve parcijalne diferencijalne jednačine koje opisuju promenu koncentracije nanočestica srebra u mikročesticama sa vremenom usled difuzije i nestajanja usled oksidacije i/ili reakcije sa jonima hlora. Pri tome je pretpostavljeno da je oksidacija nanočestica praćena trenutnom reakcijom jona srebra sa jonima hlora koja se može opisati kinetikom prvog reda. Na taj način se ovaj proces može predstaviti sistemom parcijalnih diferencijalnih jednačina:

$$\frac{\partial c_n}{\partial t} = D_n \left(\frac{\partial^2 c_n}{\partial r^2} + \frac{2\partial c_n}{r\partial r} \right) - k_n c_n \quad (4.14)$$

$$\frac{\partial c_s}{\partial t} = D_s \left(\frac{\partial^2 c_s}{\partial r^2} + \frac{2\partial c_s}{r\partial r} \right) + k_n c_n \quad (4.15)$$

gde je c_n – koncentracija nanočestica srebra u alginatnim mikročesticama, D_n – koeficijent difuzije nanočestica srebra kroz alginatnu matricu, k_n - konstanta nestajanja nanočestica srebra usled oksidacije, c_s - koncentracija $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ formi unutar Ag/alginatnih mikročestica, a D_s je prividni koeficijent difuzije $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ formi u alginatnoj matrici.

Koncentracija srebra u medijumu dalje može biti izračunata kao početna koncentracija srebra u medijumu nakon 1 h inkubacije uvećana za količinu srebra koja je otpuštena iz

mikročestica datog trenutka. Ova količina se izračunava na osnovu razlike početne koncentracije srebra u mikročesticama i koncentracije srebra u mikročesticama u datom trenutku ($\langle c(t) \rangle$) tako da se dobija izraz za koncentraciju srebra u medijumu:

$$c_m = c_{m0} + (c_0 - \langle c(t) \rangle) \frac{V}{V_m} \quad (4.16)$$

gde je c_{m0} početna koncentracija srebra u medijumu, a ukupna koncentracija srebra u mikročesticama ($\langle c(t) \rangle$) je zbir srednje koncentracije nanočestica srebra $\langle c_n \rangle$, i srednje koncentracije $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ formi, $\langle c_s \rangle$, u datom vremenskom trenutku što se izračunava kao:

$$\langle c_n \rangle = \frac{3}{R^3} \int_0^R c_n(r) r^2 dr \quad (4.17)$$

$$\langle c_s \rangle = \frac{3}{R^3} \int_0^R c_s(r) r^2 dr \quad (4.18)$$

Početni i granični uslovi

Pošto $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ forme nisu u početku prisutne ni u mikročesticama niti u medijumu, početni uslovi su postavljeni kao:

$$c_s = 0 \quad \text{za} \quad t = 0; \quad 0 < r < R \quad (4.19)$$

$$c_s = 0 \quad \text{za} \quad t = 0; \quad r = R \quad (4.20)$$

Za vremena $t > 0$ na graničnoj površini, koncentracija $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ formi je jednaka njihovoj koncentraciji u medijumu. Ipak, u fiziološkom rastvoru, AgCl se brzo taloži zbog slabe rastvorljivosti, tako da je koncentracija izmerenog jonskog srebra u medijumu zanemarljiva kao što je i ranije pokazano (Stojkowska i sar., 2014). Stoga, pretpostavljeno je da je koncentracija $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ formi na površini Ag /alginate mikročestice zanemarljiva, dok je uslov simetričnosti postavljen za centar mikročestice:

$$c_s = 0 \text{ za } t > 0 \text{ i } r = R \quad (4.21)$$

$$\frac{\partial c_s}{\partial r} = 0 \text{ za } t > 0 \text{ i } r = 0 \quad (4.22)$$

Početni i granični uslovi za jednačinu 4.14 su predstavljeni jednačinama 4.10, 4.13 i 4.7.

Parametri modela

Eksperimentalno je utvrđeno da se bubrenje mikročestica u fiziološkom rastvoru odvija u toku prvog sata inkubacije nakon čega su mikročestice dostigle konstantan prečnik od $1160 \pm 110 \mu\text{m}$, $960 \pm 60 \mu\text{m}$ i $1180 \pm 130 \mu\text{m}$ za vlažne mikročestice u statičkim uslovima, vlažne mikročestice u uslovima mešanja i suve mikročestice u statičkim uslovima, redom. Dalje, zapremine mikročestica su izračunate na osnovu izmerene mase mikročestica nakon bubrenja ($5,0 \pm 0,6$; $5,5 \pm 0,6$; i $3,5 \pm 0,2$ g za vlažne mikročestice u statičkim uslovima, vlažne mikročestice u uslovima mešanja i suve mikročestice u statičkim uslovima) i eksperimentalno određene gustine mikročestica od $1020 \pm 10 \text{ kg m}^{-3}$. Paralelno, zapremina medijuma se od početne vrednosti od 10 cm^3 smanjivala kako se zapremina mikročestica povećavala. Početna koncentracija nanočestica srebra je bila određena primenom UV-vidljive spektroskopije pomoću jednačine 3.3 kao $2,20 \pm 0,07$, $2,40 \pm 0,20$, i $2,10 \pm 0,02$ mM, redom. Model je primenjen na eksperimentalne rezultate izmerene nakon prvog sata u fiziološkom rastvoru tako da je početna koncentracija nanočestica srebra u mikročesticama koja se koristi u modelu c_0 , bila $2,00 \pm 0,10$; $1,89 \pm 0,06$; i $1,92 \pm 0,31$ mM, redom. Ove koncentracije su izračunate na osnovu maksimalne apsorbance dobijene iz UV-vidljivog spektra pomoću jednačine 3.3. Paralelno, početna koncentracija otpuštenog srebra iz Ag/alginatnih mikročestica u fiziološki rastvor nakon jednog sata, c_{m0} , je eksperimentalno izmerena. Svi parametri modela su sumirani u tabeli 4.4. Koeficijent difuzije nanočestica srebra kroz matricu alginatnog hidrogela je usvojen kao $1,27 \times 10^{-18} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ prema prethodno određenoj vrednosti iz studije otpuštanja srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica u destilovanoj vodi u vodenom kupatilu (poglavlje 4.8.1.1.).

Tabela 4.4. Parametri za model koji opisuje otpuštanje srebra iz Ag/alginatnih mikročestica u fiziološki rastvor

	Vlažne mikročestice u statičkim uslovima	Vlažne mikročestice u vodenom kupatilu	Suve mikročestice u statičkim uslovima
Zapremina mikročestica, V (cm^3)	5,0	5,5	3,5
Zapremina medijuma, V_m , (cm^3)	8,9	8,4	6,5
Poluprečnik mikročestica, R (μm)	580	480	590
Početna koncentracija nanočestica srebra u mikročesticama, c_0 (mM)	2,00	1,89	1,92
Početna koncentracija srebra u medijumu, c_{m0} (mM)	0,013	0,020	0,007

Numeričko rešenje

Na osnovu rezultata promene koncentracija nanočestica srebra unutar Ag/alginatnih mikročestica tokom vremena u fiziološkom rastvoru, određenih pomoću jednačine 3.3, moguće je odrediti konstantu oksidacije nanočestica srebra, k_n . Eksperimentalni rezultati su bili modelovani primenom jednačine (4.15) sa jednim početnim i dva granična uslova:

$$c_n = c_0 \text{ za } t = 0 \text{ i } 0 < r < R \quad (4.23)$$

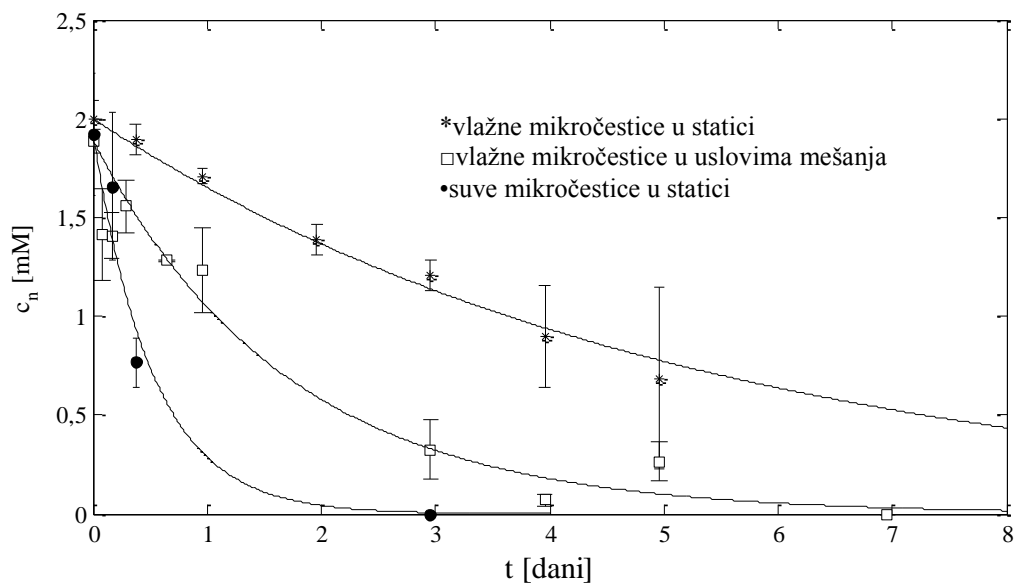
a granični uslovi su bili uslov simetrije i zanemarljiva koncentracija nanočestica na granici faza:

$$\frac{\partial c_n}{\partial r} = 0 \text{ za } t > 0 \text{ i } r = 0 \quad (4.24)$$

$$c_n = 0 \text{ za } t > 0 \text{ i } r = R \quad (4.25)$$

Pri tome se podrazumeva da je početni trenutak ($t=0$) zapravo nakon 1h od početka eksperimenta prema pretpostavci modela. Srednja koncentracija nanočestica srebra unutar alginatnih mikročestica tokom vremena je računata koristeći jednačinu (4.17).

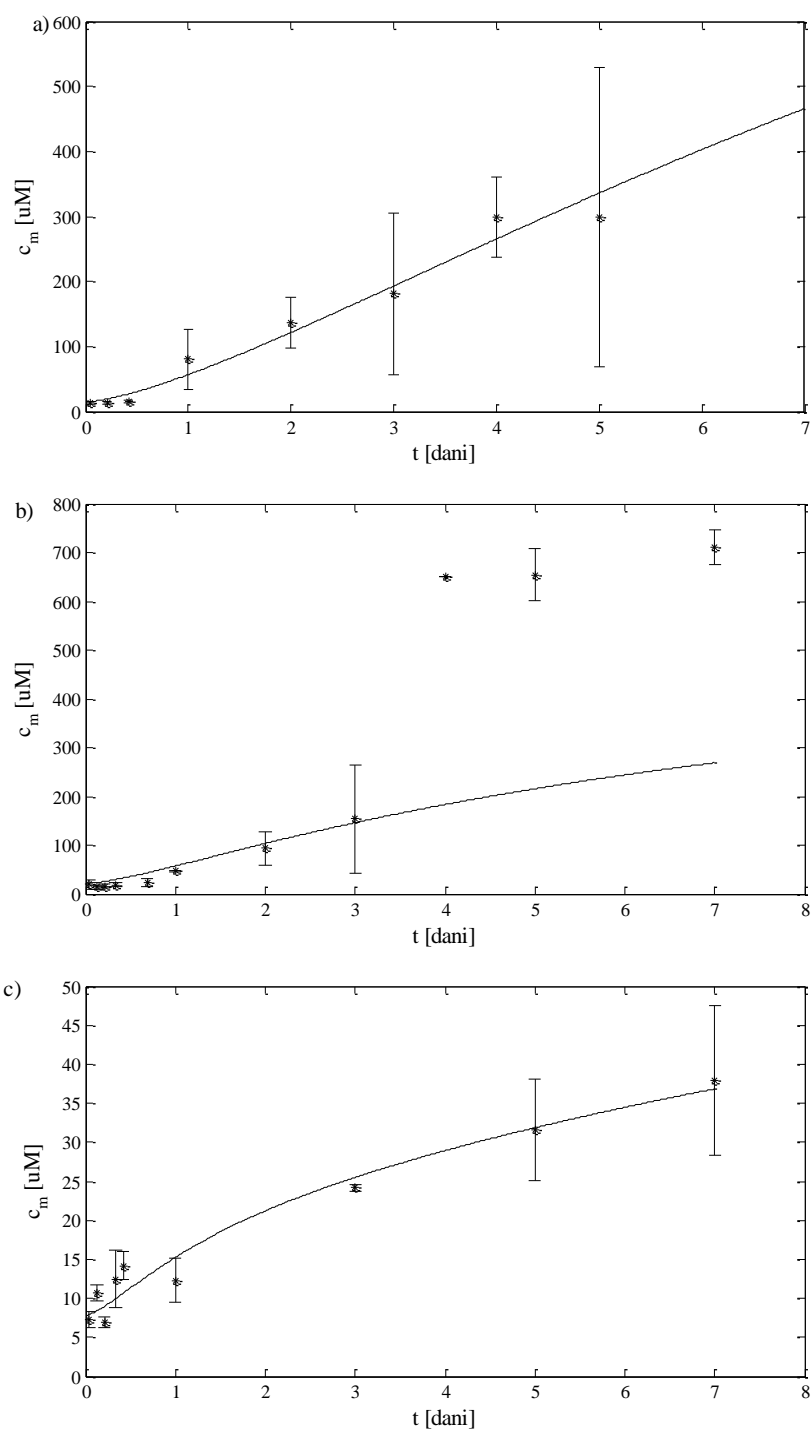
Eksperimentalni podaci i najbolja predviđanja modela određena metodom najmanjih kvadrata odstupanja prikazani su na slici 4.57. Dobijeno je zadovoljavajuće slaganje za nestajanje nanočestica srebra u slučaju vlažnih Ag/alginatnih mikročestica (STD = 2,9 % u statičkim uslovima i STD = 22,9 % u uslovima mešanja), kao i u slučaju suvih mikročestica u statičkim uslovima (STD = 9,1 %). Konstanta brzine nestajanja nanočestica srebra je izračunata kao $(2,2; 6,8; \text{ i } 22) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ za vlažne mikročestice u statičkim uslovima, vlažne mikročestice u uslovima mešanja i suve mikročestice u statičkim uslovima, redom.



Slika 4.57. Koncentracija nanočestica srebra u vlažnim Ag/alginatnim mikročesticama u statičkim uslovima i uslovima mešanja, kao i u suvim mikročesticama u statičkim uslovima u fiziološkom rastvoru tokom vremena: eksperimentalni rezultati (simboli), predviđanja modela (linije) (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja)

Nakon toga, bilo je moguće numerički rešiti jednačine (4.14) i (4.15) sa definisanim konstantama nestajanja nanočestica srebra i poznatim koeficijentom difuzije nanočestica

srebra koristeći program MatLab. Eksperimentalni podaci otpuštanja srebra u fiziološkom rastvoru i najbolja predviđanja modela sa najmanjim odstupanjima modela od eksperimentalnih vrednosti su predstavljeni na slici 4.58.

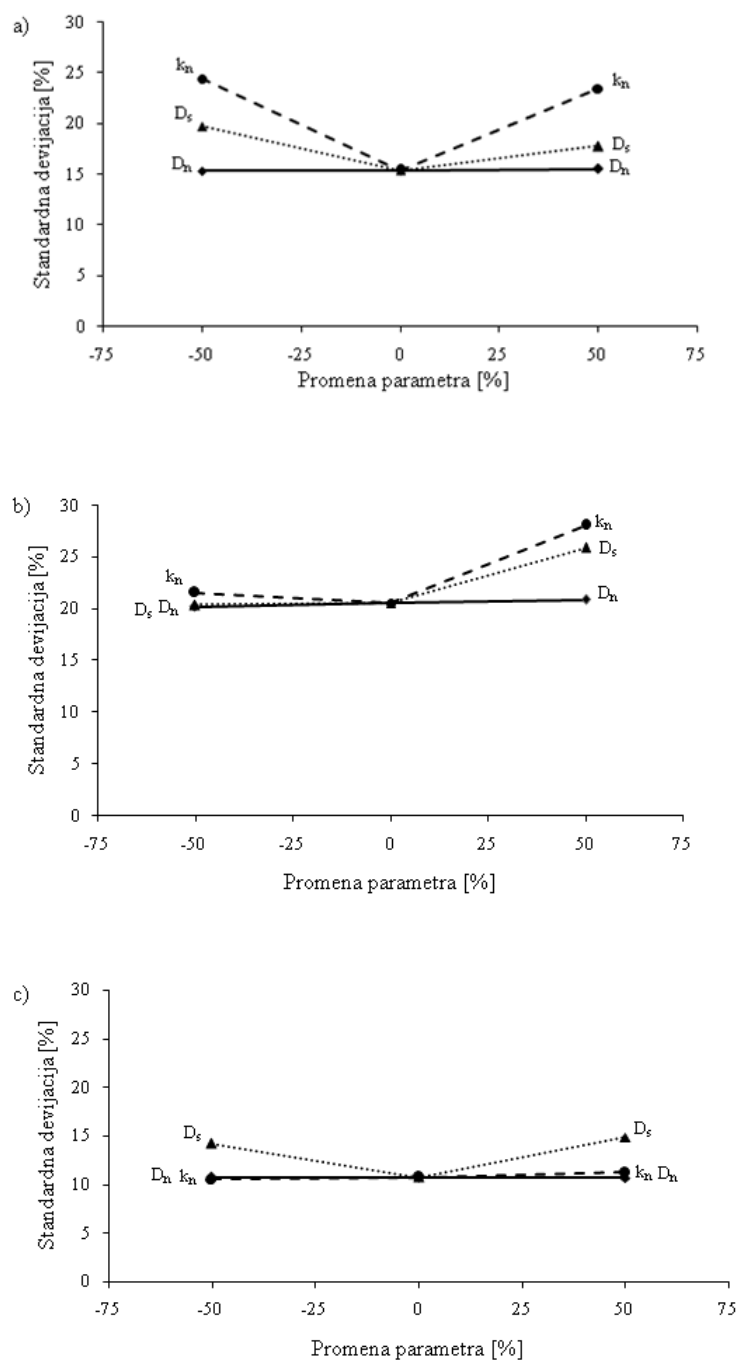


Slika 4.58. Koncentracija otpuštenog srebra u fiziološkom rastvoru (c_m) tokom vremena: a) vlažne Ag/alginatne mikročestice u statičkim uslovima, b) vlažne Ag/alginatne mikročestice u uslovima mešanja, c) suve Ag/alginatne mikročestice u statičkim uslovima; eksperimentalni rezultati (simboli), predviđanja modela (linije) (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja)

Dobijeno je prihvatljivo slaganje modela sa eksperimentalnim podacima koncentracija otpuštenog srebra u fiziološkom rastvoru za sve slučajeve (STD = 15,4 % za vlažne mikročestice u statičkim uslovima, STD = 20,6 % za vlažne mikročestice u uslovima mešanja i STD = 10,7 % za suve mikročestice u statičkim uslovima). Prividan koeficijent difuzije za sve forme $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$, D_s , je pri tome određen kao (39; 2,1 i 0,045) $\times 10^{-15} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ za vlažne mikročestice u statičkim uslovima, zatim u uslovima mešanja i za suve mikročestice u statičkim uslovima, redom. Treba primetiti da su u slučaju otpuštanja srebra iz vlažnih mikročestica u uslovima mešanja modelovani samo eksperimentalni rezultati do trećeg dana zato što je nakon tog vremena došlo do raspadanja mikročestica i shodno tome naglog povećanja koncentracije otpuštenog srebra u rastvoru.

Osetljivost modela

Osetljivost predviđanja modela je ispitana promenom parametara za ± 50 % od početne vrednosti koja je dala najbolje slaganje sa eksperimentalnim podacima. Standardne devijacije predviđanja modela od eksperimentalnih podataka pri promeni parametara u sva tri ispitivana slučaja su prikazane na slici 4.59. Može se videti da promena koeficijenta difuzije nanočestica srebra zanemarljivo utiče na kvalitet predviđanja modela u sva tri slučaja otpuštanja srebra u fiziološkom rastvoru, dok su promene konstante nestajanja nanočestica srebra i koeficijenta difuzije različitih $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ formi značajno uticale na predviđanje modela ali na različite načine. Najosetljivijim su se pokazala predviđanja modela u slučaju vlažnih mikročestica u statičkim uslovima gde je promenom oba navedena parametra, standardna devijacija od eksperimentalnih podataka dostizala vrednost i do 25 % (slika 4.59 a). U oba slučaja vlažnih mikročestica, promena konstante nestajanja nanočestica srebra je izazvala nešto veću promenu predviđanja modela nego promena koeficijenta difuzije $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ formi (slika 4.59 a i b). Ipak, efekat je bio suprotan u slučaju suvih Ag/alginatnih mikročestica (slika 4.59 c).



Slika 4.59. Analiza Osetljivosti modela: standardne devijacije predviđanja modela od eksperimentalnih rezultata pri promeni parametara modela za otpuštanje srebra iz Ag/alginatnih mikročestica u fiziološkom rastvoru za: a) vlažne mikročestice u statičkim uslovima, b) vlažne mikročestice u uslovima mešanja, c) suve mikročestice u statičkim uslovima

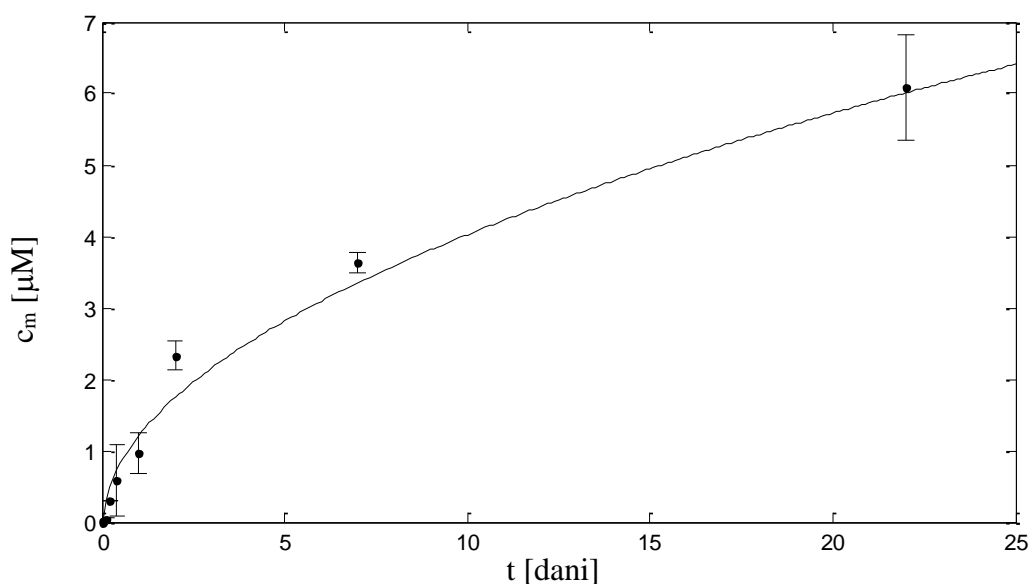
4.8.2. Kinetika otpuštanja srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica proizvedenih iz koloidnog rastvora dobijenog elektrohemijском metodom korišćenjem alginata niske viskoznosti

4.8.2.1. Vlažne Ag/alginatne mikročestice u statičkim uslovima u dH₂O

I u ovom slučaju modelovanja kinetike otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih mikročestica proizvedenih od alginata niske viskoznosti korišćen je isti model sa istim pretpostavkama kao i u slučaju Ag/alginatnih mikročestica proizvedenih od alginata srednje viskoznosti (poglavlje 4.8.1.1). Uočeno je neznatno povećanje prečnika mikročestica tako da je usvojen konstantan prečnik mikročestica od 590 μm . Korišćene su već opisane jednačine koje opisuju difuziju nanočestica kroz alginatni hidrogel (4.1) i (4.5).

Početna koncentracija nanočestica u mikročesticama c_0 je eksperimentalno određena kao 1,2 mM, dok sa druge strane, nanočestice srebra nisu bile detektovane u vodi. Postavljeni su granični uslovi opisani jednačinama (4.13) i (4.7) na osnovu pretpostavki prethodno opisanih za otpuštanje srebra u statičkim uslovima u vodi.

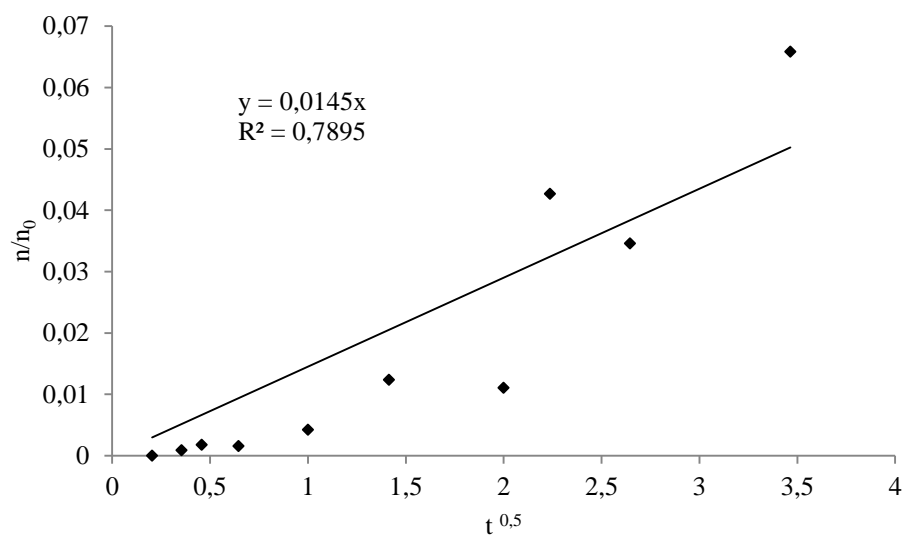
Jednačine (4.1) i (4.5) su rešene numerički korišćenjem programa MatLab kao što je već opisano. Koeficijent difuzije nanočestica srebra, D_n , je određen za najmanje kvadrato odstupanja modela od eksperimentalnih rezultata. Na slici 4.60 je prikazano najbolje predviđanje modela koncentracije otpuštenog srebra u vodi uz zadovoljavajuće slaganje sa eksperimentalnim rezultatima (STD = 17,4 %). Koeficijent difuzije nanočestica srebra u alginatnim mikročesticama je na taj način određen kao $6,9 \times 10^{-19} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.



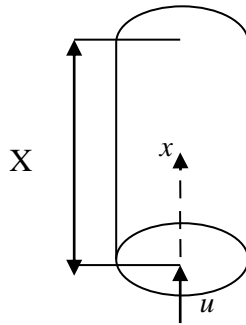
Slika 4.60. Koncentracija otpuštenog srebra u vodi (c_m) u statičkim uslovima tokom vremena: eksperimentalni rezultati (simboli), i predviđanja modela (linija) (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja)

4.8.2.2. Vlažne Ag/alginatne mikročestice pri kontinualnom protoku dH_2O u pakovanom sloju

Primenom jednačine (1.16) u obliku linearne zavisnosti na eksperimentalne rezultate je moguće zaključiti da li se otpuštanje neke supstance iz materijala može opisati aproksimiranim modelom difuzije zasnovanim na II Fikovom zakonu za početna vremena otpuštanja kada je $\frac{n_t}{n_0} < 0,4$. Koncentracija otpuštenog srebra iz pakovanog sloja Ag/alginatnih mikročestica u vodi usled kontinualnog protoka je bila znatno viša nego koncentracija srebra otpuštena u statičkim uslovima tako da se eksperimentalni podaci nisu mogli opisati modelom difuzije (slika 4.61). Da bi opisali konvektivni transport vode kroz hidrogel, gusto pakovani sloj je aproksimiran cilindričnim hidrogelom formiranim od pakovanog sloja Ag/alginatnih mikročestica kroz koji se stoga transport nanočestica srebra odvija difuzijom ali i konvekcijom (slika 4.62). Usvojeno je da se protok fluida kao i difuzija nanočestica srebra odvija samo u aksijalnom pravcu.



Slika 4.61. Primena modela unutrašnje difuzije na eksperimentalne rezultate otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih mikročestica u pakovanom sloju prilikom proticanja vode kroz pakovani sloj (simboli su odnos broja mojava eksperimentalnih vrednosti sa početnim brojem molova, a model je predstavljen linijom)



Slika 4.62. Geometrija hidrogela korišćena za postavku matematičkog modela otpuštanja srebra iz pakovanog sloja Ag/alginatnih mikročestica difuzijom i konvekcijom u aksijalnom pravcu, x ; X je dužina cilindričnog hidrogela, a u je intersticijalna brzina fluida kroz hidrogel

Promena koncentracije nanočestica srebra u cilindričnom Ag/alginatnom hidrogelu, c_n , je predstavljena aproksimiranom konvektivno-difuzionom jednačinom (1.11) u aksijalnom pravcu:

$$\frac{\partial c_n}{\partial t} = D_n \frac{\partial^2 c_n}{\partial x^2} - u \frac{\partial c_n}{\partial x} \quad (4.26)$$

gde je x aksijalna koordinata, a u je intersticijalna brzina.

Otpuštena koncentracija srebra u vodi tokom vremena je izračunata na osnovu razlike početne količine srebra u mikročesticama i srednje količine srebra u hidrogelu u svakom trenutku kao:

$$c_m = \frac{(c_0 - \langle c_n \rangle)V}{V_m} \quad (4.27)$$

gde je V zapremina hidrogela ($3,9 \text{ cm}^3$), V_m zapremina vode u sistemu (10 cm^3), dok se srednja koncentracija nanočestica srebra u hidrogelu može izračunati kao:

$$\langle c_n \rangle = \frac{1}{X} \int_0^X c_n(x) dx \quad (4.28)$$

gde je X dužina cilindričnog hidrogela koja je izračunata kao 6,1 cm iz ukupne zapremine svih mikročestica ($3,9 \text{ cm}^3$) i poprečnog preseka sloja ($0,64 \text{ cm}^2$). Na početku, distribucija nanočestica srebra u mikročesticama je uniformna sa početnom koncentracijom c_0 , koja je eksperimentalno određena kao 1,2 mM dok nanočestice srebra nisu bile detektovane u vodi. Na izlazu iz pakovanog sloja je pretpostavljeno da nema fluksa kroz granicu faza tako da je granični uslov:

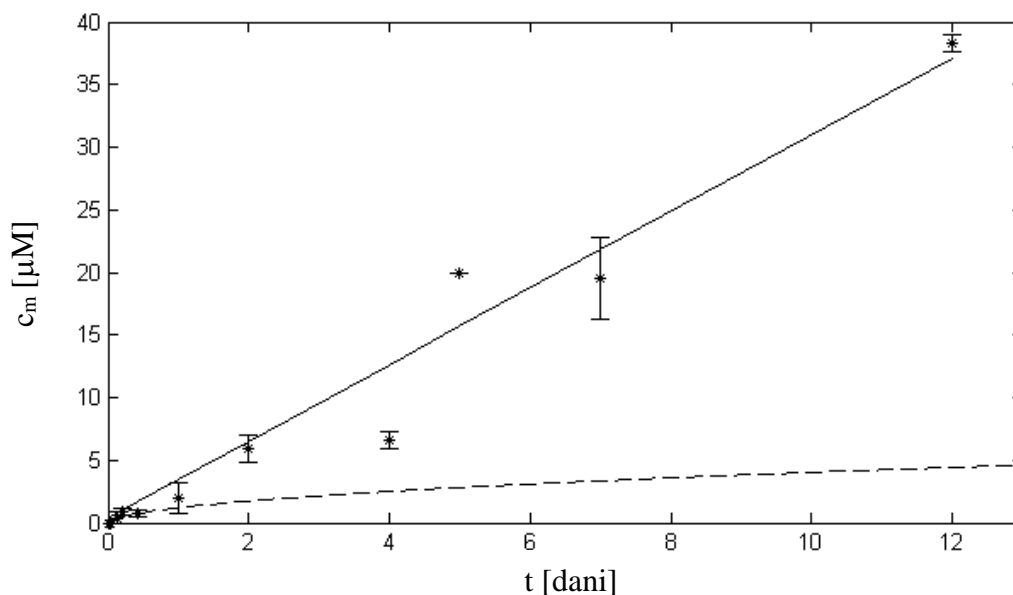
$$\frac{\partial c_n}{\partial x} = 0 \quad \text{za} \quad x = X \quad (4.29)$$

Jednačina (4.26) je rešena numerički koristeći program MatLab. Koeficijent difuzije nanočestica srebra D_n je prethodno izračunat iz modela koji je opisivao difuziju nanočestica iz alginatnih mikročestica u statičkim uslovima odnosno $D_n = 6,9 \times 10^{-19} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (poglavlje 4.8.2.1). Jedini parameter koji je određen primenom metode najmanjih kvadrata odstupanja bio intersticijalna brzina fluida kroz hidrogel, u .

Dobijeno je zadovoljavajuće slaganje predviđanja modela sa eksperimentalnim podacima (STD = 24,8 %) pri čemu je brzina fluida unutar hidrogela određena kao $4,6 \times 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$ (slika 4.63). Sa druge strane iz protoka fluida, \dot{V} , i površine poprečnog preseka sloja, S , može se izračunati površinska brzina, U , prema jednačini:

$$U = \frac{\dot{V}}{S} \quad (4.30)$$

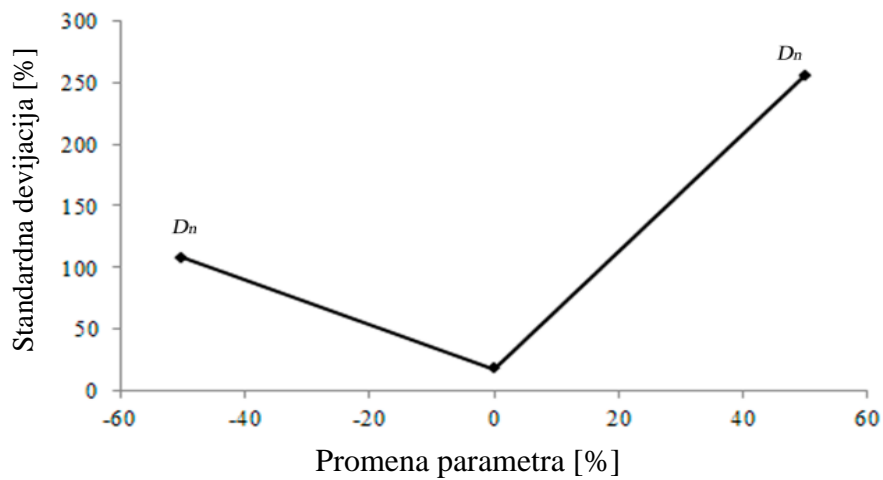
Površinska brzina je izračunata kao $1 \times 10^{-4} \text{ m s}^{-1}$, tako da vrednost intersticijalne brzine pokazuje da samo $\sim 6 \times 10^{-3} \%$ od protoka fluida prolazi kroz hidrogel.



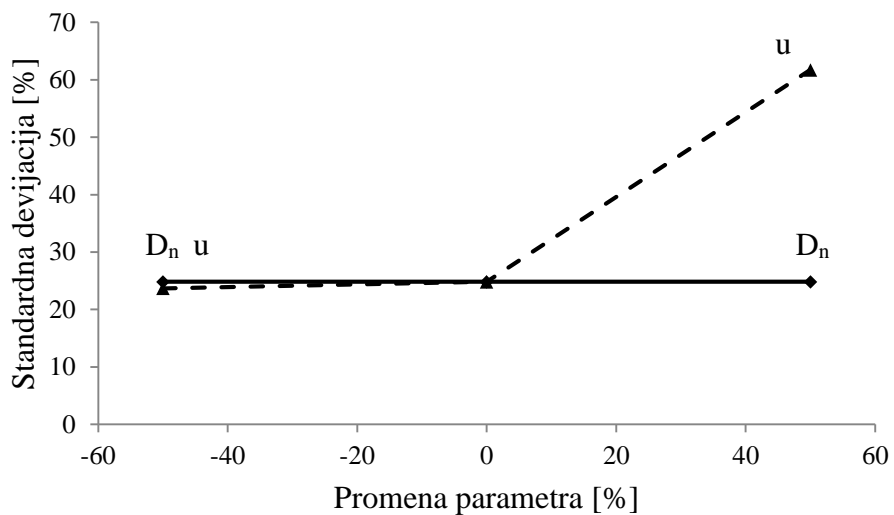
Slika 4.63. Koncentracija otpuštenog srebra iz pakovanog sloja Ag/alginatnih mikročestica u vodi (c_m) tokom vremena: eksperimentalni rezultati (simboli); predviđanja modela sa najmanjim kvadratima odstupanja (puna linija); Predviđanja modela difuzije (isprekidana linija) (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja)

Analiza osetljivosti modela izvedena je promenom parametara modela za $\pm 50\%$ od početne vrednosti. Radi poređenja, uporedo je analizirana osetljivost modela čiste difuzije iz Ag/alginatnih mikročestica u vodi koji je opisan u poglavlju 4.8.2.1. Pokazalo se da promena koeficijenta difuzije bitno utiče na odstupanje modela u statičkim uslovima (slika 4.64 a) ali neznatno na odstupanje modela pri protoku kroz pakovani sloj (slika 4.64 b). Jasno se uočava da je intersticijalna brzina strujanja fluida unutar hidrogela glavni parameter koji određuje otpuštanje nanočestica srebra u vodi u uslovima kontinualnog protoka, jer promenom ovog parametra za $+50\%$ standardna devijacija predviđanja modela od eksperimentalnih podataka dostiže i 60% (slika 4.64 b).

a)



b)



Slika 4.64. Analiza osetljivosti modela: standardne devijacije predviđanja modela od eksperimentalnih podataka pri promeni parametara modela za opuštanje srebra iz Ag/alginatnih mikročestica u dH_2O : a) statički uslovi, b) pakovani sloj uz kontinualni protok

4.8.3. Kinetika otpuštanja srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica proizvedenih iz koloidnog rastvora dobijenog hidrotermalnom sintezom

4.8.3.1. Suve Ag/alginatne mikročestice u statičkim uslovima u različitim simulantima hrane na bazi vode

U poglavlju 4.7.3.1. su prikazani rezultati otpuštanja srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica u različitim rastvorima (3 zap. % rastvor sirćetne kiseline, vodi, 10 zap. % etanol, 95 zap. % etanol) koji su ispitivani kao simulanti hrane na bazi vode. Pošto u ispitivanim rastvorima ne dolazi do reakcije nanočestica sa rastvorenim supstancama, a ukupna količina otpuštenog srebra je bila mala, može se pretpostaviti da je proces otpuštanja srebra kontrolisan difuzijom nanočestica i da se može opisati II Fikovim zakonom u obliku aproksimacije za početna vremena otpuštanja kada je $\frac{n_t}{n_0} < 0,4$ prema jednačini (1.16):

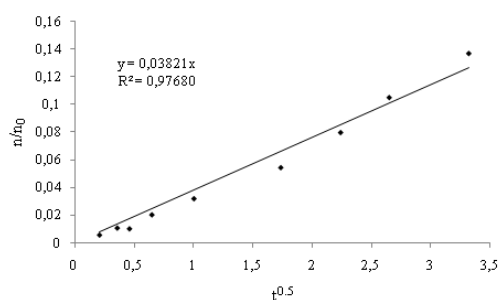
$$\frac{n_t}{n_0} = 6 \left(\frac{Dt}{\pi R^2} \right)^{0.5} \quad (1.16)$$

gde je n_t količina otpuštenog srebra u medijumu u toku vremena t , n_0 je maksimalna količina srebra koja može biti otpuštena iz Ag/alginatnih mikročestica, D je efektivan koeficijent difuzije nanočestica srebra i/ili jona kroz alginatni hidrogel i R je poluprečnik suvih Ag/alginatnih mikročestica usvojen prema izmerenim vrednostima kao 100 μm . Početna koncentracija srebra u mikročesticama je bila 1,22 mM. Jednačina (1.16) se može primeniti na eksperimentalne podatke u obliku zavisnosti n/n_0 od $t^{0.5}$ koji bi trebalo da pokažu linearni trend. Primena ove jednačine na eksperimentalne podatke otpuštanja srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica u ispitivanim rastvorima je prikazana na slici 4.65. U svim slučajevima su dobijene približno linearne zavisnosti ($R^2 > 0,85$) pri čemu je iz nagiba pravih moguće izračunati koeficijent difuzije nanočestica srebra prema jednačini (1.16). Koeficijent difuzije je povezan sa nagibom prave, k , prema jednačini:

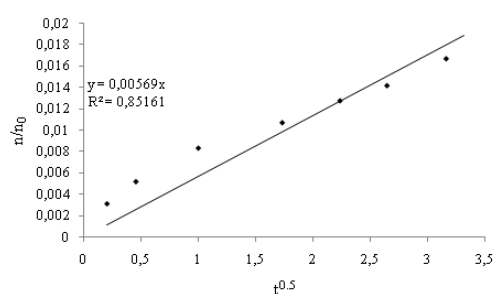
$$D = \frac{k^2 R^2 \pi}{36} \quad (4.31)$$

Predviđanja koncentracije otpuštenog srebra na osnovu tako određenih koeficijenta difuzije i zapremine medijuma u toku vremena su prikazani na slici 4.66, zajedno sa eksperimentalnim podacima. Jedino u slučaju 10 zap. % etanola linearna zavisnost ne prolazi kroz koordinatni početak. Ovaj rezultat se može objasniti naglim otpuštanjem srebra na početku postavke eksperimenta.

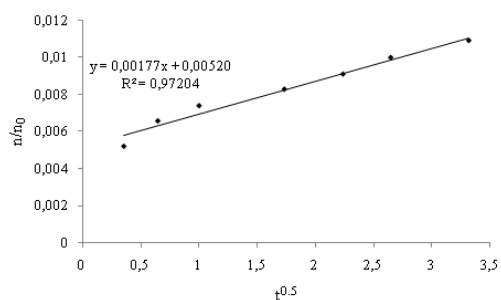
a)



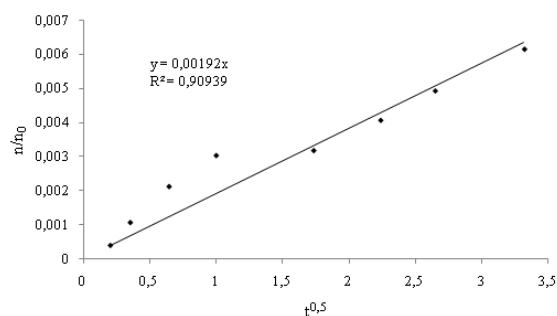
b)



c)

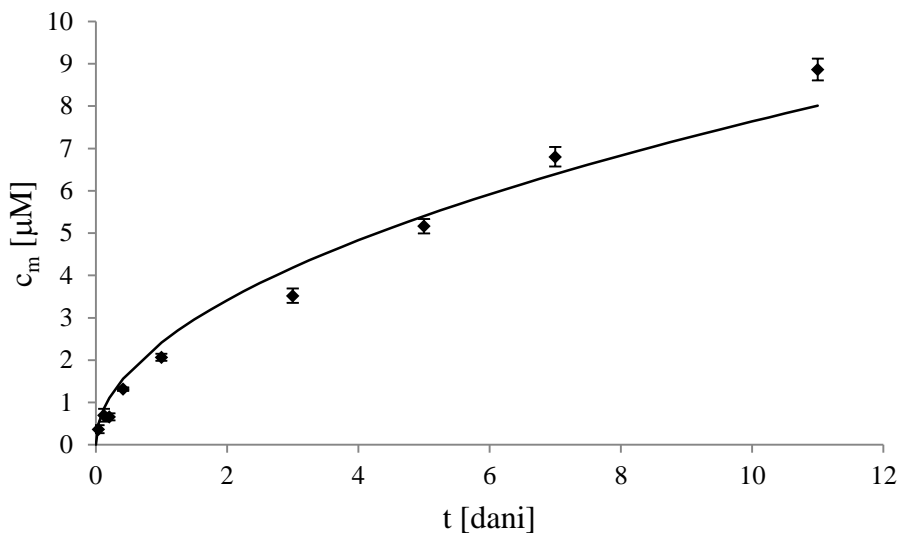


d)

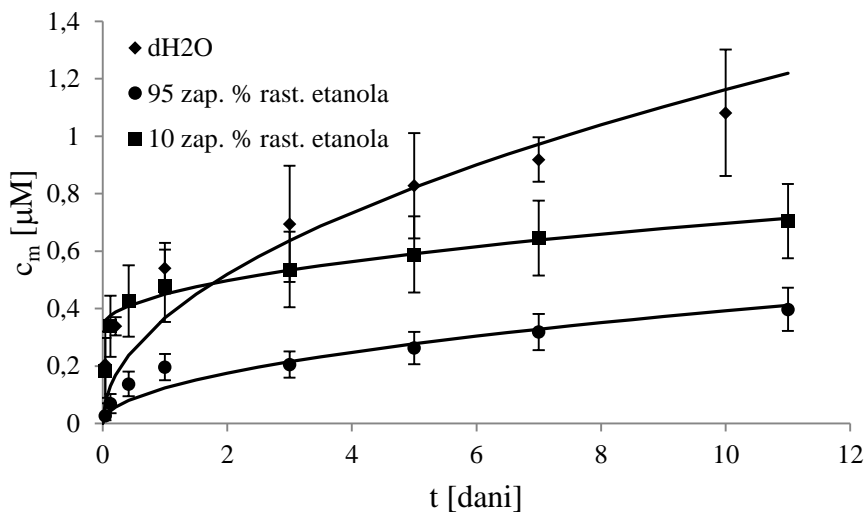


Slika 4.65. Primena modela unutrašnje difuzije na eksperimentalne rezultate otpuštanja srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica u: a) 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline, b) dH_2O , c) 10 zap. % rastvoru etanola i d) 95 zap. % rastvoru etanola

a)



b)



Slika 4.66. Koncentracije otpuštenog srebra (c_m) iz suvih Ag/alginatnih mikročestica na 20 °C tokom vremena u: a) 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline, b) dH₂O, 10 zap. % rastvoru etanola i 95 zap. % rastvoru etanola: eksperimentalni rezultati (simboli) i predviđanja modela (linije) (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja)

Efektivan koeficijent difuzije nanočestica srebra i/ili jona u Ag/alginatnim mikročesticama je bio najveći u slučaju otpuštanja srebra u rastvoru sirćetne kiseline i

iznosio je $1,47 \times 10^{-17} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (slika 4.66 a) dok su vrednosti koeficijenta difuzije u slučaju otpuštanja srebra u ostalim medijumima bili oko 2 reda veličine niži i to $0,33 \times 10^{-18} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ u destilovanoj vodi, $0,32 \times 10^{-19} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ u 10 zap. % rastvoru etanola i $0,37 \times 10^{-19} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ u 95 zap. % rastvoru etanola. Ovakav trend vrednosti koeficijenta difuzije je bio i očekivan. Etanol sa druge strane, dodatno dehidriše alginatni hidrogel i tako suzbija lance alginata smanjujući pore hidrogela i usporavajući difuziju bilo koje komponente kroz ovakvu strukturu (Torres i sar., 2011). Ipak, u slučaju kada je medijum bio 10 zap. % rastvora etanola, na početku se uočava naglo otpuštanje srebra slično kao u vodi ali se kasnije usporava u odnosu na vodu verovatno kao posledica uticaja etanola.

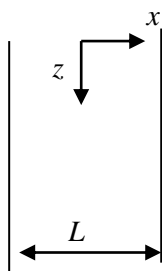
4.8.4. Modelovanje otpuštanja srebra iz PLA I PVA kompozitnih filmova u 3 % zap. Rastvoru sirćetne kiseline na 20 °C

Pošto je otpuštanje srebra iz Ag/alginatnih mikročestica bilo najveće u rastvoru sirćetne kiseline, kinetika otpuštanja srebra iz PLA i PVA kompozitnih filmova je ispitana u tom rastvoru.

Isti model difuzije nanočestica srebra baziran na II Fikovom zakonu otpuštanja komponenti iz filmova je primenjen i za ovaj slučaj pri čemu je primenjena aproksimacija za otpuštanje iz ravne ploče u x pravcu (slika 4.67) za kratka vremena $\frac{n_t}{n_0} \leq 0,6$ preko jednačine (1.13):

$$\frac{n_t}{n_0} = 4 \left(\frac{D_{ft}}{\pi L^2} \right)^{0,5} \quad (1.13)$$

gde je L je debljina filma definisana kao 270 μm na osnovu eksperimentalnih rezultata (tabela 4.1 i 4.2)



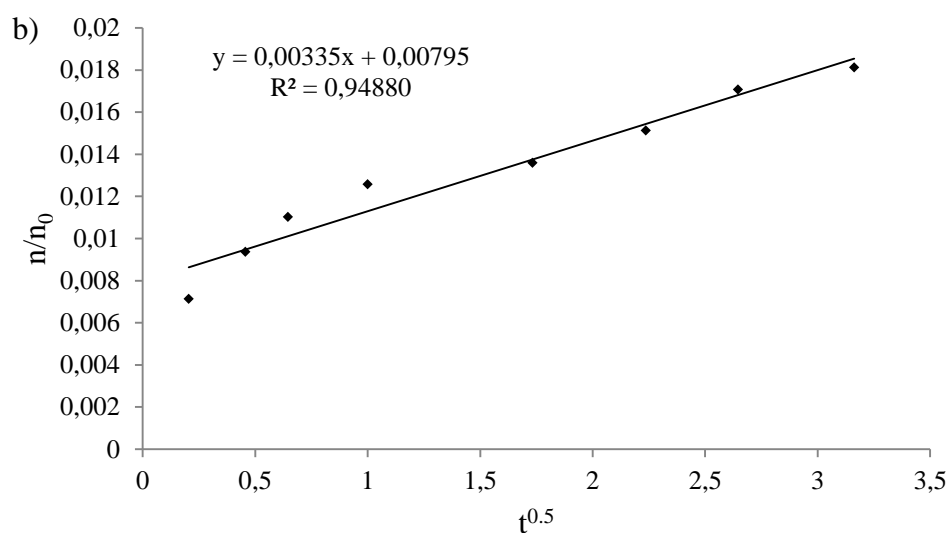
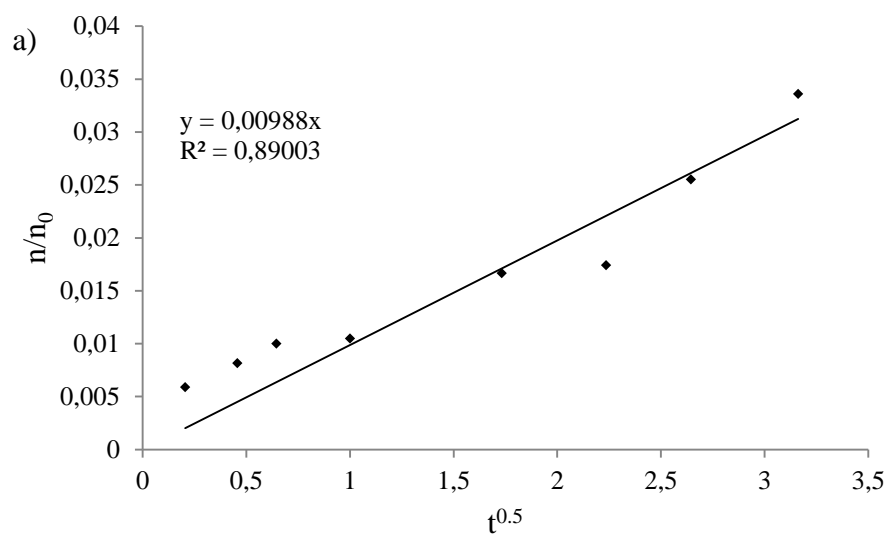
Slika 4.67. Geometrija filma korišćena za postavku matematičkog modela otpuštanja srebra iz PLA i PVA kompozitnih filmova difuzijom u x pravcu: L je debljina filma

Početna koncentracija srebra u PLA i PVA kompozitnim filmovima je bila $1,33 \pm 0,05$ mM i $1,16 \pm 0,07$ mM, redom. Jednačina (1.13) se može primeniti na eksperimentalne podatke u obliku zavisnosti n_t/n_0 od $t^{0,5}$ koji bi trebalo da pokažu linearni trend. Primena ove jednačine na eksperimentalne podatke otpuštanja srebra iz PLA i PVA kompozitnih filmova u 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline je prikazana na slici 4.68. I ovde su dobijene približno linearne zavisnosti ($R^2 > 0,9$) pri čemu u slučaju PVA filmova prava ne prolazi kroz koordinatni početak (slika 4.68 b). Ovaj rezultat se može objasniti naglim početnim otpuštanjem srebra usled bubrenja PVA filma u vodenim rastvorima. Nagib pravih, k , je povezan sa koeficijentom difuzije nanočestica i/ili jona srebra preko jednačine (1.13) tako da se dobija:

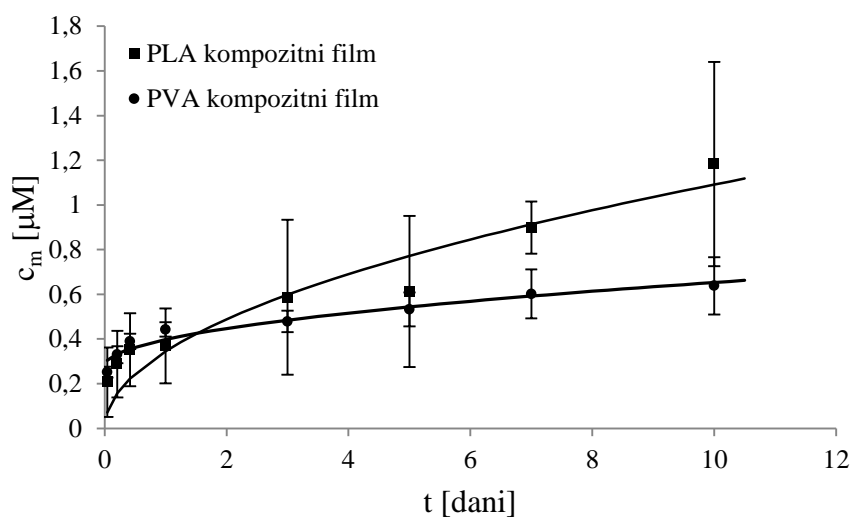
$$D_f = \frac{k^2 L^2 \pi}{16} \quad (4.32)$$

Efektivni koeficijenti difuzije nanočestica i/ili jona srebra u PLA i PVA kompozitnim filmovima uronjenim u 3 zap. % rastvor sirćetne kiseline na 20 °C su tako izračunati kao $1,6 \times 10^{-17} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ i $2,4 \times 10^{-18} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ redom. Vrednost određena za PLA film odgovara vrednosti od $1,47 \times 10^{-17} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ dobijenoj za suve Ag/alginate mikročestice. Niža vrednost dobijena za PVA filmove nije očekivana uzevši u obzir da linearna zavisnost ne prolazi kroz koordinatni početak (slika 4.68b) može se zaključiti da jednostavan model difuzije opisan jednačinom (4.13) nije promenljiv u ovom slučaju.

Na osnovu izračunatih koeficijenata difuzije D_f , zamenom u jednačinu (1.13) dobijaju se predviđanja modela koja opisuju otpuštanje srebra iz PLA i PVA kompozitnih filmova (slika 4.69).



Slika 4.68. Primena modela unutrašnje difuzije na eksperimentalne rezultate otpuštanja srebra u 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline iz: a) PLA kompozitnih fimova i b) PVA kompozitnih filmova.



Slika 4.69. Koncentracije otpuštenog srebra (c_m) iz PLA i PVA kompozitnih filmova na 20 °C tokom vremena u 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline, eksperimentalni rezultati (simboli), i predviđanja modela (linije) (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja)

5. DISKUSIJA

Cilj ove doktorske disertacije je bio ispitivanje kinetike i mehanizma otpuštanja srebra iz alginatnih hidrogelova u različitim uslovima za potencijalnu primenu u medicini ali i u pakovanju za hranu. U skladu sa tim, razvijeni su i uspešno primenjeni matematički modeli koji su uključili difuziju nanočestica srebra, njihovu oksidaciju kao i reakciju sa jonima hlora iz fiziološkog rastvora i difuziju nagrađenih $\text{AgCl}_x^{(x-1)-1}$ formi. Razvijeni su novi kompozitni filmovi na bazi PLA i PVA sa Ag/alginatnim mikročesticama atraktivni za primenu kao antimikrobna pakovanja hrane. Otpuštanje srebra iz ovih kompozitnih filmova je ispitano u simulantima za hranu na bazi vode.

Nanočestice srebra su u ovom radu sintetisane u rastvorima alginata primenom dve metode: elektrohemijskom sintezom i hidrotermalnom redukcijom jona srebra. Nanočestice srebra sintetisane elektrohemijskom metodom u rastvoru alginata niske viskoznosti su bile prečnika od oko 30 nm (Jovanovic i sar., 2012). Ipak, u rastvoru alginata srednje viskoznosti dobijene su sitnije nanočestice čiji je prečnik u slučaju elektrohemijske sinteze iznosio oko 3 nm dok je u slučaju hidrotermalne sinteze iznosio oko 17 nm. U literaturi je pokazano da povećanje udela polimera u rastvoru pa tako i viskoznosti rastvora, dovodi do smanjenja veličine nanočestica (Cui i sar., 2006). Razlika između hidrotermalne i elektrohemijske metode je i u viskoznosti dobijenog koloidnog rastvora. Tako se hidrotermalnom metodom zbog tretmana alginatnog rastvora u autoklavu, viskoznost smanjila sa 2 Pas na ~ 0,03 Pas, dok elektrohemijska sinteza nema primetnog uticaja na viskoznost. Tokom autoklaviranja alginatnog rastvora dužina lanaca alginata se drastično smanjuje kao što je pokazano u literaturi (Larsen i sar., 2015, Leo i sar., 1990, Tan i sar., 2009). Iako se dobija koloidni rastvor srebra veoma niske viskoznosti, moguće je razblaživanjem koloidnog rastvora rastvorom alginata veće viskoznosti dobiti koloidne rastvore različitih viskoziteta. Procedura hidrotermalne sinteze nanočestica predložena u literaturi (Yang i Pan, 2012) je u ovom radu malo izmenjena uz dodatak natrijum-citrata kao dobrog stabilizatora nanočestica (Bastus et al., 2014). Ova metoda se pokazala kao veoma jednostavna, uz prisustvo AgNO_3 i Na-citrata kao jedinih hemikalija pored Na-alginata pri čemu se dobija potpuno sterilan materijal neutralne pH. Da bi se dobila što uniformnija raspodela nanočestica srebra i uklonili veći agregati, bilo je neophodno da se dobijeni koloidni rastvor posle autoklaviranja centrifugira. Centrifugiranje koloidnog rastvora posle sinteze je najčešće korišćeno za izdvajanje nanočestica iz rastvora (Yang i Pan,

2012, Agnihotri i sar., 2014, Sun i sar., 2002, Hu i sar., 2010, Lu i Chou, 2010). U ovom radu je centrifugiranje korišćeno za izdvajanje agregata koji su nastali tokom sinteze, a u supernatantu su onda zaostale fino dispergovane nanočestice veličina u opsegu 10 – 20 nm. Ukupna koncentracija srebra u koloidnom rastvoru nakon hidrotermalne sinteze je iznosila $4,36 \pm 0,28$ mM, ali se nakon centrifugiranja u supernatantu smanjila oko 4 puta i iznosila je $1,16 \pm 0,03$ mM. Maksimalna apsorbanca koloidnog rastvora nakon sinteze je bila $0,87 \pm 0,03$, a nakon centrifugiranja $0,52 \pm 0,02$, što znači da se koncentracija nanočestica smanjila oko 1,7 puta. Ovo je jasan pokazatelj da se u toku hidrotermalne sinteze stvaraju pored nanočestica srebra i neke druge forme srebra odnosno agregati koji nisu pokazivali optička svojstva. U proceduri predloženoj u literaturi, od početne koncentracije AgNO_3 od 1,2 mM u ~ 0,02 mas. % rastvoru natrijum-alginata, hidrotermalnom sintezom su dobijene nanočestice srebra, koje su centrifugirane i redispergovane u 0,05 mas. % rastvor natrijum-alginata bez dodavanja natrijum – citrata (Yan i Pan, 2012). Autori nisu uočili nikakvu pojavu agregata ili većih klastera, ali su zato pokazali kako se sa vremenom i uz porast temperature u toku hidrotermalne metode dobijaju nanočestice srebra različitih veličina i oblika. Za dobijanje hidrogelova alginata iz koloidnog rastvora potrebna je veća koncentracija alginata u opsegu 1 – 2 mas. %. Dobijeni rezultati u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju da je hidrotermalnu sintezu potrebno optimizovati kako bi se smanjila agregacija srebra u toku sinteze i smanjili gubici, a koncentracija alginata bila oko željene vrednosti ~ 2 mas. %. Treba istaći, prednost hidrotermalne metode u odnosu na elektrohemijsku sintezu je dobijanje sterilnog koloidnog rastvora, dok je nakon elektrohemijske sinteze koloidni rastvor potrebno dodatno sterilisati za medicinsku primenu. Takođe, pH vrednost koloidnog rastvora sintetisanog hidrotermalnom metodom je neutralna, dok je koloidni rastvor sintetisan elektrohemijskom metodom ima bazan što je od bitnog značaja za primenu u zarastanju rana. pH vrednost hronične rane koja ne zarasta se kreće od 7,15 do 8,9 (Gethin, 2008). Kiselost u tkivu rane ubrzava njeno zarastanje, jer se povećava procenat kiseonika, njegovim oslobađanjem iz hemoglobina iz kapilara (Rendel i sar., 2001), a inhibira se aktivnost proteinaze, koja usporava ili sprečava zarastanje rana, jer negativno deluje na faktore rasta, proteinska vlakna i fibronektin u matriksu rane koji je pak neophodan za aktivaciju fibroblasta i njihovu migraciju (Rushton, 2007).

Ag/alginate koloidne rastvore sintetisane pomoću obe metode je moguće gelirati u prisustvu dvovalentnih katjona, a posebno su u ovom radu dobijene Ag/alginate mikročestice primenom elektrostatičke ekstruzije. Zbog veće viskoznosti iz koloidnog rastvora sintetisanog elektrohemijском metodom dobijene su mikročestice prečnika $570 \pm 60 \mu\text{m}$, dok se sušenjem dobijaju mikročestice prečnika $400 \pm 50 \mu\text{m}$. Sa druge strane, iz koloidnog rastvora sintetisanog hidrotermalnom metodom dobijene su sitnije mikročestice prečnika $260 \pm 30 \mu\text{m}$, dok su sušenjem dobijene mikročestice prečnika $190 \pm 20 \mu\text{m}$. Uticaj viskoznosti na veličinu mikročestica je potvrđen i u literaturi (Klokk i Melvik, 2002). Apsorbanca rastvorenih suvih mikročestica se u odnosu na apsorbancu vlažnih mikročestica smanjila neznatno i to za 6,6 %, odnosno 5,4 % u slučaju koloidnog rastvora sintetisanog elektrohemijском, odnosno hidrotermalnom metodom, redom, što je fenomenološki uočeno i u ranijim studijama (Stojkowska et al., 2014). Ovaj rezultat ukazuje na očuvanje nanočestica tokom sušenja. Geliranjem oba tipa koloidnog rastvora u toku elektrostatičke ekstruzije dolazi do koncentrovanja srebra u Ag/alginatnim mikročesticama i to 1,7 puta u slučaju čestica napravljenih od koloidnog rastvora sintetisanog elektrohemijском metodom i 2,1 put u slučaju čestica napravljenih od koloidnog rastvora sintetisanog hidrotermalnom metodom. Ova pojava je i bila očekivana zbog sinerezisa, fenomena da tokom geliranja hidrogela dolazi do izbacivanja vode zbog skupljanja lanaca polimera (Martinsen i sar., 1989). Pri tome je malo veća kontrakcija uočena u slučaju koloidnog rastvora dobijenog hidrotermalnom metodom usled niže viskoznosti.

Jedan od osnovnih ciljeva ove teze je bio ispitivanje mehanizma i kinetike otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih hidrogelova u sredini relevantnoj za biomedicinsku primenu. Odabrane su Ag/alginate mikročestice sa elektrohemijски sintetisanim nanočesticama srebra i ispitivane u fiziološkom rastvoru kao modelu bioloških fluida. Pri tome je primenjen sistematičan i postupan pristup tako da je prvo određen koeficijent difuzije nanočestica i/ili jona srebra kroz matriks alginatnog hidrogela na osnovu ispitivanja otpuštanja u vodi, a zatim je razvijen komplikovaniji model otpuštanja srebra u fiziološkom rastvoru. Pri tome je otpuštanje srebra ispitivano i u različitim hidrodinamičkim uslovima kako bi se imitirali i uslovi potencijane primene nanokompozita kao na primer u oblogama za rane i statičkim uslovima ili pri implantaciji u vaskularizovano tkivo u uslovima proticanja fluida.

Koeficijent difuzije nanočestica srebra dimenzija od 10 - 30 nm u Ag/alginatnim mikročesticama napravljenim od alginata niske viskoznosti ispitivanim u vodi u statičkim uslovima je određen kao $6,9 \times 10^{-19} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, dok je ta vrednost iznosila $4,6 \times 10^{-19} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ za difuziju nanočestica dimenzija $\sim 4 \text{ nm}$ iz Ag/alginatnih mikročestica napravljenih od alginata srednje viskoznosti. Iako je očekivano da koeficijent difuzije većih nanočestica bude manji od koeficijenta difuzije sitnijih nanočestica slične vrednosti dobijene u ovom radu su verovatno posledica različite viskoznosti primenjenih alginata koje su posredno uticale na način geliranja alginatnih lanaca. U uslovima mešanja tečnosti u vodenom kupatilu koeficijent difuzije nanočestica srebra u Ca-alginatnog hidrogela napravljenom od alginata srednje viskoznosti je bio veći i iznosio je $1,27 \times 10^{-18} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ što ukazuje na smanjen otpor prenosu mase u filmu tečnosti oko mikročestice. U literaturi se može naći vrednost koeficijenta difuzije nanočestica zlata u hidrogelu poli(etilen glikola) u opsegu $(0,5 - 40) \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ što je zavisilo od udela polimera u hidrogelu i veličine nanočestica (Hume i Jeerage, 2013). Pri tome, nanočestice zlata veće od 30 nm nisu mogle da difunduju kroz hidrogel (Hume i Jeerage, 2013). Na osnovu eksperimentalnih podataka, zaključeno je da nanočestice zlata prečnika od 10 – 30 nm mogu da difunduju kroz 5 – 10 mas. % PEG hidrogel, dok kroz 20 mas. % PEG hidrogel, mogu da difunduju jedino nanočestice manje od 10 nm (Hume i Jeerage, 2013). Vrednosti koeficijentata difuzije nanočestica srebra u vlažnim Ag/alginatnim mikročesticama u vodi određene u ovoj disertaciji su značajno manje od literaturnih podataka za koeficijentate difuzije nanočestica srebra u vodi, biofilmovima (Peulen i Wilkinson, 2011) i u embrionu zebra ribe (Lee i sar., 2007) koji su iznosili oko $10^{-10} - 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Difuzivnost supstance unutar hidrogela zavisi od mnogih parametara kao što su dimenzije molekula ili čestice, dimenzije pora i struktura samog matriksa. Tako je koeficijent difuzije nanočestica silicijum dioksida unutar hidrogela poliakrilamid bilo $10^{-13} - 10^{-15} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ u zavisnosti od stepena umreženosti hidrogela (Rose i sar., 2013) dok je koeficijent difuzije nanočestica lateksa prečnika 20 nm u 1 mas % hidrogelu Ca-alginata određena kao $3,3 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (Holte i sar., 2007). Dimenzije pora u Ca-alginatnom hidrogelu reda veličine 10 – 20 nm (William i Harold, 1993, Fundueanu i sar., 1999) omogućavaju nesmetanu difuziju. Ipak, difuzija je bila znatno otežana, jer je pokazano da su nanočestice srebra sintetisane elektrohemijском metodom dobro stabilisane hidroksilnim grupama, kao i kiseonikom u okviru oba tipa uronskih jedinica

u lancima alginata (Jovanovic i sar., 2012). Takođe, pokazano je da Ca-alginatni hidrogelovi mogu da apsorbuju jone srebra i da ih redukuju do Ag^0 verovatno učešćem hidroksilnih funkcionalnih grupa (Torres i sar., 2005). Ova istraživanja dovode do zaključka da su nanočestice srebra dobro stabilisane u Ag/alginatnom hidrogelu pa je zato došlo do veoma slabog otpuštanja ukupne količine srebra u vodi sa vrlo niskim koeficijentima difuzije nanočestica.

Ipak, u prisustvu toka fluida, nanočestice srebra su spirane iz hidrogela pri čemu je primenom matematičkog modela difuzije i konvekcije određena intersticijalna brzina fluida kroz hidrogel od $4,6 \text{ nm s}^{-1}$. U ranijim istraživanjima je pokazano da je ipak difuzija bila limitirajući korak u otpuštanju nanočestica srebra iz Ag/poli(N-vinil-2-pirolidona) u statičkim uslovima ali i u uslovima kontinualnog protoka (Jovanovic i sar., 2013). U navedenom radu je pokazano da tokom strujanja fluida, fluid struji oko gela, i ne utiče na otpuštanje srebra (Jovanovic i sar., 2013). Ipak u ovoj tezi je na osnovu eksperimentalnih rezultata i matematičkog modelovanja pokazano da je moguće da fluid protiče kroz sam hidrogel i da tako odnosi nanočestice srebra, jer je poznato da Ca-alginatni hidrogelovi imaju pore dimenzija od 10 nm (William i Harold, 1993) do 20 nm (Fundueanu i sar., 1999). Dobijena mala brzina proticanja fluida kroz hidrogel je uticala na znatno, i to oko 8 puta veće otpuštanje nanočestica u poređenju sa statičkim uslovima. Dobijen rezultat je naročito značajan i sa stanovišta primene, jer se vrednosti intersticijalnih brzina strujanja telesnih tečnosti u tkivima kreću u opsegu od $0,1 - 4 \mu\text{m s}^{-1}$ (Scallan i sar., 2010). Ukoliko bi se Ag/alginatni hidrogel našao u organizmu kao implantat mogli bi se očekivati efekti protoka fluida kroz hidrogel određeni u ovoj tezi. Tako je, na primer, pokazano da kvantne tačke mogu biti transportovane konvektivnim prenosom od epitela do regionalnih limfnih čvorova i tako izazvati zapaljenski proces (Dukhin i Labib, 2013).

U slučaju modelovanja kinetike otpuštanja srebra u fiziološkom rastvoru postavljene su dve parcijalne diferencijalne jednačine koje opisuju dva procesa koji se paralelno odvijaju. Prva jednačina je predstavljala difuziju nanočestica srebra iz Ag/alginatnih mikročestica uz oksidaciju usled prisustva jona hlora, a druga nastajanje i difuziju $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$. Usvojen je koeficijent difuzije nanočestica srebra kroz alginatni hidrogel određen na osnovu prethodnih istraživanja otpuštanja srebra u vodi. Model je uključio

dva nezavisna parametra: koeficijent brzine nestajanja nanočestica i prividni koeficijent difuzije formi $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$. Analiza Osetljivosti modela je pokazala da je difuzivnost nanočestica srebra kroz alginatni hidrogel zanemarljiv fenomen u odnosu na kinetiku oksidacije nanočestica srebra i difuziju $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ formi nagrađenih u Ag/alginatnom hidrogelu u fiziološkom rastvoru. Dobijeni su koeficijenti brzine nestajanja nanočestica u opsegu od 10^{-6} - 10^{-5} s^{-1} koji su u skladu sa prethodno objavljenim vrednostima u literaturi za koeficijente oksidacije nanočestica srebra stabilisanih citratom (Liu i Hurt, 2010), zatim u acetatnom puferu (Liu i sar., 2010) i u Hoglandovom medijumu (Zhang i sar., 2011). Za nanočestice srebra stabilisane u rastvoru poli(vinil piroolidona), konstante oksidacije je bila i niža i iznosila od 10^{-8} – 10^{-7} s^{-1} (Kittler i sar., 2010). Vrednosti konstante oksidacije nanočestica su uglavnom zavisile od veličine nanočestica, njihove stabilizacije i ostalih eksperimentalnih uslova (Zhang i sar., 2011). Fenomen interakcije nanočestica srebra sa jonima hlora u vodenim rastvorima je veoma složen, jer se pored oksidacije nanočestica srebra odvija i proces agregacije nanočestica (Espinoza i sar., 2012). Koji će se proces odvijati u većoj meri zavisi od koncentracije jona hlora. Tako je u rastvoru NaCl pri koncentraciji manjoj od 27 mM primećena oksidacija nanočestica srebra stabilisanih citratom, a pri koncentraciji većoj od 27 mM, došlo je do agregacije nanočestica u rastvoru (Espinoza i sar., 2012). Oksidacija nanočestica srebra uz prisustvo kiseonika se odvija prvo stvaranjem Ag_2O na površini nanočestice, a zatim i lakšim razlaganjem na Ag^+ jone (Li i sar., 2010). U prisustvu jona hlora, dolazi do bržeg rastvaranja Ag_2O (Li et al. 2010). Uočeno je da se talog AgCl stvara i deponuje na površini nanočestica srebra stabilisanih natrijum-borohidratom (NaBH_4) (El Badawy i sar., 2010) što rezultira pojavom agregata blago rastvorenih nanočestica (Li et al. 2010). Odnos Ag^+ i Cl^- jona određuje koji će oblik $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ formi nastati kao što su AgCl^{2-} , AgCl_2^{2-} , i AgCl_4^{3-} (Levard i sar., 2013). U zavisnosti od koncentracije Cl^- jona i molskog odnosa Cl/Ag jona u rastvoru postoji mogućnost da prevlada ili talog AgCl ili navedeni kompleksni joni AgCl_3^{2-} , AgCl_2^- i AgCl_4^{3-} . Pokazano je da ako je odnos Cl/Ag < 2670, preovladava talog AgCl, ali ukoliko je Cl/Ag > 26750, onda preovlađuju kompleksi srebra (Levard i sar., 2013). U ovom radu, očekivano je da će se najpre stvoriti talog AgCl, jer je odnos Cl/Ag bio manji od 535, odnosno u opsegu 150 - 230. Tačnije, za vlažne mikročestice u statičkim uslovima, u uslovima sa mešanjem i suve

mikročestice u statičkim uslovima, u fiziološkom rastvoru gde je koncentracija jona hlora 154 mM, odnos Cl/Ag je izračunat kao 154, 148 i 229 redom.

Prividni koeficijenti difuzije $\text{AgCl}_{(s)}$ i formi $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ iz Ag/alginatnih mikročestica u fiziološkom rastvoru određeni u ovom radu su zavisili od uslova izvođenja eksperimenata. Tako je za vlažne mikročestice u statičkim uslovima ovaj koeficijent bio najveći iznosio je $3,9 \times 10^{-14} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ dok je za suve Ag/alginatne mikročestice ta vrednost bila najmanja i iznosila je $2,9 \times 10^{-17} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Istovremeno je brzina oksidacije nanočestica srebra bila obrnuto proporcionalna i najmanja u slučaju vlažnih Ag/alginatnih mikročestica u statičkim uslovima, jer je transport jona hlora bio limitiran difuzijom i kroz film tečnosti, i kroz mikročesticu. Najveća brzina oksidacije nanočestica srebra je bila u slučaju suvih Ag/alginatnih mikročestica koje u fiziološkom rastvoru naglo bubre što dovode do konvektivnog prenosa jona hlora kroz Ag/alginatnu matricu. Prema tome, sa povećanjem koeficijenta oksidacije u ispitivanim sistemima, koeficijent difuzije $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ formi je opadao, verovatno zbog naglog i brzog taloženja i rasta kristala $\text{AgCl}_{(s)}$ unutar Ag/alginatnih mikročestica čime je difuzija bila otežana.

Mehanizam otpuštanja srebra iz nanokompozitnih Ag/alginatnih hidrogelova je ispitan i u uslovima relevantnim za implantaciju u meka tkiva. Uspostavljen je sistem u kome je Ag/alginatni hidrogel bio u direktnom kontaktu sa alginatnim hidrogelom koji bi predstavljao imitaciju mekog tkiva u okolini implantata. Pri tome je ovaj sistem posebno relevantan za tretmane defekata hrskavice čije površine mogu da dostignu vrednosti od 2 - 3 cm^2 do 14 cm^2 (Kon i sar., 2013). Otpuštanje srebra u ovim uslovima je bilo malo i iznosilo svega 0,7 % od ukupne početne količine nanočestica srebra u Ag/alginatnom disku. Ovaj mali procenat otpuštenog srebra može biti rezultat dobro stabilisanih nanočestica u rastvoru alginata tokom elektrohemijske sinteze (Jovanovic i sar., 2012). Tokom eksperimenta, u alginatnim diskovima su uočeni agregati veličine od oko 400 nm. Sličan fenomen je prikazan i u primeni komercijalne obloge za rane "Acticoat™ flex 3" (Smith and Nephew, Velika Britanija) koja sadrži nanočestice srebra koje su u direktnom kontaktu sa tkivom rane. U toj studiji je uočeno prisustvo nanočestica srebra u okolnom tkivu i u ćelijama ali to nije uticalo na zarastanje rane (Rigo i sar., 2013). Takođe, slična zapažanja su objavljena i pri ispitivanju uticaja nanočestica srebra na koren soje gde je uočeno taloženje nanočestica srebra veličine od

20 – 50 nm na korenu i formiranje agregata veličina od nekoliko mikrona do 25 μm (Quah i sar., 2015). Takođe pokazana je i difuzija nanočestica srebra iz okolnog rastvora početne koncentracije od 1 mM ili 0,5 mM u hidrogel metakrilata dajući koncentracije 10 – 14 $\mu\text{g Ag g}^{-1}$ gela nakon 6 dana (Gonzalez-Sanchez i sar., 2015). Autori su pretpostavili da čestice uglavnom ostaju na površini hidrogela, ali da, kako vreme prolazi, migriraju i u unutrašnjost hidrogela (Gonzalez-Sanchez i sar., 2015). Opisani rezultati su slični rezultatima dobijenim u ovom radu gde je dobijena koncentracija srebra od $\sim 4 \text{ mg g}^{-1}$ gela već u početnoj fazi eksperimenta i nije se zatim mnogo menjala u toku 14 dana, a najveći agregati nanočestica su primećeni na izloženoj površini hidrogela. Stabilnost nanočestica srebra i slabo otpuštanje dobijeno u ovom radu pokazuju da Ag/alginatni hidrogelovi mogu imati potencijalnu primenu kao antimikrobni implantati i prevlake. Tako je na primer pokazano da nanokompozitna prevlaka od nanočestica srebra i polimera poli(DL-laktid-ko-glikolida) na implantima na bazi čelika ispoljava antimikrobna i osteoinduktivna svojstva u *in vitro* i *in vivo* uslovima (Liu i sar., 2012).

Potencijalna primena nanokompozitnih Ag/alginatnih hidrogelova je u ovoj doktorskoj disertaciji ispitana i u pogledu dobijanja novih složenijih materijala sa multifunkcionalnim svojstvima. Tako su Ag/alginate mikročestice kao najjednostavniji oblik za matematičko opisivanje mešane sa rastvorima PLA i PVA kako bi se dobili kompozitni filmovi. Ovi filmovi su atraktivni za primenu u pakovanju hrane zbog svoje slabe propustljivosti za gasove i dobre mehaničke čvrstoće (Mutsuga i sar., 2008, Piergiovanni i Limbo, 2010). Za tu primenu neophodno je odrediti migraciju i otpuštanje nanočestica i jona srebra iz pakovanja u hranu što je definisano odgovarajućim standardima. Stoga su u ovom radu dobijeni kompozitni PVA i PLA filmovi sa nanokompozitnim Ag/alginatnim mikročesticama sa nanočesticama srebra sintetisanim hidrotermalnom metodom kao jeftinom metodom, koja daje veliki prinos i za koju je pokazano da daje odličnu kristaliničnost nanočestica sa kontrolisanom veličinom i morfologijom (Haw i sar., 2010). Dobijeni filmovi su zatim ispitani u pogledu otpuštanja srebra u simulantima hrane na bazi vode. Kao simulanti korišćeni su: 3 % rastvor sirćetne kiseline, destilovana voda, 10 % rastvor etanola i 95 % rastvor etanola prema standardu (Commission Regulation (EU) No 10/2011).

Kao prvi korak ispitano je otpuštanje srebra iz samih suvih Ag/alginatnih mikročestica u simulante za hranu, a potom su ti rezultati korišćeni pri ispitivanju otpuštanja srebra iz kompozitnih filmova.

Najveće otpuštanje srebra je bilo u rastvoru sirćetne kiseline, što je i pretpostavljeno i prikazano u literaturi (Hauri i Niece, 2011, Goetz i sar., 2013, Song i sar., 2011). Ovaj rezultat se može objasniti brзом oksidacijom nanočestica srebra u kiseloj sredini (Peretyazhko i sar., 2014). I na rezultate otpuštanja srebra u ovoj eksperimentalnoj seriji primenjen je model unutrašnje difuzije i određeni su koeficijenti difuzije unutar suvih Ag/alginatnih mikročestica u opsegu $3 \times 10^{-20} - 3 \times 10^{-19} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ za vodu i rastvore etanola dok je za rastvor sirćetne kiseline ova vrednost bila nešto veća i iznosila je $\sim 1,5 \times 10^{-17} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Ove vrednosti su približno reda veličine kao koeficijent difuzije određen za difuziju nanočestica srebra iz vlažnih Ag/alginatnih mikročestica sa elektrohemijski sintetisanim nanočesticama koji je iznosio $1,27 \times 10^{-18} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.

Pošto je dobijeno najveće otpuštanje srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica u rastvoru sirćetne kiseline, ovaj medijum je izabran za ispitivanje kinetike otpuštanja iz PLA i PVA kompozitnih filmova na $20 \text{ }^\circ\text{C}$ tokom 10 dana. Početna koncentracija srebra u kompozitnim filmovima je bila $0,20 \pm 0,01 \text{ mg Ag g}^{-1}$ filma ($0,020 \pm 0,001 \text{ mas. } \%$) što je značajno niže od maksimalne dozvoljene početne koncentracije srebra u filmu kao materijalu za pakovanje hrane ($5 \text{ mas. } \%$) (Simon et al., 2008). Na rezultate otpuštanja primenjen je pojednostavljen model unutrašnje difuzije i koeficijenti difuzije srebra u PLA i PVA kompozitnim filmovima u rastvoru sirćetne kiseline su određeni kao $1,60 \times 10^{-17} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ i $2,56 \times 10^{-18} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ redom. Dobijena vrednost za PLA film je veoma bliska vrednosti određenoj za same suve Ag/alginatne mikročestice u istom rastvoru ($1,47 \times 10^{-17} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$), što ukazuje na sličnu strukturu polimerne matrice. Količina otpuštenog srebra iz kompozitnih filmova je bila oko ~ 4 puta niža od količine otpuštene iz približno iste mase suvih Ag/alginatnih mikročestica. Na taj način, PLA i PVA film služi kao barijera za otpuštanje nanočestica srebra. Sporije otpuštanje i niža vrednost koeficijenta difuzije u PVA filmovima u odnosu na PLA filmove nije očekivana i verovatno predstavlja eksperimentalnu grešku pogotovo zato što su PVA filmovi bubrili u svim ispitivanim vodenim rastvorima osim u $95 \text{ zap. } \%$ rastvoru etanola.

Ipak, izmerene koncentracije otpuštenog srebra u rastvoru sirćetne kiseline ($0,07 - 0,13 \mu\text{g Ag g}^{-1}$) izlaze van okvira dozvoljenih regulativom propisanih vrednosti ($0,05 \mu\text{g Ag g}^{-1}$). Sa druge strane, otpuštene koncentracije srebra iz PLA i PVA kompozitnih filmova u ostalim ispitivanim simulantima hrane u toku 10 dana su bile niže od propisane vrednosti od $0,05 \mu\text{g Ag g}^{-1}$, i oko ~ 3 puta niže od koncentracije srebra otpuštene iz suvih Ag/alginatnih mikročestica. Pri tome je koncentracija otpuštenog srebra iz filmova u rastvorima etanola i vodi rasla sa porastom temperature što je očekivano i objašnjeno u literaturi (Sanches Silva i sar., 2007).

U literaturi se mogu naći vrednosti koeficijenta difuzije nanočestica srebra iz raznih pakovanja koje su uglavnom niže od vrednosti određenih za PLA i PVA kompozitne filmove u ovom radu. Tako su koeficijenti difuzije nanočestica srebra određeni za polietilen niske i visoke gustine iznosili oko $10^{-19} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, za polipropilen oko $10^{-20} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, a za PET ambalažu i polistiren su te vrednosti bile manje od $10^{-23} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (Simon i sar., 2008). Koeficijent difuzije jona srebra iz PLA filmova sa početnom koncentracijom nanočestica od 1 mas. % u izooktanu i 10 zap. % rastvoru etanola je određen kao $4,5 \times 10^{-24} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (Fortunati i sar., 2013). Dodavanjem celuloznih nanokristala sa površinski aktivnom materijom u koncentraciji od 1 – 5 mas. % povećan je koeficijent difuzije jona srebra iz PLA kompozitnih filmova od $1,7 \times 10^{-20} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ do $7,4 \times 10^{-20} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (Fortunati i sar., 2013). Ipak, u navedenom radu su otpuštene koncentracije srebra nakon 10 dana bile veće od maksimalne dozvoljene regulativom od $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ simulanta hrane (Fortunati et al., 2013). Ispitivana je i difuzija jona srebra u simulante za hranu iz kompozitnih PLA filmova koji su sadržali 5 mas. % čestica zeolita veličine $2,5 \mu\text{m}$ sa adsorbovanim jonima srebra sa masenim udelom od 2,5 % (Fernandez et al., 2010). Koeficijent difuzije jona srebra iz filmova u 95 mas. % rastvor etanola je bio $4,5 \times 10^{-18} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, u 10 mas. % rastvor etanola je bio $2,3 \times 10^{-17} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, u destilovanoj vodi je bio $4,5 \times 10^{-16} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ i u 3 mas. % sirćetnoj kiselini je bio $1,6 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, a otpuštene koncentracije nakon 24 h su bile niže od dozvoljene osim u slučaju rastvora sirćetne kiseline (Fernandez i sar., 2010). Ovi rezultati su generalno slični rezultatima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji pri čemu su vrednosti koeficijenta difuzije za 1 do 2 reda veličine bili viši. Pored ispitivanja migracije nanočestica srebra u simulante hrane koji su propisani regulativom od strane EU (Commission Regulation (EU) No 10/2011), u nekim studijama je ispitivana migracija nanočestica srebra u uzorke hrane. Tako su

vrednosti koeficijenta difuzije nanočestica srebra iz polietilena u mleveno meso, svinjski vrat i pileće meso iznosile $\sim 10^{-14} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, $10^{-16} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ i $10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, redom (Sanches Silva i sar., 2007). U drugoj studiji, sa početnom koncentracijom nanočestica srebra od 0,5 - 5 mas. % u polivinilhloridu (PVC) za primenu u pakovanju hrane, otpuštene koncentracije srebra u pileće meso su bile 0,29 – 3,94 mg kg^{-1} (Cushen i sar., 2013) što je daleko iznad maksimalnih propisanih vrednosti. Iz navedenih rezultata se može zaključiti da je otpuštanje srebra iz kompozitnih filmova dobijenih u ovom radu u opsegu literaturnih vrednosti pri čemu je potrebno blago sniziti koncentraciju srebra kako bi otpuštanje i u rastvoru sirćetne kiseline kao simulantu hrane, bilo u dozvoljenim vrednostima. Ipak, moguće je i da je metoda pripreme filmova isecanjem doprinela većem otpuštanju srebra dobijenom u ovoj doktorskoj disertaciji do presecanja Ag/alginatnih mikročestica što dovodi do bržeg otpuštanja srebra po obodu filmova. U narednim istraživanjima moguće je ograničiti difuziju po obodu filmova primenom lepljivih traka koje bi služile kao ramovi ili izlivati polimere tačno po propisanoj površini kako se filmovi ne bi sekli.

Kako je za primenu kompozitnih filmova potrebno da oni ne štete hrani ali i da ispoljavaju funkcionalnost odnosno antimikrobnu aktivnost, u ovom radu je ispitana antimikrobna aktivnost na dva tipa bakterija: *E. coli* i *S. aureus* koristeći agar-difuzioni test. PLA kompozitni filmovi su pokazali slab antimikrobni efekat prema soju *S. aureus*. U literaturi je pokazano da relativno visoka koncentracija otpuštenih jona srebra od oko $\sim 5 \text{ mg Ag}^+/\text{kg}$ može postići antimikrobne efekte, (Fernandez i sar., 2009). Ova koncentracija srebra je ~ 100 puta veća od maksimalne dozvoljene koncentracije (0,05 mg Ag/kg simulanta za hranu). Ipak, neki autori su pokazali da i male koncentracije otpuštenog srebra iz pakovanja za hranu od 0,01– 0,1 mg kg^{-1} mogu uticati na rast bakterija (Martinez-Abad i sar., 2012)

U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da agar-difuzioni test nije pogodna metoda za određivanje antimikrobne aktivnosti PVA filmova koji su se izvijali u vlažnoj sredini. Kao alternativnu metodu, moguće je koristiti metodu po japanskom standardu (Japanese Industrial Standard JIS Z 2801) gde se na testirani materijal stavlja određena zapremina bakterijske suspenzije, a potom se preko tretiranog mesta stavlja antimikrobni plastični film. Nakon inkubacije bakterijska suspenzija se ispira i zasejava na agar kako bi se

izbrojale bakterijske kolonije. Ova metoda se čini pogodnijom za testiranje antimikrobne aktivnosti ispitivanog materijala u kontaktu sa hranom.

6. ZAKLJUČAK

Predmet istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji su nanokompozitni alginatni hidrogelovi sa nanočesticama srebra za potencijalnu primenu kao antimikrobnih agenasa u medicini, ali i u pakovanju hrane sa posebnim fokusom na ispitivanje i matematičko modelovanje na kinetike otpuštanja srebra u različitim uslovima. Poznavanje mehanizma i kinetike otpuštanja nanočestica i/ili jona srebra iz nanokompozitnih materijala je značajno kako sa stanovišta funkcionalnosti materijala, odnosno postizanja antimikrobne aktivnosti, tako i sa stanovišta određivanja uticaja ovih nanomaterijala na biološku sredinu u organizmu kao i na životnu sredinu pri njihovoj primeni. U ovoj disertaciji su posebno ispitivani Ag/alginatni hidrogelovi sa elektrohemijski sintetisanim nanočesticama srebra za potencijalnu primenu u oblogama za rane i implantatima za meka tkiva, a takođe i razvijeni i karakterisani kompozitni PLA i PVA filmovi sa umetnutim Ag/alginatnim mikročesticama dobijenim iz koloidnog rastvora sintetisanog hidrotermalnom metodom.

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci

- Primenom obe ispitivane metode, elektrohemijskom i hidrotermalnom, uspešno su sintetisane sferične nanočestice srebra. Pri tome su elektrohemijskom metodom u alginatu srednje viskoznosti dobijene nanočestice dimenzija ~ 4 nm, u alginate niske viskoznosti ~ 30 nm, dok su hidrotermalnom metodom dobijene nanočestice prečnika ~ 17 nm.
- Jednostavnim razblaživanjem Ag/alginatnih koloidnih rastvora rastvorima Na-alginata dobijaju se stabilni koloidni rastvori sa očuvanim nanočesticama srebra u koncentraciji koja je proporcionalna razblaženju. Primenom hidrotermalne metode viskoznost dobijenog koloidnog rastvora se smanjuje i iznosi oko 0,03 Pas.
- Hidrotermalnom metodom se pored nanočestica srebra dobijaju i veći agregati koje je moguće ukloniti centrifugiranjem. Radi povećanja efikasnosti ove metode potrebna je dalja optimizacija parametara sinteze nanočestica.
- Elektrostatičkom ekstruzijom Ag/alginatnih koloidnih rastvora su uspešno dobijene Ag/alginatne mikročestice pri čemu su nanočestice srebra ostale očuvane. Dobijene mikročestice su sadržale oko 2 puta veću koncentraciju nanočestica srebra u poređenju sa polaznim koloidnim rastvorom što se

objašnjava kontrekcijom gela u toku geliranja. Elektrostatičkom ekstruzijom koloidnog rastvora sintetisanog hidrotermalnom metodom dobijene su mikročestice manjih dimenzija nego u slučaju koloidnog rastvora sintetisanog elektrohemijском metodom zbog niske viskoznosti koloidnog rastvora u prvom slučaju.

- Ispitivanja sušenja i rehidracija Ag/alginatnih mikročestica su pokazala da je nakon sušenja očuvano oko 90 % inicijalnih nanočestica, dok hidrogel zadržava kapacitet bubrenja i otpuštanja nanočestica i jona srebra.
- Ispitivanjem i matematičkim modelovanjem kinetike otpuštanja srebra iz vlažnih i suvih Ag/alginatnih mikročestica sa elektrohemijски sintetisanim nanočesticama srebra u vodi i u različitim hidrodinamičkim uslovima utvrđeno je da je unutrašnja difuzija nanočestica limitirajući korak.
- Koeficijenti difuzije nanočestica srebra u matrici alginatnog hidrogela u Ag/alginatnim mikročesticama je određen kao $1,27 \times 10^{-18} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ u uslovima sa mešanjem tečnosti dok je u statičkim uslovima ova vrednost iznosila oko $(4,6 - 4,9) \times 10^{-19} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$
- Na osnovu eksperimentalnih istraživanja kinetike otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih mikročestica sa elektrohemijски sintetisanim nanočesticama srebra u fiziološki rastvor postavljen je i uspešno primenjen matematički model koji je uključio difuziju nanočestica kroz alginatnu matricu, reakciju oksidacije nanočestica i reakciju sa jonima hlora i difuziju nagrađenih $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ formi.
- Konstante oksidacije nanočestica srebra su zavisile od hidrodinamičkih uslova tako da su za vlažne čestice u Ag/alginatnim mikročesticama i u uslovima mešanja iznosile $2,2 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ i $6,8 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, redom, dok je za suve Ag/alginatne mikročestice ova konstanta iznosila $22 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. Sa druge strane, koeficijenti difuzije nagrađenih formi $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ su se menjali obrnuto proporcionalno i iznosili su $(39; 2,1 \text{ i } 0,045) \times 10^{-15} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, redom. Ovi rezultati su ukazali na bržu reakciju nanočestica srebra sa jonima hlora u suvim mikročesticama verovatno usled bržeg prenosa ovih jona u toku bubrenja mikročestica. Shodno tome, i nagrađene forme $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ su bile manje pokretne predstavljajući verovatno precipitat so AgCl.

- Ispitivanjem i matematičkim modelovanjem kinetike otpuštanja srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica dobijenih od koloida sintetisanog hidrotermalnom metodom u simulante za hranu na bazi vode određeni su prividni koeficijenti difuzije nanočestica srebra u alginatnoj matrici u različitim rastvorima na 20 °C. Pri tome su te vrednosti iznosile: $1,47 \times 10^{-17} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ u 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline, $0,33 \times 10^{-18} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ u destilovanoj vodi, $0,32 \times 10^{-19} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ u 10 zap. % rastvoru etanola, $0,37 \times 10^{-19} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ u 95 zap. % rastvoru etanola, redom. Najveća vrednost određena za rastvor sirćetne kiseline odgovara bržoj oksidaciji nanočestica u kiseloj sredini, a time i bržoj difuziji nanočestica i jona srebra, odnosno većem prividnom koeficijentu difuzije.
- Uspešno su dobijeni i karakterisani PLA i PVA kompozitni filmovi sa umetnutim Ag/alginatnim mikročesticama sa nanočesticama srebra sintetisanim hidrotermalnom metodom. Filmovi su bili debljine oko 270 μm , a mikročestice su na osnovu analize preseka filmova bile sadržane najvećim delom unutar filmova. Takođe, utvrđeno je da nanočestice srebra ostaju očuvane unutar Ag/alginatnih mikročestica u filmovima.
- Ispitivanjem kinetike i matematičkog modela otpuštanja srebra iz PLA kompozitnih filmova u 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline određen je koeficijent difuzije od $1,6 \times 10^{-17} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ koji odgovara vrednosti određenoj za Ag/alginatne mikročestice u ovoj sredini.
- Izmerene koncentracije otpuštenog srebra iz PLA i PVA kompozitnih filmova u ispitivanim simulantima za hranu nakon 10 dana u statičkim uslovima na 4, 20 i 40 °C, su pokazale da su niže od maksimalno dozvoljene koncentracije srebra u jonskom obliku koja je propisana po standardima Evropske Unije ($< 0,05 \text{ mg/kg}$), osim u slučaju 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline koja je bila nešto veća. Ovaj rezultat ukazuje na potrebu blage modifikacije koncentracije nanočestica srebra u kompozitnim filmovima kako bi otpuštanje srebra i u ovom simulantu hrane bilo u opsegu dozvoljenih koncentracija.
- Ipitivanje antibakterijske aktivnosti PLA i PVA kompozitnih filmova na dva soja bakterija: *S.aureus* i *E. coli* je pokazalo slabo ali ipak uočljivo dejstvo PLA filmova na soju *S.aureus* pojavom inhibicione zone širine oko 1 mm, dok na soju *E. coli* nije imalo nikakav efekat. U slučaju PVA kompozitnih filmova, u

ispitivanom testu nije bilo moguće zaključiti da li ovi filmovi ispoljavaju antimikrobnu aktivnost pošto je došlo do bubrenja filmova i uvijanja. Agar-difuziona metoda nije pogodna za ispitivanje antimikrobne aktivnosti PVA kompozitnih filmova.

- Ispitivanje migracije nanočestica srebra iz Ag/alginatnih diskova u alginatne diskove pri direktnom kontaktu tokom 14 dana je pokazalo da se migracija najvećim delom odvija u početku ispitivanja tako da ukupna koncentracija srebra u alginatnim diskovima ostaje približno konstantna. Pri tome su na površini diskova uočeni veći agregati dok su u unutrašnjosti raspoređeni manji agregati prečnika oko 400 nm pri tome je ukupno otpuštena količina srebra iznosila oko 0,7 % početne količine. Ovaj eksperiment je predstavljao simulaciju implantacije Ag/alginatnog diska nevascularizovano tkivo, ukazujući na zadržavanje srebra odnosno sterilnosti tokom implantacije.
- Ispitivanje kinetike otpuštanja srebra iz pakovanog sloja Ag/alginatnih mikročestica pri kontinualnom protoku vode je pokazalo da pored difuzije nanočestica dolazi i do spiranja nanočestica srebra iz mikročestica. Primenom matematičkog modela koji je uključio i konvektivni prenos i izračunata je brzina proticanja vode kroz hidrogel od $4,6 \times 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$. Što odgovara $\sim 6 \times 10^{-3} \%$ od ukupnog protoka vode kroz pakovani sloj. Ipak, ova mala vrednost intersticijalne brzine je bila dovoljna da izazove značajno veće otpuštanje srebra iz hidrogela u odnosu na statičke uslove. Ovaj eksperiment je relevantan za potencijalnu primenu Ag/alginatnih hidrogelova kao implantata u vaskularizovana tkiva.

Generalno, istraživanja i rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji daju doprinos razvoju novih nanokompozitnih hidrogelova sa nanočesticama srebra i to posebno u opisivanju mehanizma i kinetike otpuštanja srebra u različitim uslovima relevantnim za medicinsku primenu u oblogama za rane i implantatima za meka tkiva. Dodatno ova teza ima i praktičan doprinos u razvoju hidrotermalne metode sinteze nanočestica srebra u rastvoru Na-alginata kao i razvoju novih antimikrobnih kompozitnih polimernih filmova atraktivnih za primenu u pakovanju hrane.

7. PRILOG

7.1. SPISAK SLIKA

- Slika 1.1. Dva osnovna pristupa sintezi metalnih nanočestica: metoda odozgo na dole i odozdo na - gore 6
- Slika 1.2. Elektrostatička stabilizacija metalnih nanočestica. Pozitivno naelektrisanje se raspoređuje po površini nanočestica pa se oko svake nanočestice stvara omotač negativnog naelektrisanja (Ott i Finke, 2007) 8
- Slika 1.3. Šematski prikaz mehanizma formiranja i rasta nanočestica srebra u toku vremena. Mehanizam je opisan u tri stupnja: i) agregativna nukleacija, ii) agregacioni rast, iii) Ostvaldov rast. $\bar{V}(t)$ je srednja zapremina nanočestica zavisna od vremena, k_g je konstanta agregacionog rasta, k_{OR} je konstanta brzine Ostvaldovog sazrevanja (Richards i sar., 2010) 10
- Slika 1.4. UV-vidljivi spektri nanočestica srebra različitih oblika: sfernog, trouglastog, štapićastog i kubnog (Ashkarran i sar., 2012) 12
- Slika 1.5. Hemijska struktura alginata. a) β -D-manuronska (M) jedinica i α -L-guluronska jedinica (G) natrijum alginata. b) struktura natrijum-alginata sa G-G blokom, M-M blokom i M-G blokom 20
- Slika 1.6. Vezivanje Ca^{2+} jona za alginatne lance: "egg-box" model (model kutije za jaja) vezivanja jona kalcijuma u šupljine (Paquesab i sar., 2014) 22
- Slika 1.7. Šematska ilustracija dispozicije jona natrijuma i alginatnih lanaca u slučaju dva različita tipa naelektrisanja: A) pozitivno naelektrisana igla izaziva pomeranje pozitivnih jona natrijuma na površinu kapi, B) pozitivno naelektrisan rastvor za geliranje služi za sakupljanje negativno naelektrisanih kapi. (Nedovic i sar., 2002) 24
- Slika 1.8. Šematski prikaz delovanja obloge za rane Suprasorb[®]A+Ag na bazi kalcijum-alginatnog hidrogela sa jonima srebra u dubokoj rani: izmenom jona kalcijuma iz hidrogela sa jonima natrijuma iz tkiva, dolazi do bubrenja hidrogela u vlažnoj sredini i naglog otpuštanja jona srebra. (<http://www.activavet.co.uk/products/suprasorb>, 10.05.2017) 26

- Slika 1.9. Inter - i intramolekulsko vezivanje jona srebra sa karboksilnim grupama na alginatnim lancima (Hassan, 1991) 27
- Slika 1.10. Dobijanje poli(vinil alkohola) polimerizacijom vinil acetata, praćene hidrolizom poli(vinil acetata) (Stojkowska, 2015) 29
- Slika 1.11. Konfiguracije L, i D i DL enantiomera 2-hidroksi propanske kiseline, tj. mlečne kiseline (Masutani i Kimura, 2014) 31
- Slika 1.12. Konfiguracije L, D i cikličnih diestra mlečne kiseline (laktida) (Ristic i sar., 2012) 31
- Slika 1.13. Dobijanje poli(laktidne kiseline): iz mlečne kiseline se dobija ciklični diestar mlečne kiseline čijim se otvaranjem prstena u prisustvu katalizatora dobija poli(mlečna kiselina) (<http://www.essentialchemicalindustry.org/polymers/degradable-plastics.html>, 10.05.2017) 32
- Slika 1.14. Proces kruženja PLA: iz industrijskih sirovina (1) se fermentacijom dobija mlečna kiselina (2) iz koje se sintetiše ciklični diestar mlečne kiseline, laktid (3); polimerizacija mlečne kiseline se odvija postupkom otvaranja laktidnog prstena (4); hidrolizom ovog polimera je moguće razložiti polimlečnu kiselinu na mlečnu kiselinu (5) koja se dalje u biološkim sistemima razlaže na CO₂ i H₂O (6) (Ristic i sar., 2012) 33
- Slika 3.1. Šematski prikaz eksperimentalne aparature za elektrohemijsku sintezu nanočestica srebra: u elektrohemijskoj ćeliji sa vodenim rastvorom KNO₃, AgNO₃, i Na-alginata se nalaze radna Pt elektroda, pomoćna Pt elektroda i zasićena kalomelova elektroda (ZKE) kao referentna elektroda. Galvanostatska sinteza je izvedena u elektrohemijskoj ćeliji uz stalno mešanje vodenog rastvora i atmosferi azota (Stojkowska 2015) 46
- Slika 3.2. Šematski prikaz eksperimentalne aparature za izvođenje elektrostatičke ekstruzije: koloidni rastvor se potiskuje uz pomoć infuzione pumpe kroz pozitivno naelektrisanu iglu dok je rastvor za geliranje (rastvor kalcijum-nitrata) uzemljen. Između vrha igle i rastvora Ca(NO₃)₂ se stvara električno polje pa se koloidni rastvor potiskivan pumpom kroz iglu otkida u obliku mlaza sitnih kapljica. Kapljice geliraju u

rastvoru $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ usled razmene jona Na^+ i Ca^{2+} tako da dolazi do očvršćavanja kapi u obliku sfernih čestica 48

Slika 3.3. Diskovi hidrogelova alginata: a) Ag/alginatni diskovi, b) alginatni diskovi 50

Slika 3.4. Šematski prikaz bioreaktorskog sistema koji se sastoji iz bioreaktora sa pakovanim slojem Ag/alginatnih mikročestica, dva šprica, rezervoara za vodu i perfuzione pumpe kojom je omogućen kontinualni protok kroz sistem 60

Slika 4.1. Nanočestice srebra sintetisane elektrohemijском metodom u koloidnom rastvoru alginata sa nominalnom koncentracijom srebra od 1 mM: a) TEM mikrofotografija koloidnog rastvora (razmernik:100 nm), b) raspodela veličina nanočestica srebra 64

Slika 4.2. UV – vidljivi spektri koloidnih rastvora nominalne koncentracije srebra od 3,9 mM i 1 mM (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ($\leq 15\%$) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji) 64

Slika 4.3. Zavisnost maksimalne apsorbance UV-vidljivog spektra (A_{max}) od ukupne koncentracije srebra u elektrohemijski sintetisanim koloidnim rastvorima izmerene primenom AAS, (C_{kol}) 65

Slika 4.4. UV-vidljivi spektar Ag/alginatnih koloidnih rastvora nakon hidrotermalne sinteze sa nominalnom koncentracijom srebra od 4 mM i nakon centrifugiranja (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ($\leq 15\%$) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji) 67

Slika 4.5. Nanočestice srebra dobijene hidrotermalnom sintezom nakon centrifugiranja koloidnog rastvora: a) TEM mikrofotografija (razmernik: 100 nm), b) raspodela veličina nanočestica srebra 67

Slika 4.6. Viskoznost 2 mas. % rastvora alginata srednje viskoznosti nakon 5 h autoklaviranja na temperaturi od 100 °C i pritisku od 2 bara u zavisnosti od brzine ugaone deformacije 68

Slika 4.7. UV – vidljivi spektri razblaženih koloidnih rastvora sintetisanih hidrotermalnom metodom sa različitim koncentracijama srebra određenih primenom AAS (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ($\leq 15\%$) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji) 69

Slika 4.8. Zavisnost maksimalne apsorbance UV-vidljivog spektra (A_{\max}) od ukupne koncentracije srebra u hidrotermalno sintetisanim koloidnim rastvorima izmerene primenom AAS (c_{kol}) 69

Slika 4.9. Ag/alginate mikročestice: a) vlažne mikročestice ($570 \pm 60 \mu\text{m}$), b) suve mikročestice ($400 \pm 50 \mu\text{m}$) (razmernik: $500 \mu\text{m}$) 70

Slika 4.10. UV-vidljivi spektri rastvorenih vlažnih i suvih Ag/alginate mikročestica (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ($\leq 15\%$) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji) 71

Slika 4.11. Nanočestice srebra u rastvorenim vlažnim Ag/alginate česticama: a) TEM mikrografija (razmernik: 100 nm), b) raspodela veličina nanočestica srebra 71

Slika 4.12. UV – vidljivi spektri rastvorenih Ag/alginate mikročestica sa različitim koncentracijama srebra određenih primenom AAS (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ($\leq 15\%$) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji) 72

Slika 4.13. Zavisnost maksimalne apsorbance UV-vidljivog spektra od ukupne koncentracije srebra u rastvorenim Ag/alginate mikročesticama izmerene primenom AAS 73

Slika 4.14. Zavisnost ukupne koncentracije srebra u Ag/alginate mikročesticama od ukupne koncentracije srebra u koloidnim rastvorima iz kojih su dobijene mikročestice 74

Slika 4.15. Ag/alginate mikročestice dobijene iz koloidnog rastvora sintetisanog hidrotermalnom metodom: a) vlažne mikročestice ($260 \pm 30 \mu\text{m}$), b) suve mikročestice ($190 \pm 20 \mu\text{m}$) 75

Slika 4.16. UV-vidljivi spektri rastvorenih vlažnih i suvih Ag/alginatnih mikročestica dobijenih iz koloidnog rastvora sintetisanog hidrotermalnom metodom (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ($\leq 15\%$) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji) 75

Slika 4.17. UV – vidljivi spektri rastvorenih Ag/alginatnih mikročestica sa različitim koncentracijama srebra određenih primenom AAS (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ($\leq 15\%$) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji) 76

Slika 4.18. Zavisnost maksimalne apsorbance UV-vidljivog spektra od ukupne koncentracije srebra u rastvorenim Ag/alginatnim mikročesticama izmerene primenom AAS 77

Slika 4.19. Zavisnost ukupne koncentracije srebra u Ag/alginatnim mikročesticama od ukupne koncentracije srebra u koloidnim rastvorima iz kojih su dobijene mikročestice 78

Slika 4.20. Optička mikrofotografija PLA kompozitnog filma na kojoj se uočavaju Ag/alginatne mikročestice (razmernik: 500 μm) 79

Slika 4.21. SEM mikrofotografije: a) poprečnog preseka PLA kompozitnog filma (razmernik 200 μm) i b) poprečnog preseka suve Ag/alginatne mikročestice unutar PLA filma (razmernik 500 μm) 79

Slika 4.22. UV-vidljivi spektar rastvorenih polaznih suvih Ag/alginatnih mikročestica (10 mg) i rastvorenog PLA kompozitnog filma dimenzija 2 cm x 3 cm (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ($\leq 15\%$) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji) 80

Slika 4.23. Agar difuzioni test PLA kompozitnih filmova na dva soja bakterija: a) *S. aureus* b) *E. coli*; (1) kontrolni PLA fim i (2) PLA kompozitni film 81

Slika 4.24. Optička mikrofotografija PVA kompozitnog filma na kojoj se uočavaju Ag/alginatne mikročestice (razmernik: 500 μm) 82

Slika 4.25. SEM mikrofotografije: a) poprečnog preseka PVA kompozitnog filma gde strelica označava Ag/alginate mikročestice unutar filma (razmernik 100 μm) i b) poprečnog preseka suve Ag/alginate mikročestice unutar PVA filma gde strelice označavaju mikročestice (razmernik 500 nm) 83

Slika 4.26. UV-vidljivi spektar rastvorenih polaznih suvih Ag/alginate mikročestica (10 mg) i rastvorenog PLA kompozitnog filma dimenzija 2 cm x 3 cm (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardne devijacije ($\leq 15\%$) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji) 84

Slika 4.27. Agar difuzioni test PVA kompozitnih filmova na dva soja bakterija: a) *S. aureus* b) *E. coli*; (1) kontrolni PVA film i (2) PVA kompozitni film 85

Slika 4.28. Vlažne Ag/alginate mikročestice na početku (levo) i nakon 21-og dana (desno) u vodi na 37 °C: a) u statičkim uslovima, b) u vodenom kupatilu (razmernik: 500 μm) 87

Slika 4.29. Uv-vidljivi spektri počenih rastvorenih vlažnih Ag/alginate mikročestica i nakon 21-og dana na 37 °C: a) u statičkim uslovima i b) vodenom kupatilu 88

Slika 4.30. Koncentracija otpuštenog srebra iz Ag/alginate mikročestica u vodi tokom vremena u vodenom kupatilu određena primenom AAS pri čemu su uzorci direktno mereni ili je dodavana azotna kiselina 89

Slika 4.31. Koncentracije otpuštenog srebra iz vlažnih Ag/alginate mikročestica u vodi (c_m) u statičkim uslovima i u vodenom kupatilu sa mešanjem na 37 °C u toku vremena 89

Slika 4.32. Vlažne Ag/alginate mikročestice na početku (levo) i nakon 7 dana (desno): a) u statičkim uslovima, b) usled mešanja u vodenom kupatilu (razmernik: 500 μm) 91

Slika 4.33. Prečnici Ag/alginatnih mikročestica u fiziološkom rastvoru u na 37 °C: a) u statičkim uslovima, b) u uslovima mešanja u vodenom kupatilu (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja) 92

Slika 4.34. UV-vidljivi spektri rastvorenih vlažnih Ag/alginatnih mikročestica tokom vremena u fiziološkom rastvoru na 37 °C u: a) statičkim uslovima; b) uslovima sa mešanjem (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ($\leq 15\%$) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji) 93

Slika 4.35. Koncentracija nanočestica srebra (c_n) u vlažnim Ag/alginatnim mikročesticama u fiziološkom rastvoru u statičkim uslovima i u uslovima mešanja u vodenom kupatilu na 37 °C (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja) 93

Slika 4.36. Koncentracije otpuštenog srebra (c_m) iz Ag/alginatnih mikročestica u fiziološki rastvor na 37 °C u statičkim uslovima i u uslovima mešanja u vodenom kupatilu (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja) 94

Slika 4.37. Prečnici rehidriranih Ag/alginatnih mikročestica u fiziološkom rastvoru u na 37 °C u statičkim uslovima (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja) 95

Slika 4.38. UV-vidljivi spektri rastvorenih Ag/alginatnih mikročestica tokom vremena u fiziološkom rastvoru na 37 °C tokom vremena u statičkim uslovima (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ($\leq 15\%$) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji) 95

Slika 4.39. Koncentracija nanočestica srebra (c_n) u rehidriranim Ag/alginatnim mikročesticama u fiziološkom rastvoru u statičkim uslovima na 37 °C (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja) 96

Slika 4.40. Koncentracije otpuštenog srebra (c_m) iz rehidriranih suvih Ag/alginatnih mikročestica u fiziološkom rastvoru na 37 °C u statičkim uslovima (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja) 96

Slika 4.41. Spektar rastvorenih Ag/alginatnih mikročestica na početku i nakon 21-og dana u vodi u statičkim uslovima (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardne devijacije ($\leq 15\%$) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji)

98

Slika 4.42. UV-vidljivi spektri rastvorenih Ag/alginatnih mikročestica u sistemu sa pakovanim slojem tokom vremena (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja; standardne devijacije ($<15\%$) su izostavljene kako bi spektri bili uočljivi)

99

Slika 4.43. Ag/alginatne mikročestice u sistemu sa pakovanim slojem: a) početne, b) nakon 4 dana, c) nakon 7 dana, d) nakon 12 dana (razmernik: $500\ \mu\text{m}$)

99

Slika 4.44. Srednji prečnici Ag/alginatnih mikročestica tokom vremena u sistemu sa pakovanim slojem (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja)

100

Slika 4.45. Koncentracije otpuštenog srebra u vodi (c_m) iz Ag/alginatnih mikročestica u statičkim uslovima i u pakovanomsloju (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja)

100

Slika 4.46. Ag/alginatne mikročestice: a) početne vlažne, b) početne suve mikročestice, c) suve nakon 10 dana u 3% zap. rastvoru sirćetne kiseline, d) suve nakon 10 dana u dH_2O c) suve nakon 10 dana u 10% zap. rastvoru etanola d) suve nakon 10 dana u 95% zap. rastvoru etanola (razmernik: $500\ \mu\text{m}$)

102

Slika 4.47. Koncentracije otpuštenog srebra (c_m) iz suvih Ag/alginatnih mikročestica tokom vremena u: a) 3% rastvoru sirćetne kiseline, b) dH_2O , 10% zap. rastvoru etanola i 95% zap. rastvora etanola

103

Slika 4.48. UV-vidljivi spektar rastvorenih suvih početnih Ag/alginatnih mikročestica i nakon 10 dana stajanja u različitim model rastvorima u statičkim uslovima na $20\ ^\circ\text{C}$

104

Slika 4.49. Ag/alginatne mikročestice: a) vlažne početne ($270 \pm 30\ \mu\text{m}$), b) osušene vlažne ($190 \pm 20\ \mu\text{m}$), c) početne u PLA filmu ($180 \pm 20\ \mu\text{m}$), d) u PLA filmu nakon 10

dana stajanja u 3 % zap. rastvoru sirćetne kiseline ($170 \pm 20 \mu\text{m}$), e) početne u PVA filmu ($170 \pm 20 \mu\text{m}$), f) u PVA filmu nakon 10 dana stajanja u 3 % zap. rastvoru sirćetne kiseline ($260 \pm 50 \mu\text{m}$) (razmernik: $500 \mu\text{m}$) 105

Slika 4.50. Koncentracije otpuštenog srebra (c_m) iz PLA i PVA kompozitnih filmova u 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline na 20°C tokom vremena 106

Slika 4.51. Koncentracije otpuštenog srebra (c_m) iz: a) PLA i b) PVA kompozitnih filmova nakon 10 dana u 3 zap. % sirćetne kiseline, dH_2O , 10 zap. % rastvoru etanola i 95 zap. % rastvoru etanola 111

Slika 4.52. Optičke mikrofotografije površine alginatnog diska: a) na početku, c) nakon 3 dana, d) nakon 7 dana, g) nakon 14 dana (razmernik: $500 \mu\text{m}$) 113

Slika 4.53. SEM mikrofotografija poprečnog preseka diskova nakon 14 dana eksperimenta: a) Ag/alginatnog diska, b) alginatni diska (razmernik: $1 \mu\text{m}$) 113

Slika 4.54. Koncentracija ukupnog srebra u alginatnim diskovima u kontaktu sa Ag/alginatnim diskovima u toku vremena; simboli predstavljaju eksperimentalne vrednosti (3 merenja) dok isprekidana linija predstavlja srednju vrednost svih merenja 114

Slika 4.55. Šematski prikaz difuzije nanočestica srebra iz Ag/alginatne mikročestice u okolni medijum, gde je r – radijus od centra Ag/alginatne mikročestice, R – poluprečnik mikročestice, c – koncentracija ukupnog srebra u Ag/alginatnoj mikročestici, c_m – koncentracija ukupnog srebra u medijumu, V_c –zapremina Ag/alginatne mikročestice, V_m –zapremina medijuma 116

Slika 4.56. Koncentracije otpuštenog srebra u vodi (c_m) u toku vremena u statičkim uslovima i uslovima sa mešanjem: eksperimentalni rezultati (simboli), predviđanja matematičkog modela (linije) (eksperimentalni rezultati su 3 merenja) 119

Slika 4.57. Koncentracija nanočestica srebra u vlažnim Ag/alginatnim mikročesticama u statičkim uslovima i uslovima mešanja, kao i u suvim mikročesticama u statičkim

uslovima u fiziološkom rastvoru tokom vremena: eksperimentalni rezultati (simboli), predviđanja modela (linije) (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja) 124

Slika 4.58. Koncentracija otpuštenog srebra u fiziološkom rastvoru (c_m) tokom vremena: a) vlažne Ag/alginate mikročestice u statičkim uslovima, b) vlažne Ag/alginate mikročestice u uslovima mešanja, c) suve Ag/alginate mikročestice u statičkim uslovima; eksperimentalni rezultati (simboli), predviđanja modela (linije) (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja) 126

Slika 4.59. Analiza Osetljivosti modela: standardne devijacije predviđanja modela od eksperimentalnih rezultata pri promeni parametara modela za otpuštanje srebra iz Ag/alginate mikročestica u fiziološkom rastvoru za: a) vlažne mikročestice u statičkim uslovima, b) vlažne mikročestice u uslovima mešanja, c) suve mikročestice u statičkim uslovima 128

Slika 4.60. Koncentracija otpuštenog srebra u vodi (c_m) u statičkim uslovima tokom vremena: eksperimentalni rezultati (simboli), i predviđanja modela (linija) (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja) 130

Slika 4.61. Primena modela unutrašnje difuzije na eksperimentalne rezultate otpuštanja srebra iz Ag/alginate mikročestica u pakovanom sloju prilikom proticanja vode kroz pakovani sloj 131

Slika 4.62. Geometrija hidrogela korišćena za postavku matematičkog modela otpuštanja srebra iz pakovanog sloja Ag/alginate mikročestica difuzijom i konvekcijom u aksijalnom pravcu, x ; X je dužina cilindričnog hidrogela, a u je intersticijalna brzina fluida kroz hidrogel 132

Slika 4.63. Koncentracija otpuštenog srebra iz pakovanog sloja Ag/alginate mikročestica u vodi (c_m) tokom vremena: eksperimentalni rezultati (simboli); predviđanja modela sa najmanjim kvadratima odstupanja (puna linija); Predviđanja modela difuzije (isprekidana linija) (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja) 134

Slika 4.64. Analiza Osetljivosti modela: standardne devijacije predviđanja modela od eksperimentalnih podataka pri promeni parametara modela za opuštanje srebra iz Ag/alginatnih mikročestica u dH₂O: a) statički uslovi, b) pakovani sloj uz kontinualni protok

135

Slika 4.65. Primena modela unutrašnje difuzije na eksperimentalne rezultate otpuštanja srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica u: a) 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline, b) dH₂O, c) 10 zap. % rastvoru etanola i d) 95 zap. % rastvoru etanola

137

Slika 4.66. Koncentracije otpuštenog srebra (c_m) iz suvih Ag/alginatnih mikročestica na 20 °C tokom vremena u: a) 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline, b) dH₂O, 10 zap. % rastvoru etanola i 95 zap. % rastvoru etanola: eksperimentalni rezultati (simboli) i predviđanja modela (linije) (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja)

138

Slika 4.67. Geometrija filma korišćena za postavku matematičkog modela otpuštanja srebra iz PLA i PVA kompozitnih filmova difuzijom u x pravcu: L je debljina filma

140

Slika 4.68. Primena modela unutrašnje difuzije na eksperimentalne rezultate otpuštanja srebra u 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline iz: a) PLA kompozitnih filmova i b) PVA kompozitnih filmova

141

Slika 4.69. Koncentracije otpuštenog srebra (c_m) iz PLA i PVA kompozitnih filmova na 20 °C tokom vremena u 3 zap. % rastvoru sirćetne kiseline, eksperimentalni rezultati (simboli), i predviđanja modela (linije) (eksperimentalni rezultati su srednje vrednosti 3 merenja)

142

7.2. SPISAK TABELA

Tabela 1.1. Pregled nekih kompanija koje postoje na tržištu i bave se proizvodnjom nanočestica srebra 19

Tabela 4.1. Sumirane vrednosti mase, prečnika mikročestica i debljine kompozitnih PLA filmova nakon 10 dana u dH₂O, 10 zap. % rastvoru etanola i 95 zap. % rastvoru etanola na 4 °C, 20 °C i 40 °C (početni prečnik mikročestica je iznosio u svim slučajevima $180 \pm 20 \mu\text{m}$, a početna debljina filmova $0,270 \pm 0,015 \text{ mm}$) 107

Tabela 4.2. Sumirane vrednosti mase, prečnika mikročestica i debljine kompozitnih PVA filmova nakon 10 dana u dH₂O, 10 zap. % rastvoru etanola i 95 zap. % rastvoru etanola na 4 °C, 20 °C i 40 °C (početni prečnik mikročestica je iznosio u svim slučajevima $180 \pm 20 \mu\text{m}$, a početna debljina filmova $0,270 \pm 0,015 \text{ mm}$) 108

Tabela 4.3. Otpuštene koncentracije srebra iz PLA i PVA kompozitnih filmova i procenat otpuštanja nakon 10 dana u dH₂O, 10 zap. % etanolu i 95 zap. % etanolu na 4 °C, 20 °C i 40 °C 109

Tabela 4.4. Parametri za model koji opisuje otpuštanje srebra iz Ag/alginatnih mikročestica u fiziološki rastvor 123

7.3. SPISAK OZNAKA

η	dinamička viskoznost amorfne faze polimera
a	poluprečnik nanočestice koja difunduje
A	ukupna površina svih mikročestica
A_p	specifični parametar polimera
C_{Ax}	koncentracije komponente A koja se menja u x pravcu
C	srednja koncentracija supstance koja se prenosi u hidrogelu
c_{0n}	početna koncentracija nanočestica u polimeru
c	koncentracija ukupnog srebra u Ag/alginatnoj mikročestici,
c_m	koncentracija ukupnog srebra u medijumu
c_n	koncentracija nanočestica srebra i/ili jona u mikročesticama
c_s	koncentracija $AgCl_x^{(x-1)-}$ formi unutar Ag/alginatnih mikročestica
c_{m0}	početna koncentracija srebra u medijumu,
$\langle c(t) \rangle$	ukupna koncentracija srebra u mikročesticama
$\langle c_n \rangle$	srednja koncentracija nanočestica srebra u Ag/alginatnim mikročesticama
$\langle c_s \rangle$	srednja koncentracija $AgCl_x^{(x-1)-}$ formi u Ag/alginatnim mikročesticama
r_A	brzina hemijske reakcije nastajanja komponente A
D_∞	koeficijent ograničene konvekcije kroz hidrogel,

D	koeficijent difuzije supstance kroz ploču
D	efektivan koeficijent difuzije nanočestica srebra i/ili jona kroz alginatni hidrogel
D_{AB}	koeficijent difuzije ili molekulska difuzivnost komponente A kroz komponentu B
D_n	koeficijent difuzije nanočestica srebra i/ili jona kroz alginatnu matricu
D_s	prividni koeficijent difuzije $AgCl_x^{(x-1)-}$ formi u alginatnoj matrici
D_p^*	koeficijent difuzije supstance u polimeru
k_n	konstanta nestajanja nanočestica srebra usled oksidacije
K_e	odnos brzine čestice i fluida u slučaju kada je difuzivnost zanemarljiva, a rastvorena supstanca se posmatra kao slobodna i uniformno suspendovana.
K_d	koeficijent ograničene difuzivnosti i predstavlja odnos difuzivnosti unutar hidrogela i difuzivnosti slobodne supstance u rastvoru
k_B	Bolcmanova konstanta
L	debljina ploče.
M_t	količina neke supstance otpuštene nakon nekog vremena t
M_∞	količina neke supstance otpuštene nakon beskonačnog vremena
M_r	relativna molekulska masa supstance koja migrira
N_A	molski fluks komponente A
N	ukupan broj mikročestica

n_t	količina otpuštenog srebra u medijumu u toku vremena t
n_0	maksimalna količina srebra koja može biti otpuštena iz Ag/alginatnih mikročestica
n	broj nanočestica koje mogu biti otpuštene iz polimera u medijum
R	poluprečnik sfere.
r	radijus od centra Ag/alginatne mikročestice
Δr	korak prostorne promenljive r
S_x	ukupna površina polimera izložena simulantu za hranu
S	površina poprečnog preseka sloja
T	apsolutna temperature kojoj je sistem izložen
u	intersticijalna brzina.
U	površinska brzina fluida
V	ukupna zapremina svih mikročestica
V_c	zapremina Ag/alginatne mikročestice
V_m	zapremina medijuma
\dot{V}	protok fluida
v	srednja brzina strujanja fluida kroz hidrogel
x	aksijalna koordinata
X	dužina cilindričnog hidrogela

8. LITERATURA

1. Abou El-Nour K. M. M., Eftaiha A., Al-Warthan A., Ammar R. A.A., 2010, Synthesis and applications of silver nanoparticles, *Arabian Journal of Chemistry*, 3: 135–140
2. Agnihotri S., Mukherjiab S., Mukherji S., 2014, Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy, *RSC Adv*, 4: 3974
3. Al-Shamkhani A., Duncan, R., 1995, Radioiodination of alginate via covalently-bound tyrosinamide allows monitoring of its fate in vivo, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 10: 4–13.
4. Amass W., Amass A.B., Tighe B., 1998, A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies, *Polymer International*, 47: 89-144
5. Amendola V., Polizzi S., Meneghetti M., 2007, Free silver nanoparticles synthesized by laser ablation in organic solvents and their easy functionalization, *Langmuir*, 23: 6766-6770.
6. Amendola V., Meneghetti M., 2009, Size evaluation of gold nanoparticles by UV-vis spectroscopy, *Journal of Physical Chemistry C*, 113: 4277–4285
7. Amsden, B., Turner N., 1999, Diffusion characteristics of calcium alginate gels. *Biotechnology and Bioengineering*, 65: 605–610.
8. Anilkumar A.V., Lacik I., Wang T.G, 2001, A novel reactor for making uniform capsules, *Biotechnology and Bioengineering*, 75: 581–589
9. Andresen, I., Skipnes, O., Ød O.S., 1977, Some biological functions of matrix components in benthic algae in relation to their chemistry and the composition of seawater. *Cellulose Chemistry and Technology*, 6: 361–381.
10. Artiaga G., Ramos K., Ramos L., Cámara C., Gómez-Gómez M., 2015, Migration and characterisation of nanosilver from food containers by AF4-ICP-MS, *Food Chemistry*, 166: 76 – 85.

11. Ashkarran A.A., Ghavami M., Aghaverdi H., Stroeve P., Mahmoudi M., 2012, Bacterial effects and protein corona evaluations: crucial ignored factors in the prediction of bio-efficacy of various forms of silver nanoparticles, *Chemical Research in Toxicology*, 25:1231-42
12. Augst, A.D., Kong, H.J., Mooney, D.J., 2006. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular bioscience*, 6: 623–33.
13. Axelsson L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, von Wright A, Ouwehand A, editors. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3rd rev. and exp. ed. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2004. p. 1-66
14. Bajpai, S.K., Sharma, S., 2004. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca^{2+} and Ba^{2+} ions. *Reactive and Functional Polymers*, 59: 129–140.
15. Bastus N. G., Merkoci F., Piella J., Puntès V., 2014, Synthesis of highly monodisperse citrate-stabilized silver nanoparticles of up to 200 nm: kinetic control and catalytic properties, *Chemistry of Materials*, 26: 2836–2846
16. Baker, C., Pradhan, A., Pakstis, L., Pochan, D.J., Shah, S.I., 2005, Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*: 5: 244-249.
17. Benn T.M., Westerhoff P., 2008, Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environmental Science and Technology*, 42: 4133–4139.
18. Berry C. C., Wells S., Charles S., Curtis A. S. G., 2003, Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 24: 4551-7
19. Blandino A., Macías M., Cantero D., 2003, Calcium alginate gel as encapsulation matrix for coimmobilized enzyme systems, *Applied Biochemistry and Biotechnology*: 110: 53–60
20. Boonkaew B., Suwanpreuksa P., Cuttle L., Barber P.M., Supaphol P. 2014, Hydrogels containing silver nanoparticles for burn wounds show antimicrobial

- activity without cytotoxicity, *Journal of Applied Polymer Science*, 131:40215–40225.
21. Bouhadir K.H., Lee K.Y., Alsberg E., Damm K.L., Anderson K.W., Mooney DJ., 2001, Degradation of partially oxidized alginate and its potential application for tissue engineering. *Biotechnology Progress*, 17:945–950.
 22. Brazel, C.S., Peppas, N.A., 1999, Mechanisms of solute and drug transport in relaxing, swellable, hydrophilic glassy polymers. *Polymer*, 40: 3383-98
 23. Bugarski B., Smith J., Wu J., M.F.A Goosen, 1993, Methods for animal cell immobilization using electrostatic droplet generation. *Biotechnology Techniques*, 7, pp.677–683.
 24. Bugarski, B., Amsden B., Goosen M. F.A., Neufeld R.J., Poncelet D., 1994, Effect of electrode geometry and charge on the production of polymer microbeads by electrostatics., *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 72: 517–521.
 25. Bugarski B., Li Q., Goosen M.F.A., Poncelet D., Neufeld R.J., Vunjak G., 1994, Electrostatic droplet generation: mechanism of polymer droplet formation, *AIChE J.* 40: 1026–1032.
 26. Bučko M., Vikartovska A., Lacik I., Kollarikova G., Gemeiner P., Patoprsty V., Brygin M, 2005, Immobilization of a whole-cell epoxide-hydrolyzing biocatalyst in sodium alginate-cellulose sulfate-poly(methylene-co-guanidine) capsules using a controlled encapsulation process, *Enzyme and Microbial Technology*, 36: 118–126.
 27. Busolo M.A., Fernandez P, Ocio M.J., Lagaron J.M., 2010, Novel silver-based nanoclay as an antimicrobial in polylactic acid food packaging coatings, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 27:11, 1617-1626
 28. Cao G., *Nanostructures and nanomaterials, synthesis properties and applications*, Imperial College Press, 2004
 29. Chairam S., Somsook E., 2008, Starch vermicelli template for synthesis of magnetic iron oxide nanoclusters. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 320: 2039–43.
 30. Chairam S., Poolperm C., Somsook E., 2009, Starch vermicelli template-assisted synthesis of size/shape-controlled nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 75: 694–704

31. Chen Y, Mak A.F.T., Wang M., Li J., Wong M.S., 2006, PLLA scaffolds with biomimetic apatite coating and biomimetic apatite/collagen composite coating to enhance osteoblastlike cells attachment and activity. *Surface Coatings Technol.* 201: 575–580.
32. Choi O., Deng K.K., Kimc N., Ross Jr. L., Surampallie R.Y., Hu Z., 2008, The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth, *Water Research*, 42: 3066 – 3074
33. Chuang, W.Y.; Young, T.H.; Chiu, W.Y., Lin, C.Y., 2000, The effect of polymeric additives on the structure and permeability of poly(vinyl alcohol) asymmetric membranes. *Polymer*, 41, 5633-41
34. Commission delegated regulation (EU) No 1363/2013 of 12 December 2013 amending Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council on the provision of food information to consumers as regards the definition of engineered nanomaterials
35. Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. *Official Journal of the European Union*, Legalization.
36. Conn R.E., Kolstad J.J., Borzelleca J.F., Dixler D.S., Filer L.J., Ladu B.N., Pariza MW., 1995, Safety assessment of polylactide (PLA) for use as a food-contact polymer. *Food and Chemical Toxicology*, 33:273–83.
37. Crank J., *The Mathematics of Diffusion*, Clarendon Press, Oxford, 1975.
38. Cushen M., Kerry J., Morris M., Cruz-Romero M., Cummins E., 2013, Migration and exposure assessment of silver from a PVC nanocomposite, *Food Chemistry* 139: 389–397
39. Cui F., Qian F., Yin C., 2006, Preparation and characterization of mucoadhesive polymer-coated nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 316: 154 - 161
40. Cushen M., Kerry J.; Morris M.; Cruz-Romero M.; Cummins E., 2012, Nanotechnologies in the food industry - recent developments, risks and regulation. *Trends in Food Science and Technology*, 24, 30–46.
41. Cvijovic D. S., Bošković-Vragolović N., Fenomeni prenosa strujanje, toplota, difuzija, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2001.

42. Darwis D., Stasica P., Razzak M.T., Rosiak J.M., 2002, Characterization of poly(vinyl alcohol) hydrogel for prosthetic intervertebral disc nucleus. *Radiation Physics and Chemistry* 63: 539-42.
43. Davidson B.E., Llanos R.M., Cancilla M.R., Redman N.C., Hillier A.J., 1995, Current research on the genetics of lactic acid production in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 5:763–84.
44. Davison W., Zhang H., 2012, Progress in understanding the use of diffusive gradients in thin films (DGT) – back to basics, *Environmental Chemistry*, 9: 1- 13.
45. DeMerlis C.C., Schoneker D.R., 2003, Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA), *Food and Chemical Toxicology* 41: 319–326
46. De Vos P., Faas M.M, Strand B., Calafiore R., 2006, Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials*, 27:5603-17.
47. Diniz I.M., Chen C., Ansari S., Zadeh H.H., Moshaverinia M., Chee D., Marques M.M., Shi S., Moshaverinia A., 2015, Gingival Mesenchymal Stem Cell (GMSC) Delivery System Based on RGD-Coupled Alginate Hydrogel with Antimicrobial Properties: A Novel Treatment Modality for Peri-Implantitis, *Journal of Prosthodontics* 25: 105-115.
48. Drake, P.L., Hazelwood, K.J., 2005. Exposure-related health effects of silver and silver compounds: A review. *Annals of Occupational Hygiene*, 49: 575–585.
49. Dudukovic A., *Osnovi i operacije prenosa mase*, Akademska misao, Beograd, (2008).
50. Dukhin S.S., Labib M.E., 2013, Convective diffusion of nanoparticles from the epithelial barrier toward regional lymph nodes, *Advances in Colloid and Interface Science*, 200: 23-43.
51. Duncan T.V., 2015, Release of engineered nanomaterials from polymer nanocomposites: the effects of matrix degradation, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7: 20–39
52. Duncan T.V., Pillai K., 2015, Release of engineered nanomaterials from polymer nanocomposites: diffusion, dissolution, and desorption, *ACS Applied Materials and Interfaces*: 14: 2-19
53. Echegoyen Y., Nerin C., 2013, Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers, *Food and Chemical Toxicology*, 62: 16 – 22.

54. EFSA (European Food Safety Authority), 2016. SCIENTIFIC OPINION Scientific opinion on the re-evaluation of silver (E 174) as food additive, EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS) EFSA Journal 2016;14(1):4364
55. EFSA (European Food Safety Authority), 2011. Scientific Opinion on the safety evaluation of the substance, silver zeolite A (silver zinc sodium ammonium alumino silicate), silver content 2–5%, for use in food contact materials. EFSA Journal 2011; 9(2):1999. 12 pp.
56. Egger S., Lehmann R.P., Height M.J., Loessner M.J., Schuppler M., 2009, Antimicrobial properties of a novel silver-silica nanocomposite material. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 2973–2976.
57. El Badawy A.M., Scheckel K. G., Suidan M., Tolaymat T., 2012, The impact of stabilization mechanism on the aggregation kinetics of silver nanoparticles, *Science of the Total Environment*, 429: 325–331
58. El Badawy A.M., Luxton T.P., Silva R.G., Scheckel K.G., Suidan M.T., Tolaymat T.M., 2010, Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environmental Science and Technology*, 44:1260–1266.
59. Elechiguerra J.L., Burt J.L., Morones J.R., Camacho-Bragado A., Gao X., Lara H.H., Yacaman M.J., 2005, Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*, 3:6.
60. Ercolini D, Moschetti G, Blaiotta G, Coppola S., 2001, Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. *Current Microbiology*, 42:199–202.
61. Espinoza M.G., Hinks M.L., Mendoza A.M., Pullman D.P., Peterson K.I., 2012, Kinetics of halide-induced decomposition and aggregation of silver nanoparticles. *the Journal of Physical Chemistry C* 116: 8305–8313.
62. European Commission. (1994) Occupational exposure limits: recommendations of the scientific expert group 1991–92 EUR 15091. Luxembourg: European Commission.

63. European Commission, Scientific Committee 2011, Guidelines of the Scientific Committee on Food for the presentation of an application for safety assessment of a substance to be used in food contact materials prior to its authorization
64. Evanoff D.D. Jr., Chumanov G., 2005, Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays, *ChemPhysChem*, 6: 1221 – 1231
65. Fernandez, E.J., Barrasa, J.C., Laguna A., Lopez de-Luzuriaga J. M., Monge M., Torres C., 2008. The preparation of highly active antimicrobial silver nanoparticles by an organometallic approach. *Nanotechnology*, 19: 185602
66. Fernandez A, Soriano E, Lopez-Carballo G, Picouet P, Lloret E, Gavara R, Hernandez- Munoz P., 2009, Preservation of aseptic conditions in absorbent pads by using silver nanotechnology. *Food Researc International*, 42:1105–12.
67. Fernandez A, Soriano E, Hernandez-Munoz P, Gavara R., 2010, Migration of antimicrobial silver from composites of polylactide with silver zeolites, *Journal of Food Science*.75:186-93
68. Filippo E., Serra A., Manno D., 2009, Poly(vinyl alcohol) capped silver nanoparticles as localized surface plasmon resonance-based hydrogen peroxide sensor, *Sensors and Actuators B* 138: 625–630
69. Fortunati E., Armentano I, Iannoni A., Kenny J.M., 2010, Development and thermal behaviour of ternary PLA matrix composites, *Polymer Degradation and Stability* 95: 2200-2206
70. Fortunati E., Armentano I, Zhou Q., Iannonia A., Saino E. Visai L. Berglund L.A. Kenny J.M., 2012, Multifunctional bionanocomposite films of poly(lactic acid), cellulose nanocrystals and silver nanoparticles, *Carbohydrate Polymers* 87: 1596–1605
71. Fortunati E., Peltzer M., Armentano I, Jiménez A., Kenny J.M., 2013, Combined effects of cellulose nanocrystals and silver nanoparticles on the barrier and migration properties of PLA nano-biocomposites, *Journal of Food Engineering*, 118: 117–124
72. Fox C. L., Silver sulfadiazine: a new topical therapy for *Pseudomonas* in burns., 1968, *Archives of Surgery*, 96: 184–188

73. Fundueanu G., Nastruzzi C., Carpov A., Desbrieres J., Rinaudo M., 1999, Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods, *Biomaterials*, 20: 1427–1435.
74. Galya T., Sedlarik V., Kuritka I., Novotny R., Sedlarikova J., Saha P., 2008, Antibacterial poly(vinyl alcohol) film containing silver nanoparticles: Preparation and characterization, *Journal of Applied Polymer Science*, 110: 3178–3185
75. Ganji F., Vasheghani-Farahani S., Vasheghani-Farahani E., 2010, Theoretical description of hydrogel swelling: A Review, *Iranian Polymer Journal* 19: 375-398.
76. Gautam G.P., Singh S.R., 2007., A simple polyol synthesis of silver metal nanopowder of uniform particles. *Synthetic Metals*, 157: 5-10.
77. Ge L., Wang M., Ouyang J., Li X., Xing M. M.Q., 2014, Nanosilver particles in medical applications: Synthesis, performance, and toxicity. *International Journal of Nanomedicine*, 9: 2399–2407.
78. Gethin G. T., Cowman S., Conroy R. M., 2008, The impact of Manuka honey dressings on the surface pH of chronic wounds. *International Wound Journal* 5: 185–94.
79. Goetz N., Fabricius L., Glaus R., Weitbrecht V., Günther D., Hungerbühler K., 2013, Migration of silver from commercial plastic food containers and implications for consumer exposure assessment, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30: 612-620.
80. Gombotz W.R., Wee S.F., 2012, Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Review*, 64: 194-205.
81. González-Sánchez M.I., Perni S., Tommasi G., Morris N.G., Hawkins K., López-Cabarcos E., Prokopovich P., 2015, Silver nanoparticle based antibacterial methacrylate hydrogels potential for bone graft applications, *Material Science and Engineering C*, 50: 332–340.
82. Gorrasi G., Sorrentino A., Pantani R., 2015, Modulation of biodegradation rate of poly(lactic acid) by silver nanoparticles, *Journal of Polymers and the Environment* 23: 316.
83. Grant G. T., Morris E. R., Rees D. A., Smith P. J. C., Thom D., 1973, Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *Febs Letters*, 32: 195–8.

84. Grassi M, Sandolo C, Perin D, Coviello T, Lapasin R, Grassi G., 2009. Structural characterization of calcium alginate matrices by means of mechanical and release tests. *Molecules*, 14: 3003–3017.
85. Gupta V., Kumar A., 2014, Nanosilver products – a review, *Chemical Science Review and Letters*, 3: 717–727
86. Guzman M., Dille J., Godet S., 2012, Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8: 37–45
87. Hamad K., Kaseem M., Yang H.W., Deri F., Ko Y. G, 2015, Properties and medical applications of polylactic acid: A review, *eXPRESS Polymer Letters*, 9:435–455
88. Hassan C. M., Peppas N. A., 2000, Structure and application of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods., *Advances in Polymer Science*, 153: 37-65.
89. Hassan, R.M., 1991. Alginate polyelectrolyte ionotropic gels 7. Physico-chemical studies on silver(I) alginate complex with special attention to the electrical conductance and geometrical structure. *Colloids and Surfaces*, 60: 203–212.
90. Hassan, R.M., 1993. Alginate polyelectrolyte Ionotropic gels. XIII geometrical aspects for chelation in metal alginate complexes related to their physico-chemical properties. *Polymer International*, 31: 81–86.
91. Haug, A., Smidsrød, O., 1970. Selectivity of Some Anionic Polymers for Divalent Metal Ions., *Acta Chemica Scandinavica*, 24: 843–854.
92. Hauri J.F., Neice B.K., 2011, Leaching of silver from silver-impregnated food storage containers., *Journal of Chemical Education*. 88:1407–1409
93. Haw C.Y., Mohamed F., Chia C.H, Radiman S., Zakaria S., Huang N.M., Lim H.N., 2010, Hydrothermal synthesis of magnetite nanoparticles as MRI contrast agents, *Ceramics International* 36, 1417–1422
94. He D., Bligh M.W., Waite T.D., 2013, Effects of aggregate structure on the dissolution kinetics of citrate-stabilized silver nanoparticles., *Environ Sci Technol* 47: 9148–9156.

95. Heinzen C., Marison I., Berger A., von Stockar U., 2002, Use of vibration technology for jet break-up for encapsulation of cells, microbes and liquids in monodisperse microcapsules, *Landbauforsch Voelkenrode*, 241: 19–25.
96. Holte O., Tønnesen H.H., Karlsen J., 2006. Measurement of diffusion through calcium alginate gel matrices., *Die Pharmazie*, 61: 30–34.
97. Holte O, Tonnesen H, Karlsen J., 2007, Effect of charge and size of diffusing probe on the diffusion through calcium alginate gel matrices. *Pharmazie* 62:914–918.
98. Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., Schillinger U., 2001, Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 365S–73S.
99. Hoppe C.E., Lazzar M., Pardinias-Blanco I., Lopez-Quintela A., 2006, One-step synthesis of gold and silver hydrosols using poly(n-vinyl-2-pyrrolidone) as a reducing agent., *Langmuir*., 22: 7027-7034.
100. Hu L., Kim H. S., Lee J.-Y., Peumans P., Cui Y., 2010, Scalable coating and properties of transparent, flexible, silver nanowire electrodes, *ACS nano*, 4, 2955-2963.
101. Huang B.Y., Chen S., Bing X., Gao C., 2011, Nanosilver migrated into food - simulating solutions from commercially available food fresh containers, *Packaging Technology and Science*, 24: 291-297
102. Hume S.L., Jeerage K.M., 2013, Surface chemistry and size influence the release of model therapeutic nanoparticles from poly(ethylene glycol) hydrogels., *Journal of Nanoparticle Research*, 15:1635–1651
103. Hwang, E.T., Lee, J.H., Chae, Y.J., Kim, Y.S., Kim, B.C., Sang, B., Gu, M.B., 2008., Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria, *Small*, 4:746-750.
104. Ishigaki T., Kawagoshi Y., Ike M., Fujita M., 1999, Biodegradation of a polyvinyl alcohol-starch blend plastic film. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15: 321–327.
105. Jabeen N., Majid I, Ahmad Nayik G., 2015, Bioplastics and food packaging: A review, *Cogent Food & Agriculture*, 1: 1117749

106. Jain J., Arora S., Rajwade J. M., Omray P., Khandelwal S., Paknikar K. M., 2009, Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use, *Molecular Pharmaceutics*, 6: 1388 – 1401
107. Ji J.H., Jung J.H., Kim S.S., Yoon J.U., Park J.D., Choi B.S., Chung Y.H., Kwon I.H., Jeong J., Han B.S., Shin J.H., Sung J.H., Song K.S., Yu I.J., 2007, Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague–Dawley rats. *Inhalation Toxicology*, 19: 857–871.
108. Jovanović, Ž., Stojkowska J., Obradovic B., Miskovic-Stankovic V., 2012. Alginate hydrogel microbeads incorporated with Ag nanoparticles obtained by electrochemical method. *Materials Chemistry and Physics*, 133: 182–189.
109. Jovanovic Z., Radosavljevic A., Kacarevic-Popovic Z., Stojkowska J., Peric-Grujic A., Ristic M., Matic I.Z., Juranic Z.D., Obradovic B., Miskovic-Stankovic V., 2013, Bioreactor validation and biocompatibility of Ag/poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogel nanocomposites, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 105: 230–235.
110. Jun J., Yuan D.Y., Shao W.H., Shao Z.F., Zhong W.Y., 2007, Preparation and characterization of antibacterial silver-containing nanofibers for wound dressing applications. *Journal of US-China Medical Science-David Publishing Company*, 4: 52–54.
111. Kashiwagi Y., Yamamoto M., Nakamoto M., 2006. Facile size-regulated synthesis of silver nanoparticles by controlled thermolysis of silver alkylcarboxylates in the presence of alkylamines with different chain lengths., *Journal of Colloid and Interface Science*, 300: 169–175
112. Kapur V., Charkoudian J., Anderson J.L., 1997, Transport of proteins through gel-filled porous membranes, *Journal of Membrane Science*, 131:143–153.
113. Keshavartz T., Ramsden G., Phillips P., Mussenden P.B.C., 1992. Application of electric field for production of immobilized biocatalysts. *Biotechnology Techniques*, 6: 445–450.
114. Khanna P.K., Singh N., Charan S., Subbarao V.V.V.S., Gokhale R., Mulik U.P., 2005, Synthesis and characterization of Ag/PVA nanocomposite by chemical reduction method, *Materials Chemistry and Physics*, 93: 117–121
115. 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., Cho M.H., 2007, Antimicrobial effects of silver nanoparticles, *Nanomedicine*, 3:95-101.
- Kirsner R.S., Orsted H., Wright J.B., 2001, Matrix metalloproteinases in normal and impaired wound healing: a potential role for nanocrystalline silver, *Wounds*, 13: 4C-12C
116. Kittler S., Greulich C., Diendorf J., Koller M., Epple M., 2010, Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions., *Chemistry of Materials*, 22:4548-4554.
117. Klok T.I., Melvik J.E., 2002, Controlling the size of alginate gel beads by use of a high electrostatic potential, *Journal of Microencapsulation*. 19: 415-24
118. Kobayashi M., Toguchida J. Oka M., 2003, Preliminary study of polyvinyl alcohol hydrogel (PVA-H) artificial meniscus. *Biomaterials*, 24, 639-47.
119. Kon E., Filardo G., Di Matteo B., Perdisa F., Marcacci M., 2013, Matrix assisted autologous chondrocyte transplantation for cartilage treatment: A systematic review, *Bone and Joint Research*, 2: 18-25.
120. Kosto K.B., Deen W. M., 2005, Hindered Convection of Macromolecules in Hydrogels, *Biophysical Journal*, 88: 277-286
121. Kosto K.B., Deen W. M., 2004, Diffusivities of macromolecules in composite hydrogels, *AIChE Journal*, 50: 2648-2658
122. Krishnaraj C., Ramachandran R., Mohan K., Kalaichelvan P.T., 2012, Optimization for rapid synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi, *Spectrochimica Acta Part A*, 93: 95- 99
123. Krklješ A. N., Marinović-Cincović M. T., Kacarevic-Popovic Z. M., Nedeljković J. M., Radiolytic synthesis and characterization of Ag-PVA nanocomposites, *European Polymer Journal*, 43: 2171-2176
124. Larsen B. E., Bjørnstad J., Pettersen E. O., Tønnesen H. H., Melvik J. E., 2015, Rheological characterization of an injectable alginate gel system, *BMC Biotechnology* , 15:29
125. Lee P.C., Meisel D., 1982, Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *Journal of Physical Chemistry*, 86: 3391-3395.
126. Lee K.J., Nallathamby P.D., Browning L.M., Osgood C.J., Xu X.H., 2007, In vivo imaging of transport and biocompatibility of silver nanoparticles in early

- development of zebrafish embryos. *ACS Nano*, 1: 133–143.
127. Lee K.Y., Mooney D.J., 2012. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*: 37: 106–126.
 128. Leo W. J., Mcloughlin A. J., Malone D. M., 1990, Effects of sterilization treatments on some properties of alginate solutions and gels, *Biotechnology progress*, 6: 51–53
 129. Lengert E., Yashchenok A. M., Atkin V., Lapanje A., Gorin D. A., Sukhorukov G.B., Parakhonskiy B.V., 2016, Hollow silver alginate microspheres for drug delivery and surface enhanced Raman scattering detection. *RSC Advances.*, 6: 20447–20452.
 130. Levard C., Mitra S., Yang T., Jew A.D., Badireddy A.R., Lowry G.V., Brown G.E., 2013, Effect of chloride on the dissolution rate of silver nanoparticles and toxicity to *E. coli.*, *Environmental Science and Technology*, 47:5738–5745.
 131. Li X, Lenhart J.J, Walker H.W., 2010, Dissolution-accompanied aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Langmuir* 26:16690–16698
 132. Lim J.K., Yeap P.S., Che H. X., Low S. C., 2013, Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering, *Nanoscale Research Letters*, 8: 381.
 133. Liu J., Hurt R.H., 2010, Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids., *Environmental Science and Technology*, 44: 2169–2175.
 134. Liu J., Sonshine D.A., Shervani S., Hurt R.H., 2010, Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces., *ACS Nano*, 4:6903–6913.
 135. Liu Y., Zheng Z., Zara J.N., Hsu C., Soofer D.E., Lee K.S., Siu R.K., Miller L.S., Zhang X., Carpenter D., Wang C., Ting K., Soo C., 2012, The antimicrobial and osteoinductive properties of silver nanoparticle/poly (dl-lactic-co-glycolic acid)-coated stainless steel, *Biomaterials*, 33: 8745–8756
 136. Loeschner K., Hadrup N., Qvortrup K., Larsen A., Gao X., Vogel U., Mortensen A., Lam H.R., Larsen E.H., 2011., Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Particle and Fibre Toxicology*, 8: 1–14
 137. Lu Y., Chou K., 2010, Tailoring of silver wires and their performance as transparent conductive coatings, *Nanotechnology*, 21: 215707.

138. Mahapatra S. K., Bogle K. A., Dhole S. D., Bhoraskar V. N., 2007, Synthesis of gold and silver nanoparticles by electron irradiation at 5–15 keV energy., *Nanotechnology* 18: 1-5.
139. Marambio-Jones C., Hoek E. M. V., 2010, A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment, *Journal of Nanoparticles Research*, 12:1531–1551
140. Martinsen A., Skjåk-Braek, G., Smidsrød, O., 1989. Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnology and bioengineering*, 33: 79–89.
141. Martínez-Abad, A., Lagaron, J.M., Ocio, M.J., 2012. Development and characterization of silver-based antimicrobial ethylene-vinyl alcohol copolymer (EVOH) films for food-packaging applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 5350–5359.
142. Masutani K., Kimura Y., Chapter 1: PLA Synthesis. From the Monomer to the Polymer, in *Poly(lactic acid) Science and Technology: Processing, Properties, Additives and Applications*, 2014, pp. 1-36
143. Metak A.M., Ajaal T.T., 2013, Investigation of polymer based nano-sivler as food packaging materials, *International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering*, 7: 780 – 786.
144. Mitragotri S., Lahann J., 2009, Physical approaches to biomaterial design. *Nature Materials*, 8: 15–23
145. Mitrovic D, Stojkovska J., Obradovic B., 2010, Ispitivanje mogućnosti kontrolisane razgradnje alginatnih mikročestica. *Hemijska industrija* 64: 253-63.
146. Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramírez J.T., Yacaman M.J., 2005, The bactericidal effect of silver nanoparticles, *Nanotechnology*, 16: 2346-2353
147. Mutsuga M, Kawamura Y., Tanamoto K., 2008, Migration of lactic acid, lactide and oligomers from polylactide food-contact materials., *Food Additive and Contaminants*, 25:1283–90.
148. Nadworny P.L., Wang J., Tredget E.E., Burrell R.E., 2010, Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver-derived solutions in porcine contact dermatitis., *Journal of Inflammation*, 7:13.

149. Nedovic V., Obradovic B., Poncelet D., Goosen M.F.A., Leskošek-Čukalović I., Bugarski B., 2002, Cell immobilization by electrostatic droplet generation, *Landbauforschung Volkenrode*, 241: 11-17
150. Novikova L.N., Novikov L.N., Kellerth J.O., 2003, Biopolymers and biodegradable smart implants for tissue regeneration after spinal cord injury. *Current Opinion in Neurology*, 16: 711–715.
151. Nowack B., Krug H. F., Height M., 2011, 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers, *Environ. Sci. Technol.*, 45: 1177–1183
152. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J., 2005, Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113: 823–839.
153. Obradovic B, Miskovic-Stankovic V, Jovanovic Z, Stojkovska J, 2015, Production of alginate microbeads with incorporated silver nanoparticles. Patent RS53508 B1
154. O'Brien F.J., Harley B.A., Waller M.A., Yannas I.V., Gibson L.J., Prendergast P.J., 2007, The effect of pore size on permeability and cell attachment in collagen scaffolds for tissue engineering, *Technology and Health Care*. 15:3-17.
155. Ogbonna J.C., in: Nedovic V. and Willaert R (Eds.), *Fundamentals of cell immobilisation biotechnology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2004, pp. 327–341
156. Ott L. S., Finke R.G., 2007, Transition-metal nanocluster stabilization for catalysis: A critical review of ranking methods and putative stabilizers, *Coordination Chemistry Reviews*, 251: 1075–1100
157. Ozkar S., Finke R.G., 2002, Nanocluster formation and stabilization fundamental studies: ranking commonly employed anionic stabilizers via the development, then application, of five comparative criteria, *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124: 5796-5810
158. Panacek A., Kvitek L., Prucek R., Kolar M., Vecerova R., Pizurova N., Sharma V.K., Nevecna T., Zboril R., 2006, Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity, *The Journal of Physical Chemistry. B*, 110:16248-16253.

159. Paquesab J. P., van der Lindenb E., van Rijna C.J.M, Sagis L.M.C, 2014, Preparation methods of alginate nanoparticles, *Advances in Colloid and Interface Science*, 209: 163–171
160. Paramelle D., Sadovoy A, Gorelik S., Free P., Hobley J., Fernig D. G, 2014, A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra, *Analyst*, 1: 1-7
161. Park J. H., Im K. H., Lee S. H., Kim D. H., Lee D. Y., Lee Y. K., Kim K. M., Kim K. N., 2005, Preparation and characterization of magnetic chitosan particles for hyperthermia application. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293: 328-33.
162. Patil R.S., Kokate M.R., Jambhale C.L., Pawar S.M., Han S.H., Kolekar S.S., 2012, One-pot synthesis of PVA capped silver nanoparticles their characterization and biomedical application, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 3: 1-7
163. Paul W, Sharma C.P., 2004, Chitosan and alginate wounddressings: a short review. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 18:18–23
164. Pei H.N., Chen X.G., Li Y., Zhou H.Y., 2006. Characterization and ornidazole release in vitro of a novel composite film prepared with chitosan/poly(vinyl alcohol)/alginate. *Journal of Biomedical Material Research Part A* 85A:566–572.
165. Pencheva D., Bryaskova R., Kantardjiev T., 2012, Polyvinyl alcohol/silver nanoparticles (PVA/AgNps) as a model for testing the biological activity of hybrid materials with included silver nanoparticles, *Materials Science and Engineering C* 32: 2048–2051
166. Peretyazhko T.S., Zhang Q., Colvin V.L., 2014, Size-controlled dissolution of silver nanoparticles at neutral and acidic pH conditions: kinetics and size changes, *Environmental Science and Technology*, 48: 11954-11961
167. Peulen T-O, Wilkinson K.J., 2011, Diffusion of nanoparticles in a biofilm. *Environ Sci Technol*, 45: 3367–3373.
168. Piergiovanni L., Limbo S. 2016. Food packaging materials. Milan, Italy: Springer Verlag Italia. 56 p.
169. Poncelet, D., Babak V.G., Neufeld R. J., Goosen M. F A. Bugarski B., 1999. Theory of electrostatic dispersion of polymer solutions in the production of

- microgel beads containing biocatalyst, *Advances in Colloid and Interface Science*, 79: 213–228.
170. Pouran H.M., Martin F.L., Zhang H., 2014, Measurement of ZnO nanoparticles using diffusive gradients in thin films: binding and diffusional characteristics, *Analytical Chemistry*, 86: 5906–5913.
171. Pradel K. C., Sohn K., Huang J., 2011, Cross-flow purification of nanowires, *Angewandte Chemie International Edition*, 50: 3412-3416
172. Prusse U., Vorlop K.D., in: Nedovic V. and Willaert R. (Eds.), *Fundamentals of cell immobilisation biotechnology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2004, pp. 295–309
173. Puguan J.M.C, Yu X., Kim H., 2015, Diffusion characteristics of different molecular weight solutes in Ca–alginate gel beads, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 469: 158–165
174. Quah B., Musante C., White J.C., Ma X, 2015, Phytotoxicity, uptake, and accumulation of silver with different particle sizes and chemical forms, *Journal of Nanoparticle Research*, 17, 1–13.
175. Quadros M.E., Marr L.C., 2010, Environmental and human health risks of aerosolized silver nanoparticles. *Journal of the Air and Waste Management Association*, 60:770–781.
176. Queen D., Orsted H., Sanda H., Sussman G., 2004, A dressing history. *International Wound Journal*, 1:59–77
177. Rajendra P. P., Tekale S.U., Shisodia S.U., Tore J.T., Domb A.J., 2014, Biomedical applications od poly(lactic acid), *Recent Patents on Regenerative Medicine*, 4: 40-51
178. Rasmussen M.R., Snabe T., Pedersen L.H., 2003. Numerical modelling of insulin and amyloglucosidase release from swelling Ca-alginate beads. *Journal of Controlled Release*, 91: 395–405.
179. Rehm B.H.A., *Alginates: Biology and Applications*, Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 2009
180. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products (Text with EEA relevance)

181. Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and of the council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products
182. Regulation (EU) No 1291/2013 of the European Parliament and of the council of 11 December 2013 establishing Horizon 2020 – the Framework Programme for Research and Innovation (2014-2020) and repealing Decision No 1982/2006/EC
183. Reidy B., Haase A., Luch A., Dawson K.A., Lynch I., 2013, Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: A critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications. *Materials*, 6: 2295–2350.
184. Reiss, E. R., Artz, C. P., 1954, Current status of research in treatment of burns. *Mil. Surg.* 114: 187–190.
185. Rendel M., Mayer C., Weninger W., Tschachler E., 2001, Topically applied of lactic acid increases spontaneous secretion of vascular endothelial growth factor by human constructed epidermis. *British Journal of Dermatology* 145: 3-9.
186. Richards V.N., Rath N.P., Buhro W.E., 2010, Pathway from a molecular precursor to silver nanoparticles: the prominent role of aggregative growth, *Chemistry of Materials*, 22: 3556-3567
187. Rigo C., Ferroni L., Tocco I., Roman M, Munivrana I., Gardin C. Vincenzo. C, Vindigni, Azzena B.,³ Barbante C., Zavan B., 2013, Active silver nanoparticles for wound healing, *International Journal of Molecular Science*, 14: 4817–4840.
188. Ristić I.S., Nikolić L.B., Cakić S. M., Radičević R.Ž, Pilić B.M., Budinski-Simendić J.K., 2012, Poli(laktid): dostignuća i perspective, *Savremene tehnologije*, 1: 67-77.
189. Riudavets, J., Salas, I., Pons, M.J., 2007, Damage characteristics produced by insect pests in packaging film. *Journal of Stored Product Research*, 43: 564:570.
190. Rose S, Marcellan A, Hourdet D, Creton C, Narita T., 2013, Dynamics of hybrid polyacrylamide hydrogels containing silica nanoparticles studied by dynamic light scattering. *Macromolecules*, 46:4567–4574.
191. Rushton I., 2007, Understanding the role of proteases and pH in wound healing. *Nursing Standard* 21: 68-72.

192. Sastry M., Patil V., Sainkar, S.R. 1998, Electrostatically controlled diffusion of carboxylic acid derivatized silver colloidal particles in thermally evaporated fatty amine films., *Journal of Physical Chemistry B*, 102: 1404–1410
193. Sanches Silva A., Cruz J.M., Sendón García R., Franz, R., Paseiro Losada, P., 2007, Kinetic migration studies from packaging films into meat products, *Meat Science*, 77: 238 – 245.
194. Scallan J., Huxley V.H., Korthuis R.J., *Capillary Fluid Exchange: Regulation, Functions, and Pathology*, Chpt 2, Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA), 2010.
195. Seo S.Y, Lee G.H., Lee S.G., Jung S.Y., Limc J.O., Choi J.H., 2012, Alginate-based composite sponge containing silver nanoparticles synthesized in situ, *Carbohydrate Polymers* 90: 109–115
196. Senjen, R. 2007. Nanosilver – a threat to soil, water and human health? *Friends of the Earth Australia*, March 2007.
197. Shameli K, Ahmad M.B, Yunus W.M.Z.W., Ibrahim N.A., R.A., Jokar M., Darroudi M., 2010, Silver/poly (lactic acid) nanocomposites: preparation, characterization, and antibacterial activity, *International Journal of Nanomedicine*, 5: 573–579.
198. Sharma V. K., Yngard R. A., Lin, Y., 2009, Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science* 145: 83–96.
199. Siepmann J., Siepmann F., 2012, Modeling of diffusion controlled drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 161: 351–362
200. Šimon P., Chaudhry Q., Bakoš D., 2008, Migration of engineered nanoparticles from polymer packaging to food – a physicochemical view, *Journal of Food and Nutrition Research*, 47: 105-113.
201. Smidsrød O., Skjak-Brik G., 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, 8: 71–78.
202. Smidsrød, O., 1974. Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 57: 263–274.

203. Sondi I., Salopek-Sondi B., 2004, Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria, *Journal of colloid and Interface science*, 275: 177-182
204. Song H., Lib B., Linb Q.-B., Wua H.-J., Chen Y., 2011, Migration of silver from nanosilver–polyethylene composite packaging into food stimulants, *Food Additives and Contaminants*, 28: 1758–1762.
205. Soo-Hwan K., Lee H-S., Ryu D-S., Choi S-J, Lee D-S., 2011, Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Korean Journal of Microbiol and Biotechnology*, 39: 77–85
206. Stasica P., Rosiak J.M., Ciach M., Radek M., 2000, Approach to construct hydrogel intervertebral discs implants – experimental and numerical investigations, *Engineering of Biomaterials* 3: 9-14.
207. Stewart W.W., Swaisgood H.E., 1993, Characterization of calcium alginate pore diameter by size-exclusion chromatography using protein standards. *Enzyme and Microbial Technology*, 3: 922–927.
208. Stiles M.E., Holzapfel W.H., 1997, Review article: lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36:1-29
209. Stojkovska J., Zvicer J., Jovanović Ž., Mišković-Stanković V., Obradović B., 2012, Controlled production of alginate nanocomposites with incorporated silver nanoparticles aimed for biomedical application, *Journal of The Serbian Chemical Society*, 77: 1709 - 1722
210. Stojkovska J., Jovanovic Z., Jančić I., Bufan B, Milenković M., Mišković-Stanković V., Obradović B., 2013, Novel Ag/alginate nanocomposites for wound treatments: animal studies. *Rane* 4:17–22
211. Stojkovska J., Kostic D., Jovanovic Z., Vukasinovic-Sekulic M., Miskovic-Stankovic V., Obradovic B., 2014, A comprehensive approach to in vitro functional evaluation of Ag/alginate nanocomposite hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, 111:305–314.
212. Stojkovska J., 2015, Dobijanje i karakterisanje nanokompozitnih hidrogelova na bazi alginata i nanočestica srebra za primenu u biomedicini, *Doktorska disertacija*, Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd.
213. Sugimoto T., Kimijima K., 2003., New approach to the formation mechanism of

- AgCl nanoparticles in a Reverse Micelle System, *The Journal Physical Chemistry B*, 107: 10753–10759.
214. Sultana K., Godward G., Reynolds N., Arumugaswamy R, Peiris P., Kailasapathy K., 2000, Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt, *International Journal of Food Microbiology*, 62: 47–55
215. Sun Y., Gates B., Mayers B., Xia Y., 2002, Crystalline silver nanowires by soft solution processing, *Nano Letters*, 2: 165-168.
216. Sun R.W., Chen R., Chung N.P., Ho C.M., Lin C.L., Che C.M., 2005. Silver nanoparticles fabricated in HEPES buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells, *Chemical Communications*, 40:5059-5061.
217. Sun C.Y., Che Y.J., Lu S.J., 2015, Preparation and application of collagen scaffoldencapsulated silver nanoparticles and bone morphogenetic protein 2 for enhancing the repair of infected bone, *Biotechnology Letteres*, 37: 467-473.
218. Sung J., Ji J., Park J.D., Yoon J.U., Kim D.S., Jeon K.S., Song M.Y., Jeong J., Han B.S., Han J.H., Chung Y.H., Chang H.K., Lee J.H., Cho M.H., Kelman B.J., Yu I.J., 2009, Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicological Science*, 108:452–461.
219. Tawakkal I. S. M. A., Cran M. J, Miltz J., Bigger S. W., 2014, A review of poly(lactic acid)-based materials for antimicrobial packaging, *Journal of food science*, 79: 1477-1490
220. The EFSA Journal (2005) 201, 1-28, Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to a 7th list of substances for food contact materials
221. Tian J., Wong K.K., Ho C.M., Lok C.N., Yu W.Y., Che C.M., Chiu J.F., Tam P.K. 2007, Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing, *ChemMedChem.*, 2:129-136
222. Torres E., Mata Y.N., Blazquez A.L., Munoz J.A., Gonzalez F, Ballester A., 2005, Gold and silver uptake and nanoprecipitation on calciumalginate beads. *Langmuir*, 21: 7951-7958
223. Torres L.G., Velasquez A., Brito-Arias M.A., 2011, Ca-alginate spheres

- behavior in presence of some solvents and water-solvent mixtures. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2: 8–12.
224. Toshima N., Kanemaru M., Shiraishi Y., Koga Y., Spontaneous formation of core/shell bimetallic nanoparticles: a calorimetric study. *Journal of Physical Chemistry B*, 2005, 109: 16326-16326.
225. Turkevich J., Stevenson P., Hillier J., 1951, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11: 55–75.
226. Ueng S. W. N., Yuan L.-J., Lee N., Lin S-S, Chan E-C., Weng J-H, 2004, In vivo study of biodegradable alginate antibiotic beads in rabbits, *Journal of Orthopaedic Research*, 22: 592-599
227. Van der Veeken P. L., Pinheiro J. P.; Van Leeuwen H. P., 2008, Metal speciation by DGT/DET in colloidal complex systems, *Environmental Science and Technology*, 42: 8835–8840
228. Vance M.E., Kuiken T., Vejerano E.P., McGinnis S.P., Hochella M.F. Jr, Rejeski D., Hull M.S., 2015, Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6: 1769–1780.
229. Varaprasad K., Mohan Y.M., Vimala K., Mohana Raju K., 2011, Synthesis and characterization of hydrogel-silver nanoparticle-curcumin composites for wound dressing and antibacterial application., *Journal of Applied Polymer Science* 121:784–796.
230. Varas R.P., O'Keeffe T., Namias N., Pizano L.R., Quintana O.D., Herrero Tellachea M., Rashid Q., Ward C.G., 2005, Prospective, randomized trial of acticoat versus silver sulfadiazine in the treatment of partial-thickness burns: which method is less painful?, *Journal of Burn Care and Rehabilitation*, 36: 333-347
231. Vito C., Quatela M.D., Jen C.M.D., 2008, Facial plastic surgery clinics of North America., *Synthetic Facial Implants.*, 16:1–10.

232. Wang J., Lu Z., Gao Y., M. Wientjes G., Au J.L. S., 2011, Improving delivery and efficacy of nanomedicines in solid tumors: Role of tumor priming, *Nanomedicine (Lond)*, 6: 1605-1620
233. Wang C.C., Yang K.C., Lin K.H., Liu Y.L., Liu H.C., Lin F.H., 2012. Cartilage regeneration in SCID mice using a highly organized three-dimensional alginate scaffold. *Biomaterials*, 33-120–127.
234. Wee Y.J., Kim J.N., Ryu H.W., 2006, Biotechnological production of lactic acid and its recent applications., *Food Technology and Biotechnology*, 44: 163–172
235. White J. A., Deen W. M., 2002, Agarose-dextran gels as synthetic analogs of glomerular basement membrane, water permeability, *Biophysical Journal*, 82: 2081–2089
236. 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., Geertsma R.E. 2009, Nanosilver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment, *Nanotoxicology*, 3: 109-138.
237. William W.S., Harold E.S., 1993, Characterization of calcium alginate pore diameter by size-exclusion chromatography using protein standards., *Enzyme and Microbial Technology*, 15: 922–927.
238. Wright J.B., Lam K., Hansen D., Burrell R.E., 1999. Efficacy of topical silver against fungal burn wound pathogens. *American Journal of Infection Control*, 27: 344-350
239. Xiao Y., Wiesner M.R., 2013, Transport and retention of selected engineered nanoparticles by porous media in the presence of a biofilm, *Environmental Science and Technology*, 47, 2246–2253
240. Xu X., Yang Q., Wang Y., Yu H., Chen X., Jing X, 2006, Biodegradable electrospun poly(L-lactide) fibers containing antibacterial silver nanoparticles, *European Polymer Journal* 42: 2081–2087
241. Yang J., Pan J., 2012, Hydrothermal synthesis of silver nanoparticles by sodium alginate and their applications in surface-enhanced Raman scattering and catalysis, *Acta Materialia*, 60: 4753–4758

242. Yin H.Q., Langford R., Burrell R.E., 1999. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of Acticoat antimicrobial barrier dressing. *The Journal of Burn Care and Rehabilitation*, 20: 195-200.
243. Zarzycki R., Modrzejewska Z., Nwrotek K., 2010, Drug release from hydrogel matrices, *Ecological Chemistry and Engineering*, 17:117-136
244. Zhao X., Xia Y., Li Q., Ma X., Quan F., Geng C., Han Z., 2013, Microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles using sodium alginate and their antibacterial activity, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 444: 180–188
245. Zhang W., Yao Y., Sullivan N., Chen Y.S., 2011, Modeling the primary size effects of citrate-coated silver nanoparticles on their ion release kinetics. *Environmental Science and Technology*, 45: 4422–4428.
246. Zu Y., Zhang Y., Zhao X., Shan C., Zu S., Wang K., Li Y., Ge Y., 2012, Preparation and characterization of chitosan–polyvinyl alcohol blend hydrogels for the controlled release of nano-insulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50:82–7.

Biografija

Danijela Kostić rođena je 07.08.1986. godine u Beogradu. Završila je osnovnu školu i gimnaziju u Beogradu. Osnovne studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu započela je 2005/2006 školske godine, a završila u oktobru 2009. godine sa prosečnom ocenom 8,85 na Odseku za hemijsko inženjerstvo. Završni rad pod nazivom „Ispitivanje inženjerstva tkiva hrskavije u protočnom bioreaktoru“ odbranila je sa ocenom 10. Tokom završne godine osnovnih studija bila je stipendista Ministarstva omladine i sporta Republike Srbije, odnosno Fonda za mlade talente. Master studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu započela je 2009/2010 školske godine, a završila u oktobru 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,75 na studijskom programu Hemijsko inženjerstvo. Master rad pod nazivom „Ispitivanje primene alginatnih mikročestica i bioreaktora sa dinamičkom kompresijom za inženjerstvo tkiva hrskavice“ odbranila je sa ocenom 10 na studijskom programu Hemijsko inženjerstvo. Školske 2010/2011 upisala je doktorske studije na matičnom fakultetu, na studijskom programu Hemijsko inženjerstvo. Položila je sve predviđene ispite na doktorskim studijama, kao i završni ispit, sa prosečnom ocenom 9,67.

Od februara 2011. zaposlena je u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta u zvanju istraživač-pripravnik na projektima: „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnika za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih supstanci u cilju povećanja konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti hrane“ br. III46010 i „Sinteza, razvoj tehnologija dobijanja i primena nanostrukturnih multifunkcionalnih materijala definisanih svojstava“ br. III45019. Pohađala je tri međunarodne letnje škole iz oblasti inženjerstva tkiva i regenerativne medicine u Sloveniji (2010), Nemačkoj (2011) i Kipru (2014), a rezultate svog naučno-istraživačkog rada je predstavila na jedanaest međunarodnih konferencija. Bila je na IAESTE stručnoj praksi iz tretmana otpadnih voda u Siriji (2009) i na jednom studijskom boravku od mesec dana u Centru za inženjerstvo materijala na Univerzitetu u Perudi u Italiji (2012) i mesec dana u kompaniji za inženjerstvo tkiva hrskavice “Stematters” u Portugaliji (2016). Govori engleski jezik i služi se nemačkim.

Danijela Kostić je do sada objavila 2 rada u međunarodnim časopiima, 3 rada saopštena na međunarodnim skupovima štampana u izvodu i 2 rada saopštena na nacionalnim naučnim skupovima štampana u izvodu koja su proistekla iz doktorske disertacije. Još je i koautor na dva rada objavljena u međunarodnim časopisima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Danijela Kostić

број индекса 4071/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Kinetika i mehanizam otpuštanja srebra iz nanokompozitnih Ag/alginatnih hidrogelova

za različite primene

- 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, 16.10.2017

Danijela Kostić

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____Danijela Kostić_____

Број индекса _____4071/2010_____

Студијски програм _____Hemijsko inženjerstvo_____

Наслов рада _____Kinetika i mehanizam otpuštanja srebra iz nanokompozitnih
Ag/alginatnih hidrogelova za različite primene_____

Ментор _____prof dr Bojana Obradović_____

Потписани/а _____Danijela Kostić_____

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, 16.10.2017

Danijela Kostić

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Kinetika i mehanizam otpuštanja srebra iz nanokompozitnih Ag/alginatnih hidrogelova za različite primene

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, 16.10.2017

Đanielo Karbić

1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.