

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Ivana S. Malagurski

**DOBIJANJE I KARAKTERIZACIJA
NEMINERALIZOVANIH I
MINERALIZOVANIH BIOMATERIJALA
NA BAZI POLISAHARIDA MORSKIH
ALGI I ESENCIJALNOG METALA
CINKA**

doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Ivana S. Malagurski

**PRODUCTION AND
CHARACTERIZATION OF NON-
MINERALIZED AND MINERALIZED
BIOMATERIALS BASED ON SEAWEED
POLYSACCHARIDES AND ESSENTIAL
METAL ZINC**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

Mentor:

dr Suzana Dimitrijević-Branković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Članovi komisije:

dr Petar Uskoković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

dr Vladimir Pavlović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Jasmina Nikodijević-Runić, naučni savetnik
Institut za molekularni genetiku i genetičko inženjerstvo

Datum odbrane doktorske disertacije:

Zahvaljujem se mentoru, prof. dr Suzani Dimitrijević-Branković, prof. dr Vladimiru Pavloviću, dr Stevi Leviću, dr Mileni Pantić, dr Danki Matijašević, dr Aleksandri Nešić, Danijeli, Dašku, Mlađi i mom Ivankoviću.

Dobijanje i karakterizacija nemineralizovanih i mineralizovanih biomaterijala na bazi polisaharida morskih algi i esencijalnog metala cinka

Rezime

U ovoj tezi je ispitana mogućnost sinteze novih, poboljšanih biomaterijala na bazi alginata, agara i cinka, primenom biomimetičkog principa dizajna – biomineralizacije. Cilj istraživanja je bio dizajn i karakterizacija novih nanokompozitnih biomaterijala, sa potencijalnom primenom u biomedicini i pakovanju hrane.

Novi, bioaktivni i antimikrobni nanokompozitni Zn-mineralizovani Zn-alginatni uzorci (cink-karbonat/cink-alginat i cink-fosfat/cink-alginat) su sintetisani u formi mikročestica primenom metode elektrostatičke ekstruzije. Prisustvo Zn-mineralne faze i njen tip su značajno uticali na morfologiju, ukupni sadržaj Zn(II), stabilnost i potencijal za otpuštanje Zn(II) iz dobijenih uzoraka. Mineralizovani uzorci su imali veći sadržaj Zn(II), poboljšanu stabilnost i povoljnije profile otpuštanja Zn(II) u biološki relevantnom okruženju u poređenju sa nemineralizovanim. Alginat, kao biopolimerni matriks, je aktivno učestvovao u biomineralizaciji putem selekcije određenog polimorfa i morfologije, kao i ograničavanja rasta inkorporiranih kristala. Proces mineralizacije je bio efikasniji kod fosfatom mineralizovanih uzoraka što je dovelo do većeg sadržaja mineralne faze i cinka u odnosu na karbonatom mineralizovane uzorke. Svi testirani uzorci su pokazali snažno antimikrobno dejstvo na *S. aureus* i *C. albicans*. Tretman *E. coli* sa karbonatom mineralizovanim uzorcima imao je potpuno biocidno dejstvo, dok je tretman sa fosfatom mineralizovanim uzorcima imao bakteriostatičko dejstvo

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da alginatom posredovana biomineralizacija, gde mineralna faza predstavlja so esencijalnog metala cinka, predstavlja dobru strategiju za dizajn antimikrobnih i bioaktivnih biomaterijala sa potencijalnom biomedicinskom primenom. Produkcija je jednostavna, jeftina i pruža mogućnost modifikovanja karakteristika biomaterijala putem variranja sintetskih parametara.

Novi Zn-mineralizovani nanokompozitni filmovi na bazi agara uspešno su sintetisani kombinacijom *in situ* sinteze mineralne faze i metode izlivanja. Prisustvo Zn-mineralne faze i njen tip su značajno uticali na morfologiju, karakteristike i

funkcionalnost dobijenih uzoraka. U karbonatom mineralizovanom uzorku, minerali su bili manjih dimenzija i uniformno distribuirani, za razliku od fosfatom mineralizovanih uzorka gde su minerali obrazovali nasumično raspoređene agregate većih dimenzija što implicira da proces biomineralizacije posredovane agarom nije isti za karbonate i fosfate. Razlike u mikrostrukturi dovele su i do različitih karakteristika odgovarajućih nanokompozita. Impregnacija karbonatnom fazom dovela je do nastanka kompaktnih nanokompozita sa poboljšanim mehaničkim i barijernim svojstvima i ovaj efekat je bio srazmeran količini minerala u materijalu. Nasuprot tome, prisustvo fosfatne faze imalo je neznatan uticaj na mehaničke osobine odgovarajućih filmova. Obe formulacije nanokompozita su, usled deponovanja Zn-minerala, imale poboljšana optička i termička svojstva i povoljnije profile otpuštanja Zn(II) u medijumu sa nižim pH u odnosu na nemineralizovane filmove. Dodatno, obe formulacije nanokompozita su pokazale jako antimikrobno dejstvo na *S. aureus* i *C. albicans* i slabiji bakteriostatički efekat na *E. coli*.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se impregniranjem agarnih filmova sa Zn-karbonatnom mineralnom fazom dobijaju biokompatibilni, nanokompozitni biomaterijali poboljšanih i modularnih svojstava, koji su ujedno i antimikrobni i kao takvi mogu se potencijalno koristiti kao aktivna pakovanja za hranu. Procedura za sintezu je jednostavna, ekonomična i ekološki prihvatljiva.

Ključne reči: alginat, agar, cink, nanokompoziti, biomineralizacija, antimikrobna aktivnost

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

UDK broj:

Production and characterization of non-mineralized and mineralized biomaterials based on seaweed polysaccharides and essential metal zinc

Abstract

The aim of this study was to test the hypothesis whether biopolymer-based biomineralization, with essential metal salts, Zn-minerals, can be considered a good platform for designing nanocomposite biomaterials for potential biomedical and active food packaging applications.

New, bioactive and antimicrobial biomaterials were produced by alginate-mediated biomineralization with Zn-mineral phase. The samples were synthesized in the form of microbeads using electrostatic extrusion method. The synthesis procedure was simple, cost-effective and resulted in two different Zn-mineralized alginate nanocomposites: Zn-carbonate/Zn-alginate and Zn-phosphate/Zn-alginate. The presence of Zn-mineral phase and its type, have significantly affected nanocomposite morphology, stability, total metallic loading and potential to release Zn(II) in physiological environment. Mineralized samples had higher Zn(II) content, proved to be more stable and exhibited better release profiles when compared to the non-mineralized sample. Alginate was actively involved in the formation of mineral phase within hydrogel network in terms of crystallite dimensions and selectivity towards specific polymorph or morphology. Additionally, mineralization process was more efficient when phosphate mineral precursor was used which resulted in higher mineral phase and Zn(II) content in phosphate-mineralized samples. Antimicrobial experiments showed that both types of Zn-mineralized nanocomposites exhibit strong antimicrobial effect against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *E. coli* was completely eliminated after treatment with carbonate-mineralized samples, while treatment with the phosphate-mineralized significantly reduced the number of viable cells after 4 h. The obtained results suggest that alginate-mediated biomineralization, where minerals are salts of essential metallic ions like Zn(II), represents a good strategy for designing multifunctional biomaterials for potential biomedical applications. The synthesis procedure offers possibilities for tuning biomaterial properties by changing production parameters.

New, mineralized, agar-based nanocomposite films (Zn-carbonate/agar and Zn-phosphate/agar) were produced by a combination of *in situ* precipitation and casting method. The presence of minerals significantly influenced morphology, properties and functionality of the obtained nanocomposite films. The Zn-carbonate minerals were smaller in size and more uniformly distributed throughout the agar matrix, in contrast to the phosphate mineralized sample, where Zn-phosphate phase was in the form of agglomerates randomly distributed into agar matrix. Differences in internal structure produced different characteristics of the corresponding nanocomposites. Reinforcement with Zn-carbonate phase resulted in well developed, compact nanocomposites with improved, in a concentration-dependent manner, both mechanical and water vapor permeability properties. On the other side, impregnation with phosphate minerals had a negligible effect on the phosphate-mineralized sample properties. Both nanocomposites showed improved optical and thermal properties, better Zn(II) release potential in slightly acidic environment and exhibited antimicrobial activity against *S. aureus* and *C. albicans*. These results suggest that Zn-mineralized agar nanocomposite films could be potentially used as affordable, eco-friendly and active food packaging materials with tunable properties. Production procedure offers possibilities for increasing Zn-mineral content without compromising corresponding nanocomposite properties.

Keywords: alginate, agar, zinc, nanocomposites, biomineralization, antimicrobial activity

Scientific field: Technological engineering

Scientific discipline: Biochemical engineering and biotechnology

UDC number:

Sadržaj

UVOD	1
1. TEORIJSKI DEO	3
1.1. Alginat.....	3
1.1.1. Primena alginata u biomedicini.....	6
1.2. Esencijalni metalni joni kao terapijski agensi.....	9
1.3. Cink – biološka uloga.....	12
1.3.1. Uloga cinka u zarastanju rana.....	16
1.3.2. Uloga cinka u metabolizmu koštanog tkiva.....	18
1.3.3. Antimikrobno dejstvo cinka.....	20
1.4. Biomineralizacija kao strategija u dizajnu biomaterijala.....	22
1.5. Elektrostatička ekstruzija.....	26
1.6. Aktivna ambalaža za pakovanje prehrambenih proizvoda.....	27
1.6.1. Agar-agar.....	31
1.6.2. Aktivni filmovi na bazi alginata i agara.....	32
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	36
3. MATERIJALI I METODE	38
3.1. Biomaterijali na bazi alginata, cinka i minerala cinka za potencijalnu biomedicinsku primenu.....	38
3.1.1. Sinteza nemineralizovanih cink-alginata.....	38
3.1.1.1. Materijali.....	38
3.1.1.2. Postupak sinteze nemineralizovanih cink-alginata.....	38
3.1.2. Metode karakterizacije nemineralizovanih cink-alginata.....	39
3.1.2.1. Optička mikroskopija.....	39
3.1.2.2. Sadržaj Zn(II).....	39
3.1.2.3. Kinetika otpuštanja Zn(II).....	40
3.1.3. Sinteza nanokompozita na bazi alginata i minerala cinka.....	40
3.1.3.1. Materijali.....	40
3.1.3.2. Postupak sinteze nanokompozita na bazi alginata i minerala cinka.....	41
3.1.4. Metode karakterizacije nanokompozita na bazi alginata i minerala cinka.....	42
3.1.4.1. Optička mikroskopija.....	42
3.1.4.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM).....	43

3.1.4.3. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) ...	43
3.1.4.4. Difrakcija X-zraka (XRD)	43
3.1.4.5. Ramanska spektroskopija.....	43
3.1.4.6. Termogravimetrijska analiza (TGA)	43
3.1.4.7. Ukupni sadržaj Zn(II)	44
3.1.4.8. Kinetika otpuštanja Zn(II)	44
3.1.4.9. Antimikrobna aktivnost.....	44
3.1.4.10. Statistička analiza.....	45
3.2. Bioaktivni filmovi na bazi cinka, minerala cinka, alginata i agara.....	46
3.2.1. Zn-mineralizovani Zn-alginatni filmovi.....	46
3.2.1.1. Materijali.....	46
3.2.1.2. Postupak sinteze Zn-mineralizovanih Zn-alginatnih filmova.....	46
3.2.1.3. Metode karakterizacije Zn-mineralizovanih Zn-alginatnih filmova.....	47
3.2.2. Zn-mineralizovani nanokompozitni filmovi na bazi agar-agara.....	47
3.2.3. Sinteza Zn-mineralizovanih agarnih filmova sa naknadnom sintezom mineralne faze.....	47
3.2.3.1. Materijali i metode.....	47
3.2.3.2. Postupak sinteze Zn-mineralizovanih nanokompozitnih filmova na bazi agar- agara - naknadna sinteza Zn-mineralne faze.....	47
3.2.3.3. Metode karakterizacije Zn-mineralizovanih nanokompozitnih filmova na bazi agar-agara dobijenih naknadnom sintezom Zn-mineralne faze.....	48
3.2.4. Sinteza Zn-mineralizovanih agarnih filmova sa istovremenom sintezom mineralne faze.....	49
3.2.4.1. Materijali.....	49
3.2.4.2. Postupak sinteze Zn-mineralizovanih nanokompozitnih filmova na bazi agara – simultana sinteza Zn-mineralne faze.....	49
3.2.5. Metode karakterizacije Zn-mineralizovanih nanokompozitnih filmova na bazi agara nastalih simultana sinteza Zn-mineralne faze.....	51
3.2.5.1. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)	51
3.2.5.2. Energetska disperzivna spektroskopija (EDS)	51
3.2.5.3. Optičke karakteristike.....	51
3.2.5.4. Karakterizacija mineralne faze i mineral-polimer interakcija.....	51
3.2.5.5. Mehanička karakterizacija.....	52
3.2.5.6. Propustljivost vodene pare.....	52

3.2.5.7. Termogravimetrijska analiza (TGA)	53
3.2.5.8. Ukupni sadržaj Zn(II)	53
3.2.5.9. Kinetika otpuštanja Zn(II)	53
3.2.5.10. Antimikrobna aktivnost.....	54
3.2.5.11. Statistička analiza.....	54
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	55
4.1. Biomaterijali na bazi alginata, cinka i minerala cinka.....	55
4.1.1. Neminerilizovani i Zn-mineralizovani, nanokompozitni Zn-alginatni biomaterijali.....	55
4.1.1.1. Morfologija.....	55
4.1.1.2. Karakterizacija inkorporirane Zn-mineralne faze u Zn-mineralizovanim/Zn-alginatnim nanokompozitima.....	58
4.1.1.2.1. XRD analiza.....	58
4.1.1.2.2. FTIR.....	60
4.1.1.2.3. Ramanska spektroskopija.....	62
4.1.1.3. Evaluacija karakteristika dobijenih Zn-mineralizovanih/Zn-alginatnih nanokompozita.....	63
4.1.1.3.1. Sadržaj Zn(II)	63
4.1.1.3.2. TGA.....	63
4.1.1.3.3. Kinetika otpuštanja Zn(II)	65
4.1.1.3.4. Antimikrobna aktivnost.....	67
4.2. Bioaktivni filmovi na bazi cinka, minerala cinka, alginata i agara.....	71
4.2.1. Zn-mineralizovani Zn-alginatni filmovi.....	71
4.2.2. Zn-mineralizovani nanokompozitni filmovi na bazi agara.....	74
4.2.2.1. Zn-mineralizovani agarni filmova dobijeni sa naknadnom sintezom mineralne faze.....	74
4.2.2.2. Zn-mineralizovanih agarnih filmova dobijeni sa simultanom sintezom mineralne faze.....	80
4.2.2.2.1. Morfologija.....	81
4.2.2.2.2. Karakterizacija inkorporirane Zn-mineralne faze u nanokompozitima na bazi agara dobijenih simultanom sintezom mineralne faze.....	82
4.2.2.2.2.1. XRD.....	82
4.2.2.2.2.2. FTIR.....	83

4.2.2.2.3. Ramanska spektroskopija.....	85
4.2.2.2.3. Karakterizacija Zn-mineralizovanih agarnih filmova dobijenih simultanom sintezom mineralne faze.....	86
4.2.2.2.3.1. Optičke karakteristike.....	86
4.2.2.2.3.2. Mehaničke karakteristike.....	88
4.2.2.2.3.3. Propustljivost vodene pare.....	90
4.2.2.2.3.4. TGA.....	92
4.2.2.2.3.5. Sadržaj cinka.....	93
4.2.2.2.3.6. Kinetika otpuštanja Zn(II).....	94
4.2.2.2.3.7. Antimikrobna aktivnost.....	95
5. ZAKLJUČAK.....	98
Literatura.....	101
Biografija.....	122

UVOD

Alginatni hidrogelovi se primarno koriste u biomedicini, ali postoje izvesna ograničenja u njihovoj terapijskoj aplikaciji. Prvo se odnosi na ograničenu stabilnost u biološkim sistemima usled izmene strukturnih jona hidrogela sa okolinom što dovodi do degradacije hidrogela. Drugo i mnogo važnije, alginatni hidrogelovi ne poseduju bioaktivnost niti antimikrobni potencijal.

Metalni joni predstavljaju novu klasu fiziološki aktivnih agensa jer posreduju u mnogim normalnim i patološkim metaboličkim procesima. Esencijalni metali, u koje spada cink, su posebno značajni za adekvatno funkcionisanje metabolizma jer deluju kao kofaktori mnogih enzima i signalni medijatori bioloških procesa. Cink je neophodan za normalan rast, funkcionisanje nervnog i imunog sistema, a posreduje i u procesu zarastanje rana. Pored bioaktivnog dejstva, cink poseduje i izraženo antimikrobno dejstvo.

Najjednostavniji način za poboljšanje karakteristika alginatnih hidrogelova je korišćenje nekog od esencijalnih metalnih jona kao strukturne i funkcionalne komponente u procesu sinteze. U ovom doktoratu su ispitana dva načina sinteze novih, alginatnih hidrogelova poboljšanih karakteristika. Prvi, jednostavniji metod, podrazumeva geliranje alginata sa esencijalnim metalnim jonima. Drugi metod fabrikacije alginatnih hidrogelova poboljšanih karakteristika je zasnovan na prirodom-inspirisanom principu dizajna – biomineralizaciji. Ukoliko se alginatni matriks impregnira čvršćom fazom, npr. mineralima, moguće je dobiti kompozit boljih svojstava i produžene stabilnosti. Dodatno, ukoliko ova mineralna faza predstavlja so nekog od esencijalnih metala, kao što je cink, mineralni depoziti deluju i kao rezervoar bioaktivnih i antimikrobnih metalnih jona u fiziološkim sistemima i doprinose ukupnom sadržaju metala u biomaterijalu. Cilj istraživanja je bio dizajn, karakterizacija i evaluacija antimikrobnog potencijala novih Zn-mineralizovanih nanokompozitnih biomaterijala na bazi alginata sa potencijalnom biomedicinskom primenom kao obloge za rane sa antimikrobnim dejstvom ili bioaktivnog nosača u tkivnom inženjerstvu.

Druga potencijalna primena nanokompozitnih biomaterijala na bazi minerala cinka i prirodnih polisaharida bila bi u oblasti pakovanja hrane. I alginat i agar imaju široku

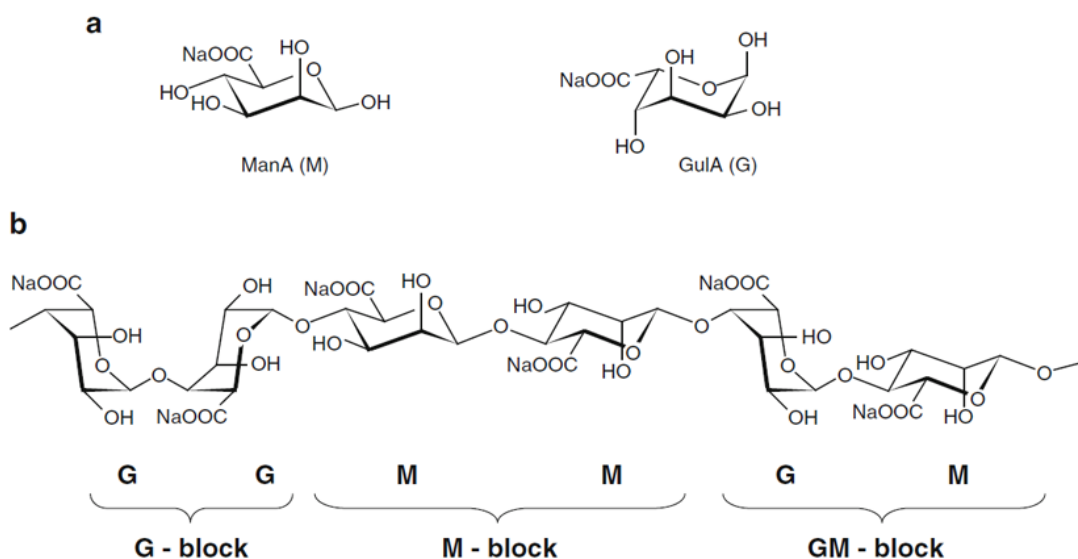
primenu u oblasti pakovanja hrane kao jestiva i biorazgradiva komponenta, dok se cinkova jedinjenja, zbog svoje netoksičnosti i visoke efikasnosti kao antimikrobni agensi, takođe mogu se primeniti u izradi funkcionalnih pakovanja za hranu (tzv. aktivna pakovanja). Prisustvo cinka unutar alginatnog ili agarnog hidrogela obezbedilo bi antimikrobnu aktivnost i uticalo na karakteristike i stabilnost dobijenog funkcionalnog pakovanja. Stoga se drugi deo teze odnosi na sintezu, karakterizaciju i evaluaciju antimikrobne aktivnosti Zn-mineralizovanih nanokompozitnih filmova na bazi alginata, odn. agara.

1. TEORIJSKI DEO

1.1. Alginat

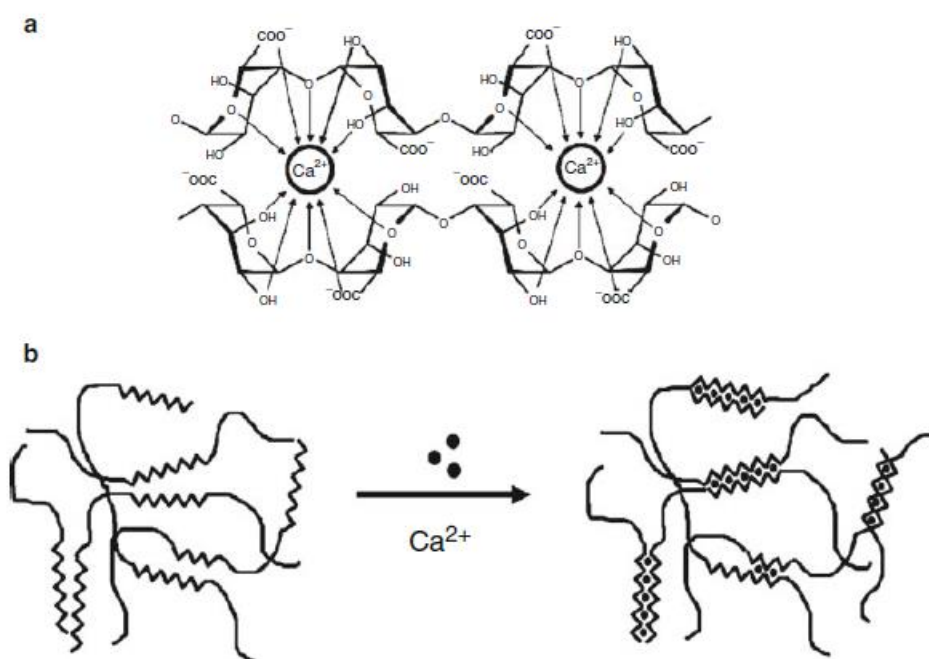
Pod alginatima podrazumevamo familiju strukturnih polisaharida sintetisanih od strane mrkih morskih algi klase *Phaeophyceae* i bakterija roda *Azotobacter* i *Pseudomonas* (Donati & Paoletti, 2009). Osnovna uloga alginata u ovim organizmima je primarno zaštitna: on obezbeđuje mehaničku snagu i fleksibilnost algama i sprečava dehidraciju, dok kod bakterija ulazi u sastav zaštitnih cisti i biofilmova. Komercijalno dostupan alginat se izoluje iz mrkih algi (*Laminaria hyperborea* ili *Laminaria digitata*) alkalnim tretmanom, a zatim se dejstvom natrijum- ili kalcijum-hlorida precipitira u obliku soli (Smidsrod & Skjak-Braek, 1990; Qin, 2008).

Sa hemijskog stanovišta, alginati su linearni, negativno naelektrisani kopolimeri uronata: β -D-manuronskih (M) i α -L-guluronskih (G) jedinica, povezanih 1,4 – glikozidnim vezama, koje su organizovane u homopolimerne (M- i G-blokovi) i heteropolimerne (MG-blokovi) regione (**Slika 1.1**) (Haug i sar., 1967). Odnos i redosled M i G jedinica, unutar polimera, u velikoj meri zavise od vrste i lokacije algi i određuju fizičko-hemijske osobine alginata (George & Abraham, 2006).



Slika 1.1. Hemijska struktura alginata: (a) M i G jedinice; (b) homopolimerni (GG i MM) i heteropolimerni (GM) blokovi (Donati & Paoletti, 2009).

Glavna karakteristika alginata, sa stanovišta industrijske i biotehnoške primene, vezana je za njegovu sposobnost da u prisustvu dvovalentnih katjona gradi hidrogelove. Mehanizam alginatnog geliranja je objašnjen “egg-box” modelom (Grant i sar., 1973; Morris i sar., 1978) i zasniva se na formiranju zona povezivanja (inter- i intralančanih asocijacija) između 2 molekula polimera ili različitih delova istog molekula polimera što dovodi do umrežavanja i nastanka trodimenzionalnih polimernih mreža ispunjenih vodom. Svaka zona povezivanja se sastoji od dvovalentnog katjona koji reaguje sa dva para guluronskih jedinica iz različitih lanaca, ili različitih delova istog lanca (**Slika 1.2**).

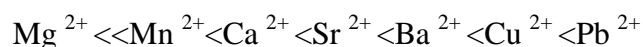


Slika 1.2. Geliranje alginata u prisustvu dvovalentnih katjona: (a) “egg-box” model i (b) formiranje zona povezivanja i interlančanih asocijacija (Donati & Paoletti, 2009).

Eksperimentalnu potvrdu „egg-box“ modela dala je NMR spektroskopija (Steginsky i sar., 1992) i XRD analiza (Sikorski i sar., 2007), gde je pokazano da se zone povezivanja sastoje od dimera polimernih lanaca koji međusobno reaguju putem koordinativno vezanog divalentnog katjona, uz delimične lateralne asocijacije lanaca usled nespecifičnih elektrostatičkih interakcija.

Geliranje se odvija spontano, jer je proces egzoterman (prelaz iz neuređenog u uređeno stanje) (Cesaro i sar., 1988a) i karakteriše se pozitivnom promenom entropije usled oslobađanja velikog broja molekula vode iz solvatacionih sfera katjona i polimera (Cesaro i sar., 1988b). Vezivanje jednog divalentnog katjona, povećava afinitet polimera ka vezivanju narednog katjona olakšavajući sledeći korak umrežavanja tako da se može reći da je proces autokooperativan. Što je veća koncentracija dostupnih divalentnih katjona, geliranje će biti efikasnije, dovodeći do otpuštanja veće količine strukturne vode i smanjena dimenzija i mase nastalih hidrogelova. Fenomen oslobađanja strukturne vode iz rastvora Na-alginata prilikom geliranja i kontrakcije hidrogela usled umrežavanja, naziva se sinerezis.

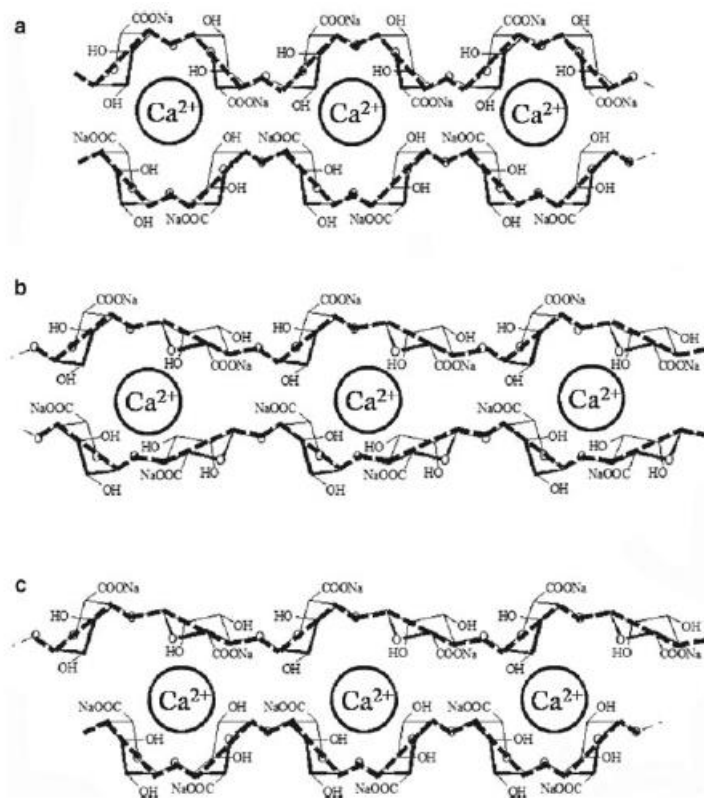
Afinitet alginata ka vezivanju dvovalentnih katjona nije isti za sve metale i raste sledećim redosledom (Haug & Smidsrod, 1970):



Razlike u afinitetu ka vezivanju katjona uslovljene su specifičnim geometrijskim zahtevima vezivnih mesta prilikom interakcije metala sa polimerom. Vezivanje za GG blokove je najpovoljnije u energetskom smislu, a samim tim i najviše favorizovano, jer je geometrija takva da omogućava smeštanje katjona u šupljinu ograničenu sa po dve G jedinice iz različitih lanaca polimera. U slučaju kada su sva guluronska mesta zaposednuta, divalentni katjoni počinju da reaguju i sa MM i MG blokovima gradeći mešovite zone povezivanja (MG/GG i MG/MG) koje se lakše raskidaju od čistih guluronskih (**Slika 1.3**). Iako ne doprinose u velikoj meri umreženosti alginata, mešovite zone povezivanja su značajne za elastičnost hidrogelova jer omogućavaju klizanje, relaksaciju i uspostavljanje novog prostornog položaja među lancima prilikom defomacije (Donati i sar., 2009). Različita uloga homopolimernih i heteropolimernih blokova u alginatnom hidrogelu posledica je različite fleksibilnosti veza između uronskih jedinica. Naime, veza GG je aksijalna i kruta, dok su veze MM i MG ekvatorijalne i fleksibilne, pri čemu fleksibilnost opada sledećim redosledom: MG > MM > GG.

Zahvaljujući izuzetnim sposobnostima zadržavanja vode, geliranja, činjenici da je dostupan i biokompatibilan i da može da se koristi kao stabilizator i sredstvo za povećanje

viskoznosti, alginat ima široku primenu u prehrambenoj, tekstilnoj, kozmetičkoj industriji i biotehnologiji (Donati & Paoletti, 2009). Posebno značajnu oblast primene alginata predstavlja biomedicina.



Slika 1.3. Struktura mogućih zona povezivanja alginatnih lanaca: (a) GG/GG; (b) MG/MG i (c) GG/MG (Donati & Paoletti, 2009).

1.1.1. Primena alginata u biomedicini

Alginatni hidrogelovi, najčešće u obliku Ca-alginata, poseduju mnoge poželjne karakteristike koje ih čine pogodnim za različite biomedicinske aplikacije kao što su nosači za ćelije u tkivnom inženjstvu, matrice za kontrolisano otpuštanje lekova ili obloge za rane. Oni su hidrofilni, biokompatibilni, netoksični, hipoalergijski, imaju visok kapacitet apsorpcije tečnosti i formiraju su pod blagim uslovima kao što su sobna ili telesna temperatura ili neutralan pH (Donati & Paoletti, 2009; Lee & Mooney, 2012).

Najilustrativniji primer kliničke primene alginatnih hidrogelova su komercijalno dostupne obloge za rane i opekotine na bazi alginata: Algicell™ (Derma Science), Sorbsan™ (UDL Laboratories) ili Comfeel Plus™ (Coloplast). Poznavanjem mehanizma zarastanja rana, moguće je razviti funkcionalne obloge za rane, koje istovremeno predstavljaju barijeru, koja sprečava rast mikroorganizama i štiti tkivo, omogućava nesmetan transfer kiseonika, obezbeđuje adekvatnu vlažnost uz simultanu apsorpciju viška ekskudata i pruža optimalno okruženje u kome se promoviraju regenerativni procesi i pospešuje zarastanje (Lloyd i sar., 1998; Queen i sar., 2004). Alginat namenjen primeni u tretmanu rana se, najčešće, nalazi u anhidrovanoj formi, koja, nakon kontakta sa ranom, bubri, prelazi ponovo u gel stanje i adaptira se obliku rane. Dodatnu prednost primeni alginata u tretmanu rana predstavlja i činjenica da je proces previjanja bezbolan i komforan za pacijente jer se alginat lako uklanja rastvaranjem (Gilchrist & Martin, 1983).

Mnogobrojne studije su pokazale da je alginat uključen u više aspekata procesa zarastanja rana. Utvrđeno je da oslobođeni kalcijum iz Ca-alginatna deluje homeostatski, tj. zaustavlja krvarenje (Boateng i sar., 2008; Lloyd i sar., 1998), aktivira makrofage (Thomas i sar., 2000) i indukuje proliferaciju fibroblasta koji zatim posreduju u remodelovanju ekstracelularnog matriksa i zarastanju rana (Doyle i sar., 1997).

Zahvaljujući nanoporoznosti (prečnik pora oko 5 nm) (Boonthekul i sar., 2005), alginatni hidrogelovi su se pokazali atraktivnim kao matrice za kontrolisano i lokalizovano dopremanje i otpuštanje lekova ili fiziološki aktivnih agenasa. Ovi sistemi su posebno pogodni za proteine (faktori rasta, monoklonska antitela, itd.) jer ih je moguće imobilisati u hidrogel pri blagim uslovima (fiziološki pH i temperatura) i tako sačuvati njihovu aktivnost (Chan i sar., 2010; Wells & Sheardown, 2007). Uzimajući u obzir da se alginat može koristiti kako za oralnu administraciju, tako i za tkivno-specifične rute, on u ovim sistemima ne deluje samo kao nosač, već i štiti lek od spoljašnjih faktora i obezbeđuje „prepoznavanje“ specifične sredine u kojoj će se lek otpustiti. Naime, prilikom razvijanja sistema za oralnu administraciju insulina, alginatni omotač se pokazao efikasnim u sprečavanju otpuštanja i inaktivacije proteina na niskom pH želuca i omogućio je dopremanje i otpuštanje insulina na neutralnom pH tankog creva (Silva i sar., 2006). Kinetika otpuštanja leka zavisi od stepena umreženosti hidrogela, prirode leka i njegove

interakcije sa polimerom. Primećeno je da kovalentno umrežavanja alginata, dovodi do produženog otpuštanja inkorporiranog leka usled povećane stabilnosti i smanjenog bubrenja hidrogela (Maiti i sar., 2009). Takođe, inertni lekovi, koji ne reaguju sa alginatom, se brže otpuštaju u odnosu na one koji su, na primer, vezani za alginatne lance kovalentnom vezom (Bouhadir i sar., 2001).

Posebnu oblast biomedicinske primene alginatnih hidrogelova predstavljaju tkivno inženjstvo i regenerativna medicina. Zahvaljujući biokompatibilnosti, blagim uslovima geliranja i mogućnostima modifikacije, alginatni hidrogelovi su idealni nosači ćelija u *in vitro* i *in vivo* uslovima. *In vitro* sistemi predstavljaju 2D- i 3D-kulture ćelija koje mogu poslužiti kao tkivni konstrukti ili model sistemi za izučavanje normalnih i patoloških procesa (Meyer i sar., 2009). U zavisnosti od tipa ćelija koji je imobilisan, kao i uslova pod kojima se vrši kultivacija (prisustva hemijskih, bioloških i biofizičkih stimulusa), moguće je indukovati i održati specifičan ćelijski fenotip, stimulisati sintezu ekstracelularnog matriksa i dobiti tkivni konstrukt koji se zatim može implantirati u organizam ili služiti za izučavanje određenog biološkog procesa. Studija sa imobilisanim primarnim hondrocitima je pokazala da bakar-alginat ima pozitivan efekat na proliferaciju i sintetsku aktivnost ćelija i da je efikasan u indukciji hondrogenetskog fenotipa u 3D-kulturi (Madzovska-Malagurski i sar., 2016). Uzimajući u obzir da je primarni cilj tkivnog inženjstva gajenje ekvivalenata tkiva i organa *in vitro* (Meyer i sar., 2009), do sada su mnogi tipovi ćelija uspešno imobilisani u alginatu, kao što su npr. osteoblasti (Valente i sar., 2012), hondrociti (Degala i sar., 2011; Madzovska-Malagurski i sar., 2016), ili matične ćelije (Hsiong i sar., 2008; Wang i sar., 2003) i praćena je njihova diferencijacija u smeru specifičnog tkiva u zavisnosti od prirode spoljašnjih stimulusa.

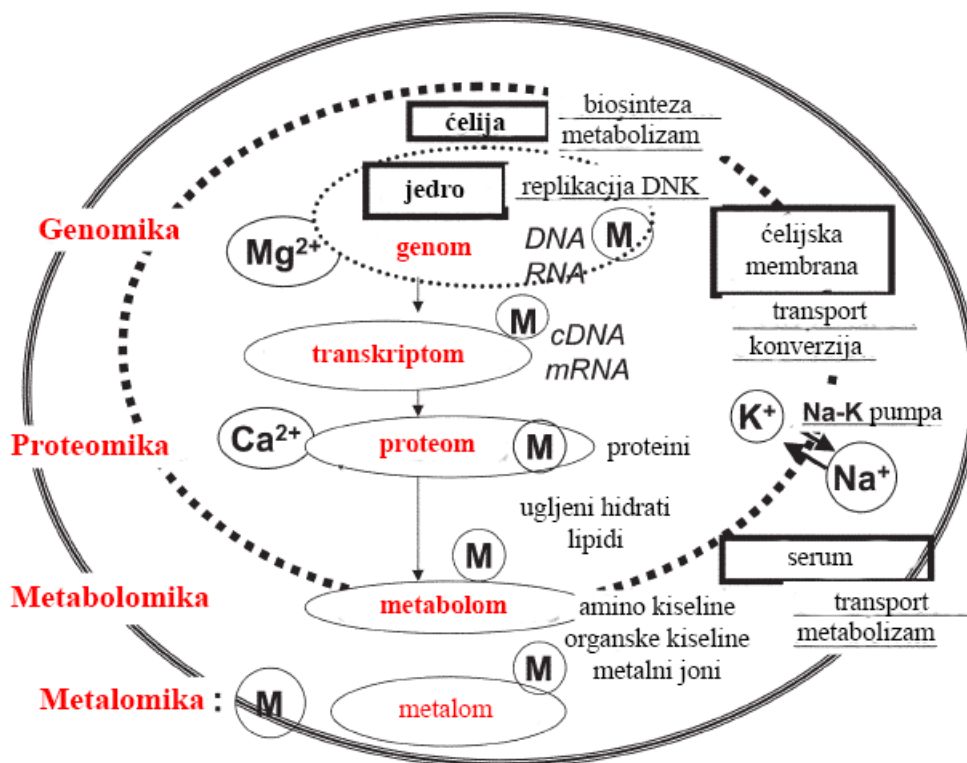
Nasuprot tkivnom inženjstvu, regenerativna medicina podrazumeva aktiviranje regenerativnog potencijala samog organizma u cilju reparacije narušene strukture i funkcije. I na ovom polju je alginat našao široku primenu. Naime, *in vivo* studije su pokazale da je u ishemičnim regionima tkiva, moguće uspešno indukovati angiogenezu putem kontrolisanog dopremanja i lokalizovanog i kontinualanog otpuštanja faktora rasta (Jay & Saltzman, 2009; Sun i sar., 2010) i/ili ćelija (Peters i sar., 2002) putem alginatnih matrica/nosača. Pored krvnih sudova, postoje mnogobrojni literaturni podaci koji se odnose

na alginatom posredovane regeneracije kosti (Basmanav i sar., 2008; Kolambkar i sar., 2011) ili hrskavice (Igarashi i sar., 2010; Ma i sar., 2003).

Ipak, postoje izvesna ograničenja u biomedicinskoj i terapijskoj primeni alginata. Glavna mana se odnosi na njihovu pasivnu ulogu u organizmu, odnosno, nedostatak bioaktivnosti i antimikrobnog potencijala. Pod bioaktivnošću podrazumevamo sposobnost biomaterijala da indukuje specifičan biološki odgovor u fiziološkom okruženju podržavanjem procesa ćelijske komunikacije, migracije, proliferacije i diferencijacije. Takođe, integritet i mehaničke karakteristike alginatnih hidrogelova su, u velikoj meri, određeni sredinom u kojoj se nalaze (Bajpai & Sharma, 2004; Morch i sar., 2006). Stoga je veliki napor uložen u razvoj metoda za poboljšanje strukturnih i funkcionalnih karakteristika biomaterijala na bazi alginata kao što su: kovalentno umrežavanje (Lee i sar., 2000), hemijske modifikacije (Pawar & Edgar, 2012), sinteza kompozita (Murakami i sar., 2010), ili inkorporacija fiziološki aktivnih agenasa (Bouhadir i sar., 2001).

1.2. Esencijalni metalni joni kao terapijski agensi

Metalni joni predstavljaju esencijalne komponente živih sistema. Oni učestvuju u formiranju aktivnog mesta i stabilizaciji strukture enzima, regulišu gensku ekspresiju, aktiviraju signalne puteve u ćeliji i održavaju osmotski i vodni balans organizma. Smatra se da trećina svih do sada poznatih proteina zahteva za svoju funkciju prisustvo metalnog kofaktora. O tome koliki značaj imaju metali u organizmu, svedoči i uspostavljanje potpuno nove, multidisciplinarnе oblasti – metalomike, koja se bavi izučavanjem svih metalnih i metalodinih vrsta u biološkim sistemima i karakterisanjem mehanizama životnih procesa u kojima učestvuju, **Slika 1.4.** (Haraguchi, 2004; Mounicou & Szpunar, 2009).

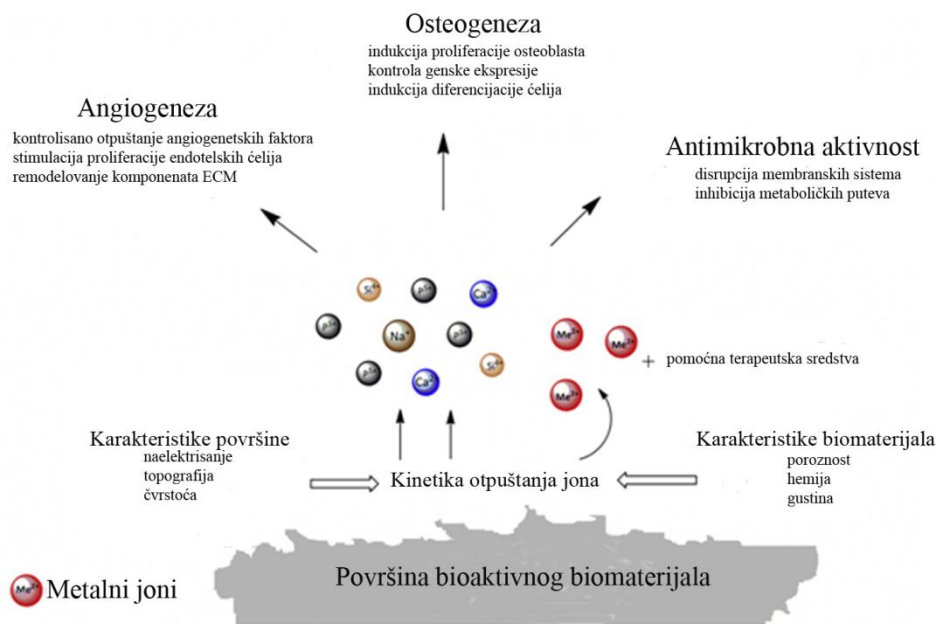


Slika 1.4. Šematski prikaz bioloških sistema: učešće metala u različitim aspektima funkcionisanja organizma (Haraguchi, 2004).

Narušena homeostaza metalnih jona u organizmu je uzrok mnogih patoloških stanja. Kakav će efekat imati metalni joni na organizam, zavisi od njihove koncentracije, lokalizacije, oksidacionog broja i prirode liganada za koje su vezani. Održavanje ravnoteže metalnih jona u organizmu je veoma precizno regulisano, a njeno narušavanje usled mutacije pojedinih gena, koji kodiraju proteine uključene u metabolizam metala, ili nagomilavanja pojedinih metala, usled akutne ili hronične intoksikacije, dovodi do ozbiljnih poremećaja.

Uloga metalnih jona u normalnim i patološkim fiziološkim procesima, ukazala je na njihovu potencijalnu primenu u terapijske svrhe. U farmaciji i medicini, metalni joni, predstavljaju posebnu klasu fiziološki aktivnih agensa koji su označeni kao bioinorganici (Habibovic & Barralet, 2011).

Biomaterijali koji se koriste u medicini, pored netoksičnosti, neimunogenosti i biodegradabilnosti, moraju da budu i bioaktivni. Pod bioaktivnošću se podrazumeva podržavanje i aktivno učešće u fiziološkim procesima organizma. Pametnim dizajnom, tačnije izborom i modifikacijama hemijskog sastava materijala od kojeg je izrađen nosač, arhitekturom, poroznošću i inkorporiranjem fiziološki aktivnih agensa (metalni joni, faktori rasta), moguće je poboljšati bioaktivnost nosača nove generacije. U zavisnosti od toga koji tip biološkog odgovora se želi aktivirati u organizmu, biraju se specifični parametri dizajna i vrsta bioaktivnih agensa koji se nalaze u nosaču. Faktori rasta su efikasni, ali i izuzetno skupi, karakterišu se kratkim poluživotom u organizmu i potencijalnim rizikom prilikom primene. Za razliku od njih, metalni joni su dostupni, jeftini, stabilni tokom procesa fabrikacije nosača (koji često podrazumeva visoke vrednosti temperature i pritiska, prisustvo organskih rastvarača) i imaju, potencijalno, bolji terapijski efekat od drugih hemijskih, biohemijskih i genetičkih pristupa jer direktno reaguju sa biomolekulima i učestvuju u signalnim i regulatornim procesima. Bioaktivni nosač u fiziološkim uslovima pruža nišu za nastanak novog tkiva i otpušta metalne jone koji deluju antimikrobno i učestvuju u biološkim procesima, aktivirajući urođeni regenerativni potencijal, **Slika 1.5.** (Hoppe i sar., 2011).



Slika 1.5. Pregled potencijalnih bioloških odgovora indukovanih metalnim jonima iz biomaterijala (Hoppe i sar., 2011).

Stoga je najjednostavniji način za poboljšanje karakteristika biomaterijala na bazi alginata, korišćenje nekog od esencijalnih metalnih jona, na primer cinka, kao strukturne i funkcionalne komponente u procesu sinteze.

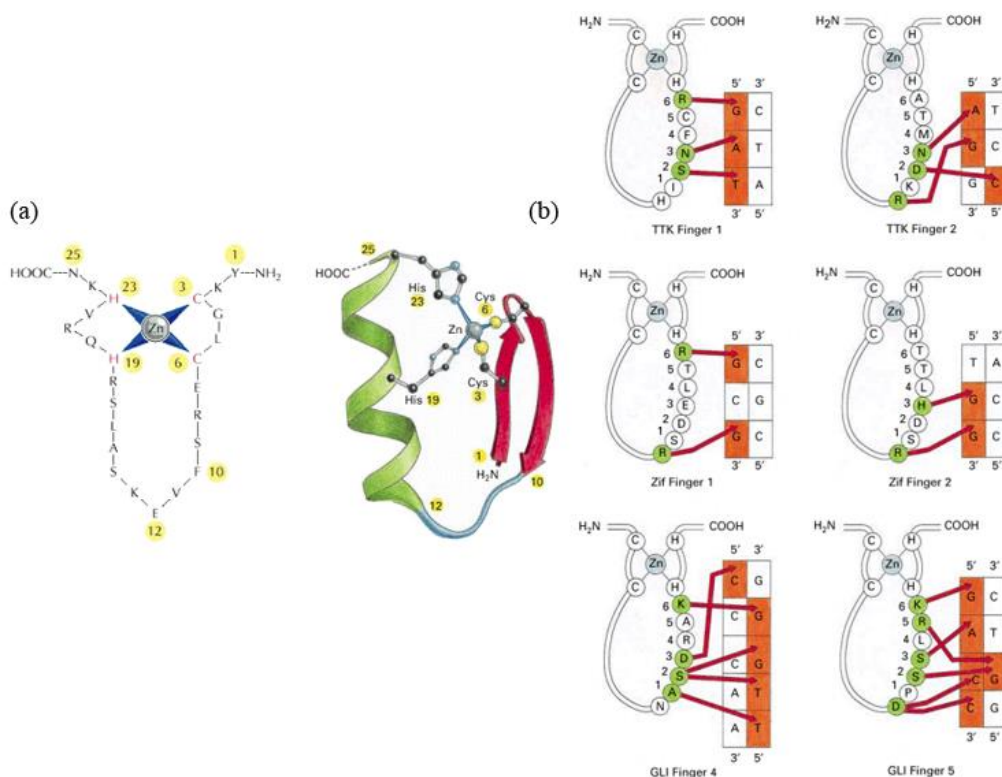
1.3. Cink – biološka uloga

Cink je jedan od najvažnijih mikronutrijenata, i posle gvožđa, najzastupljeniji metal u ljudskom organizmu. Telo odraslog čoveka, prosečne težine od 70 kg, sadrži 2,3 g cinka u najvećoj meri lokalizovanog u kostima i mišićima (85%), zatim jetri i koži (11%) (McCance & Widdowson, 1942). Preporučeni dnevni unos je 15 mg po danu putem hrane bogate cinkom kao što su orašasti proizvodi, semena, morski plodovi i crvena mesa. Generalno, ishrana, koja se zasniva na proteinima životinjskog porekla, zadovoljava dnevne potrebe organizma za cinkom, dok vegetarijska ishrana može uzrokovati deficijenciju usled prisustva velike količine fitata koji, u tankom crevu, prevode cink u nerastvorljiva jedinjenja i onemogućavaju apsorpciju. Višak cinka se iz organizma eliminiše putem žuči i fecesa, dok se vrlo mala količina izlučuje i preko bubrega (Tapiero & Tew, 2003).

Široki spektar fiziološkog dejstva cinka, posledica je njegove specifične hemijske strukture: naime, iako se nalazi u formi jona, usled popunjene d-orbitale, Zn(II) je stabilan u biološkim sistemima, ne učestvuju u oksido-redukcionim procesima i, samim tim, ne može dovesti do pojave slobodnih radikala i oksidativnog stresa. Zatim, u koordinativnim kompleksima može da reaguje sa dva do osam liganada, pri čemu formirane koordinativne geometrije mogu da variraju od standardnih tetraedarskih do piramidalnih ili oktaedarskih. Upravo postojanje više koordinacionih brojeva i različitih geometrija koordinativnih kompleksa, pruža širok spektar mogućnosti interakcije sa ligandima i modifikacije njihove reaktivnosti, odnosno, različita hemijska struktura se može prevesti u različite biološke funkcije (Vallee & Falchuk, 1993). Smatra se da čak 10 % proteoma sisara za svoje adekvatno funkcionisanje zahteva prisustvo cinka u svojstvu strukturne, katalitičke i/ili regulatorne komponente (Andreini i sar., 2006).

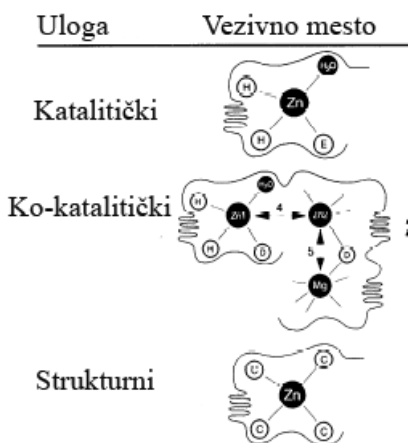
Strukturna uloga. Biološki sistemi se karakterišu jedinstvom strukture i funkcije. Da bi proteini obavljali specifičnu funkciju, neophodno je da zauzmu optimalnu prostornu

konformaciju, što se postiže vezivanjem jona cinka, koji deluju kao stabilizatori tercijerne ili kvarternarne strukture. Ovi proteini obuhvataju brojne enzime, signalne molekule, receptore, membranske proteine i transkripcione faktore. Tako da je cink medijator bitnih životnih procesa kao što su replikacija DNK, transdukcija signala, regulacija ekspresije gena i sinteza specifičnih proteina, kao i održavanje integriteta membranskih sistema. Većina ovih proteina se karakteriše prisustvom tzv. “Zn finger” strukturnog motiva, gde cink, koordinativno vezan sa četiri tiolne grupe iz amino kiselina, formira petlju u polipeptidnom lancu koja obezbeđuju prepoznavanje specifičnih regiona u regulatornim delovima gena ili proteina (**Slika 1.6**). Najpoznatiji predstavnici ove grupe proteina su enzimi uključeni u replikaciju i reparaciju DNK, transkripciju gena, zatim transkripcioni faktori i receptori za steroidne i tiroidne hormone, vitamin D i retinoičnu kiselinu.



Slika 1.6. “Zn finger” strukturni motiv: (a) Šematski prikaz sekvence amino kiselina u “Zn finger” domenu proteina i trodimenzionalna struktura “Zn finger” domena proteina; (b) interakcija “Zn finger” strukturnog motiva sa odgovarajućom regulatornom sekvencom DNK (Alberts i sar., 2002).

Katalitička i kokatalitička funkcija. Do sada je identifikovano oko 200 metaloenzima koji za svoje funkcionisanje zahtevaju prisustvo cinka u katalitičkom centru i mahom posreduju u metabolizmu proteina, lipida i ugljenih hidrata (McCall i sar., 2000). Cink, uključen u katalizu, je lokalizovan u aktivnom centru enzima gde direktno učestvuje u transformaciji supstrata. Organizacija katalitičkog centra je specifična i pored cinka, koji koordinativno reaguje za tri polipeptidna liganda, sadrži i najmanje jedan molekul vode. Prisustvo molekula vode je karakteristično samo za katalitički cink, za razliku od cinka u strukturnim motivima gde je koordinativno vezan samo za četiri polipeptidna lanca. Pored katalitičkog i strukturnog cinka, postoji i ko-katalitički cink koji se vezuje za ko-katalitička vezivna mesta regulatorne subjedinice u neposrednoj blizini aktivnog centra i, putem interakcije sa cinkom iz aktivnog centra, inhibira ili aktivira katalizu (**Slika 1.7**).



Slika 1.7. Šematski prikaz organizacije katalitičkog, ko-katalitičkog i strukturnog mesta vezivanja cinka u enzimima (Vallee & Falchuk, 1993).

Regulatorna funkcija. Uzimajući u obzir da je cink neophodan za strukturu i funkciju mnogih proteina i da se, kao jon stabilan u biološkim uslovima, lako transportuje kroz membrane putem transportera ili jonskih kanala, posredujući u inter- i intra-ćelijskoj komunikaciji, može se zaključiti da cink deluje kao regulatorna komponenta, odnosno, sekundarni glasnik u organizmu. U zavisnosti od zahteva organizma, kao i spoljašnjih i unutrašnjih signala, regulacija posredovana cinkom se ostvaruje kako na nivou DNK (indukcija replikacije DNK, transkripcije gena i translacije odgovarajućih informacionih RNK), tako i na nivou proteina (aktivacija ili inhibicija enzima ili, na primer, održavanje

strukture proteina jonskih kanala). Dodatno, u mozgu, cink ima i neuromodulatornu ulogu (Frederickson i sar., 2000).

Dok na biohemijском nivou deluje kao strukturna, katalitička i regulatorna komponenta, posmatrano u kontekstu celog organizma, cink je neophodan za rast organizma, razviće i funkcionisanje nervnog, imunskog i reproduktivnog sistema, kao i održavanje antioksidativnih sistema (Cummings & Kovacic, 2009). Deficijencija cinka se primarno manifestuje kroz inhibiciju rasta (MacDonald, 2000) i otežano funkcionisanje visokoproliferativnih tkiva kao što su epitel/endotel, imunski i reproduktivni sistem (Favier, 1992; Prasad, 1984). Regulacija proliferacije ćelija ostvaruje se kroz metaloenzime uključene u ove procese (DNK polimeraza) i indirektno, putem hormona kao što je IGF-1 (Insulin like Growth Factor 1) čija produkcija je kontrolisana koncentracijom cinka (MacDonald, 2000).

Cink je uključen u različite aspekte imunskog sistema i nedostatak cinka dovodi do inhibicije fagocitoze posredovane makrofagima, inhibicije hemotaksisa, narušavanja aktivnosti NK ćelija (Allen i sar., 1983; Rink & Gabriel, 2000) i smanjenja broja T limfocita (Fraker & King, 1998; Shi i sar., 1998). Posebno je značajna uloga cinka u zaštiti biomolekula od oksidativnog stresa. Antioksidativno dejstvo se ostvaruje na više nivoa: (1) cink je strukturna komponenta enzima koji su direktno uključeni u uklanjanje kiseoničnih slobodnih radikala (peroksidaza, katalaza, superoksid dismutaza); (2) cink indukuje sintezu metalotioneina koji inaktiviraju slobodne radikale i regulišu nivo teških metala kao što je bakar ili gvožđe, vezivanjem za tiolne grupe; i (3) cink se vezuje za tiolne grupe strukturnih ili regulatornih proteina i na taj način ih štiti od oksidativnog dejstva (Formigari i sar., 2007). U ovu poslednju grupu proteina spadaju jonski kanali membrana, koji su uključeni u transport kalcijuma, tako da se svako narušavanje njihove strukture ogleda u inhibiciji transporta kalcijuma, koja ima za posledicu remećenje osmotskog balansa što može dalje dovesti do narušavanja integriteta membrana i remećenja membranskih funkcija (O'Dell, 2000).

Iako je uključen u mnogobrojne fiziološke procese, sa aspekta biomedicinske primene, najatraktivnije su uloge cinka u zarastanju rana i metabolizmu kostiju.

1.3.1. Uloga cinka u zarastanju rana

Ispitivanjem procesa zarastanja rana, utvrđeno je da u ranama dolazi do promene koncentracije cinka sa vremenom: tokom prvih 24 h, detektuje se porast od 20 % u odnosu na normalne fiziološke vrednosti, zatim, sledi dalji porast do 30 % u fazi granulacije i intenzivne proliferacije epitelnih ćelija, i, u kasnijim fazama zarastanja rana (10-21 dan), postepeni pad i vraćanje na normalne vrednosti usled smanjene deobe ćelija i maturacije ožiljka (Iwata i sar., 1999; Lansdown i sar., 1999; Lansdown i sar., 2007). Lokalno povećanje koncentracije cinka u ranama ima dvojak ulogu i odnosi se na posredovanje cinka u akutnoj fazi zarastanja rana (sistemski odgovor organizma na povredu koji se karakteriše zaustavljanjem krvarenja, uklanjanjem mikroorganizama i zatvaranjem rane) i remodelovanju tkiva i restauraciji normalne morfologije i funkcije kože. Aspekti delovanja cinka su sledeći:

- antimikrobno dejstvo: cinkovi joni poseduju antimikrobno dejstvo koje je detaljno objašnjeno u Poglavlju 1.3.3.;
- aktivacija imunskog sistema i hemotaksis: cink regrutuje i aktivira makrofage, NK ćelije, stimuliše proliferaciju i maturaciju T limfocita i inhibira sintezu proinflamatornih citokina;
- zaustavljanje krvarenja: da bi došlo do agregacije trombocita prilikom formiranja krvnog ugruška, neophodno je da se kalcijum iz spoljne sredine transportuje u unutrašnjost trombocita kako bi, kao sekundarni glasnik, aktivirao protein kinazu koja posreduje u procesu agregacije. Jonski kanali spadaju u grupu proteina za čiju adekvatnu strukturu i funkciju je neophodno prisustvo cinka vezanog za tiolne grupe. U slučaju deficijencije cinka, onemogućeno je upumpavanje kalcijuma ka unutrašnjosti trombocita, što dovodi do produženog vremena krvarenja (Tubek i sar., 2008).
- aktivacija metaloproteinaza matriksa (MMPs): MMPs pripadaju familiji kalcijum i cink zavisnih endopeptidaza koje su odgovorne za remodelovanje i degradaciju komponenti ekstracelularnog matriksa (ECM) uklanjanju oštećenog tkiva, kao i

različitih proteinskih i glikoproteinskih supstrata (citokini, receptori, zaostale MMPs), takođe olakšavaju migraciju keratinocita (Verma & Hansch, 2007). Sintetišu ih fibroblasti, keratinociti, makrofage, limfociti u obliku neaktivnog prekursora, zimogena. Aktivacija se zasniva na transformaciji strukturnog cinka u katalitički. Naime, u zimogenu, postoji samo jedan strukturni jon cinka koji je koordinativno vezan sa četiri peptidna liganda, od kojih je jedan evolutivno konzerviran i ima regulatornu ulogu i maskira aktivni centar. Uklanjanjem regulatornog peptida, cinkov jon postaje slobodan za interakciju sa molekulom vode kao četvrtim ligandom i dolazi do transformacije u katalitički centar (Ravanti & Kahari, 2000; Van Wart & Birkedal-Hansen, 1990). MMPs se dele u tri klase u zavisnosti od supstrata na koje deluju: kolagenaze (MMP-1, 8 i 13); stromelizin (MMP-3 i 10) i želatinaze A (MMP-2) i B (MMP-9). Kolagenaze su odgovorne za uklanjanje propetidne sekvence na prokolagenu, pri čemu ga prevode u nativni molekul kolagena; najveći nivo njihove aktivnosti detektuje se tokom prva 24 h nakon povrede što ukazuje na činjenicu da su odgovorne za pokretanje procesa zarastanja (Abe i sar., 2001; Gillard i sar., 2004; Nwomeh i sar., 1998; Pilcher i sar., 1997). Želatinaze degraduju denaturisane komponente ECM, dok je stromelizin odgovoran za kontrakciju rane (Bullard i sar., 1999; Krampert i sar., 2004).

- aktivacija sinteze biomolekula kao što su kolagen i IGF-1;
- indukcija proliferacije keratinocita, koji su odgovorni za restauraciju epitela i fibroblasta, koji sintetišu komponente ECM;
- citoprotektivno dejstvo putem inhibicije apoptoze (Truong-Tram i sar., 2001) i antioksidativnog dejstva.

Eksperimentalno je potvrđeno da tretman Zn(II) dovodi do intenzivne proliferacije humanih keratinocita u kulturi (Emri i sar., 2015), kao i povećane aktivnosti MMP u *in vitro* modelu nekrotičnog tkiva (Agren, 1993). Takođe, *in vivo* studije na modelu opekotina kod zečeva su pokazale da topikalna aplikacija ZnO na mestu oštećenja kože, ubrzava proces kontrakcije i zarastanja rana u poređenju sa kontrolom, kao i ranama tretiranim preparatom na bazi srebra (Aksoy, 2010; Arslan i sar., 2012). Stoga je regenerativni

potencijal cinka iskorišćen u medicinske svrhe. Razvijen je niz terapijskih sredstava na bazi Zn(II) ili ZnO u formi kreme, obloga, zatim vlakana impregniranih cinkom od kojih se izrađuju čarape namenjene terapiji dijabetetskog stopala (**Tabela I**). Poseban napredak je ostvaren na polju terapije hroničnih rana kao što su dekubiti i venozni ulkusi.

Tabela I. Primeri komercijalno dostupnih preparata na bazi cinka za tretman rana.

Proizvod	Sadržaj Zn	Proizvođač
<i>Zavoji sa pastom sa Zn</i>		
Gelocast TM	ZnO, 10 %	Smith & Nephew, UK
Viscopaste TM	ZnO, 10 %	Smith & Nephew, UK
Zipzoc TM , čarapa	ZnO, 20 %	Smith & Nephew, UK
Varolast TM	ZnO, 15 %	Hartmann, Nemačka
<i>Obloge za rane sa Zn na bazi alginata ili pamuka</i>		
Curasorb TM	0,18 %*	Tyco, SAD
Dermagran TM	0,05 %*	Dermascience, SAD
Trionic TM	0,03 %*	Johnson & Johnson, DE

* Izraženo u odnosu na vlažnu masu obloge

Pored direktne topikalne ili oralne primene cinka, dizajnirani su i biomaterijali koji sadrže cink, a primenjuju se kao funkcionalne obloge u tretmanu rana kao što su kompoziti na bazi alginata/polivinil alkohola i ZnO sintetisani u formi nanovlakana metodom elektrospininga (Shalumon i sar., 2011). Zatim kompozitni gelovi na bazi hitozana/gentamicina i ZnO (Vasile i sar., 2014), vlakna Zn-alginata (Qin, 2008), ili hidrogelovi Zn-alginata dobijeni internim geliranjem (Straccia i sar., 2015).

1.3.2. Uloga cinka u metabolizmu koštanog tkiva

Abnormalan razvoj skeletnog sistema jedna je od glavnih posledica uzrokovanih nedostatkom cinka u organizmu. Izučavanjem ovog procesa kroz mnogobrojne studije na životinjama (Eberle i sar., 1999; Ovesen i sar., 2001) i ljudima (Prasad, 1991; Yamaguchi,

1998), utvrđeno je da je cink esencijalni mikronutrijent za osteogenezu, koji deluje na više različitih aspekata formiranja kosti: (1) stimulacija proliferacije, diferencijacije i maturacije osteoblasta putem regulacije ekspresije gena karakterističnih za koštano tkivo (alkalna fosfataza, kolagen I, osteokalcin i osteopontin) (Hashizume & Yamaguchi, 1993; 1994; Yamaguchi i sar., 1988); (2) stimulacija mineralizacije, tj. deponovanja kalcijuma u centre nukleacije; i (3) inhibicija diferencijacije matičnih ćelija u osteoklaste i resorpcije koštane mase posredovane njima (Hadley i sar., 2010; Kishi & Yamaguchi, 1994). Smatra se da je dejstvo cinka ostvareno putem glavnog regulatora osteogeneze, transkripcionog faktora Runx2, čija aktivnost zavisi od proteina sa “Zn finger” strukturnim motivom, Zfp521 (Bahadoran, 2012). Runx2 indukuje diferencijaciju pluripotentnih mezenhimalnih ćelija ka osteoblastima.

Uzimajući u obzir značajnu ulogu cinka u metabolizmu koštanog tkiva, razvijeni su biomaterijali u formi biostakla (Wang i sar., 2011), keramike (Zreiqat, 2010) ili kompozita (Bhowmick i sar., 2016; Santos i sar., 2008) koji sadrže cink, a primenjuju se u tkivnom inženjstvu kosti. Qiao i saradnici (2014) su ispitivali osteogenetski potencijal titanijumskih implanta sa cinkom. Modifikovani titanijumski implantati su sintetisani deponovanjem prevlaka na površini i inkorporacijom cinka u njih putem metoda posredovanih plazmom. Utvrđeno je da dobijeni implant promoviše diferencijaciju matičnih ćelija u smeru osteoblasta *in vitro*, kao i da dovodi do osteogeneze i integracije u koštane defekte pacova nakon implantacije.

Injektabilni, bioaktivni, osteoinduktivni nosači su pogodni za popunjavanje nepravilnih koštanih defekata tako da je ovaj princip često primenjivan prilikom dizajna biomaterijala za tkivno inženjstvo kosti. Niranjani i saradnici (2013) su dizajnirali “pametni” nosač na bazi hitozana, cinka i β -glicerofosfata, koji je na sobnoj temperaturi bio u tečnom stanju, a nakon injektiranja u koštani defekt, na telesnoj temperaturi, prelazio u gel. Istovremenim prisustvom cinka i β -glicerofosfata, ostvareno je sinergističko dejstvo aktivnih agensa u smeru mineralizacije. Pored termosenzitivnih, postoje i hidrogelovi sa cinkom na bazi alginata (Place i sar., 2011) ili diakrilata (Tommasi i sar., 2016).

Posebnu kategoriju predstavljaju kompozitni, mikroporozni i osteoinduktivni biomaterijali na bazi hidroksiapatita, kod kojih je kalcijum supstituisan cinkom (Gopi i sar.,

2012), i/ili u kombinaciji sa hitozanom (Tripathi i sar., 2012). Oni predstavljaju dobru platformu za razvijanje 3D osteogenetskih model sistema.

1.3.3. Antimikrobno dejstvo cinka

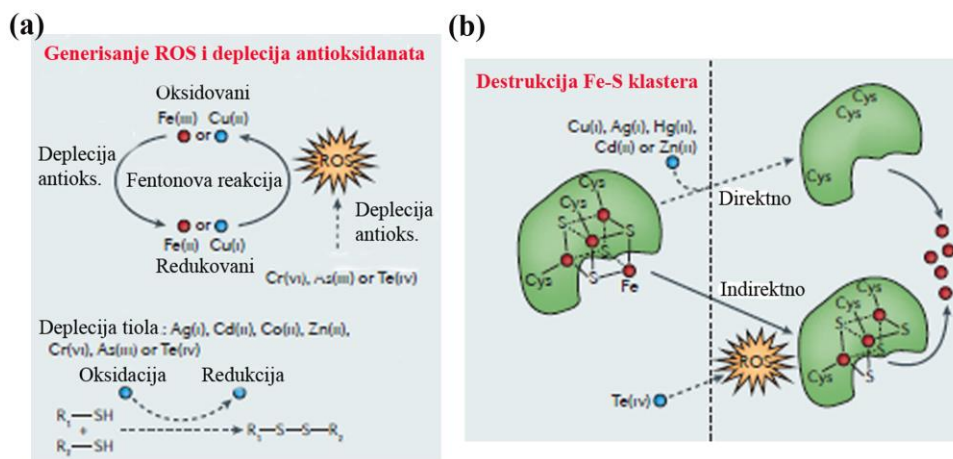
Iako predstavlja esencijalni element za mikroorganizme, u uslovima superfizioloških koncentracija, cinkovi joni deluju kao snažan antimikrobni agens (Lemire i sar., 2013). Mehanizmi antimikrobnog dejstva cinkovih jona su sledeći:

Generisanje reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i deplecija antioksidanata. Iako cink ne spada u redoks aktivne metale i stabilan je u biološkim uslovima, ukoliko je prisutan u višku, može dovesti do indirektnog posredovanja u oksidativnom stresu, odnosno, generisanju slobodnih radikala (Trevisan i sar., 2014). Naime, kod aerobnih organizama, kao sporedni produkt respiracije nastaju vodonik peroksid, H_2O_2 , i superoksidni anjon, $O_2^{\cdot-}$. Nastali vodonik peroksid može dalje da oksiduje redoks aktivne metale, kao što su gvožđe i bakar, u procesu koji je označen kao Fentonova reakcija (1), pri čemu nastaju hidroksilni anjon, OH^- , i izuzetno reaktivni hidroksilni radikal, OH^{\cdot} . Generisani hidroksilni radikal napada biomolekule indukujući nastanak i propagaciju novih radikala i oksidativno oštećenje, dok oksidovani metal reaguje u narednom koraku sasuperoksidnim anjonom, pri čemu se redukuje i regeneriše. Neto reakcija nastanka reaktivnih kiseoničnih vrsta, polazeći od sporednih produkata reaspiracije, u kojoj prelazni redoks aktivni metali deluju kao katalizatori, se naziva Haber-Weiss-ova reakcija (3) (Kehrer, 2000).



Nastali slobodni radikali se neutrališu aktivnošću antioksidativnih sistema u ćeliji, koji ih redukuju, dok se redoks aktivni metali vezuju u helatne komplekse i prevode u neaktivan oblik. Ali, u slučajevima kada u ćeliji postoji velika koncentracija cinka, da bi se održala

homeostaza, on biva heliran od strane metalotioneina ili glutationa, što ima za posledicu smanjenja količine dostupnih antioksidanasa za reakcije neutralizacije novonastalih slobodnih radikala i dalje propagacije ROS, **Slika 1.8a**.



Slika 1.8. Antimikrobni mehanizmi delovanja cinka: (a) generisanje ROS i deplecija antioksidanasa; (b) narušavanje Fe-S klastera u katalitičkom centru enzima (Lemire i sar., 2013).

Narušavanje Fe-S klastera enzima: U uslovima visoke koncentracije, Zn(II) reaguje sa enzimima koji sadrže Fe-S grupu u katalitičkom centru, istiskuju Fe(II) i koordinativno se vezuju za sumpor, narušavajući aktivnost enzima (Xu & Imlay, 2012). Ovi enzimi su, najčešće, evolutivno konzervirani i uključeni u katalizu nekog od esecijalnih metaboličkih puteva, kao što je produkcija energije ili sinteza amino kiselina sa razgranatim bočnim lancem. Sekundarno, otpušteni Fe(II) može ući u Fentonovu reakciju, tako da disrupcija Fe-S katalitičkog centra cinkom može, indirektno, dovesti i do generisanja ROS, **Slika 1.8b**.

Za mikroorganizme su posebno toksične nanočestice ZnO, koje pokazuju čak i jaču biocidnu aktivnost od jona cinka, jer je mehanizam njihovog delovanja posredovan kako otpuštenim jonima cinka (Domenech & Prieto, 1986), tako i generisanjem ROS (Applerot i sar., 2009) i disrupcijom membranskih sistema (Padmavathy & Vijayaraghavan, 2008). Eksperimentalno je potvrđeno da nanočestice manjih dimenzija imaju jače antimikrobno dejstvo usled većeg odnosa zapremina/površina (Raghupathi i sar., 2011; Siddique i sar., 2013). Smatra se da nanočestice deluju po principu Trojanskog konja. Reagujući sa

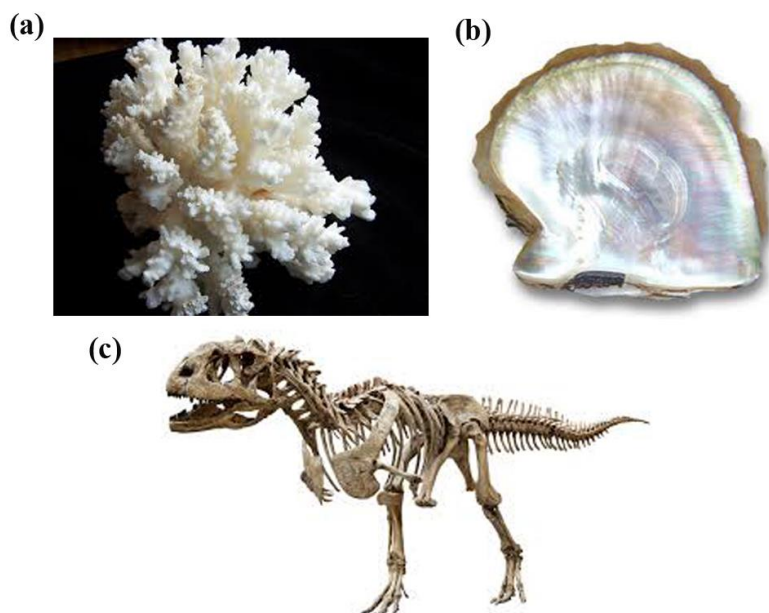
komponentama ćelijskog zida dovode do povećane permeabilnosti membrana, što ima za posledicu ulazak i akumulaciju ZnO u periplazmatičnom prostoru koje zatim indukuju narušavanje ćelijskih i membranskih struktura i/ili funkcija (Brayner i sar., 2006).

Zahvaljujući antimikrobnom dejstvu, sve rasprostranjenijoj rezistentnosti bakterija na standarne antibiotike, mogućnosti kombinovanja sa drugim antimikrobnim agensima u svrhu sinergističkog efekta, kao i selektivnom dejstvu samo na mikroorganizme (usled različitih transportnih sistema kod eukariota, kao i lokalizovanja metala u materijalima), cink i jedinjenja cinka predstavljaju atraktivne komponente biomaterijala sa antimikrobnim svojstvima. Pored komercijalno dostupnih preparata na bazi cinka ili ZnO (**Tabela I**), ilustrativan primer primene cinka kao komponente sa dvostrukom ulogom, predstavljaju i biomaterijali namenjeni tretmanu rana, sa istovremenim i antimikrobnim i regenerativnim dejstvom. Ovi materijali su najčešće u formi vlakana koja obebeđuju veliku aktivnu površinu za kontakt, kao i otpuštanje aktivnih agensa (Shalomun i sar., 2004).

1.4. Biomineralizacija kao strategija u dizajnu biomaterijala

U idealnom slučaju, biomaterijal bi trebalo da bude: biokompatibilan, biodegradabilan, bioaktivan, antimikroban, da se proizvodi na jednostavan i ekonomičan način i da se lako manipuliše njime. Takođe, uzimajući u obzir da je primarna uloga biomaterijala da popravi, poboljša ili nadomesti određene strukture i funkcije organizma (Williams, 2009), prilikom dizajna biomaterijala najbolje je primeniti biomimetički pristup, odnosno, napraviti biomaterijal, koji u strukturnom pogledu najviše nalikuje na nativna tkiva, jer u živim sistemima postoji jedinstvo strukture i funkcije (Lee & Mooney, 2012). Na ovaj način se povećavaju šanse za aktivnu interakciju između biomaterijala i organizma, kao i mogućnost indukcije specifičnog biološkog odgovora. Jedan od primera prirodom inspirisanog principa dizajna je biomineralizacija. Pod biomineralizacijom podrazumevamo sintezu minerala (biominerala) u živim sistemima u svrhu dobijanja kompozitnih struktura poboljšanih mehaničkih karakteristika koje, najčešće, imaju potpurnu ili zaštitnu ulogu. Najrasprostranjeniji biominerali u biološkim sistemima su kalcijum-karbonat i kalcijum-fosfat. Kalcijum-karbonat je karakterističan za vodene beskičmenjake (**Slika 1.9a** i **1.9b**) i

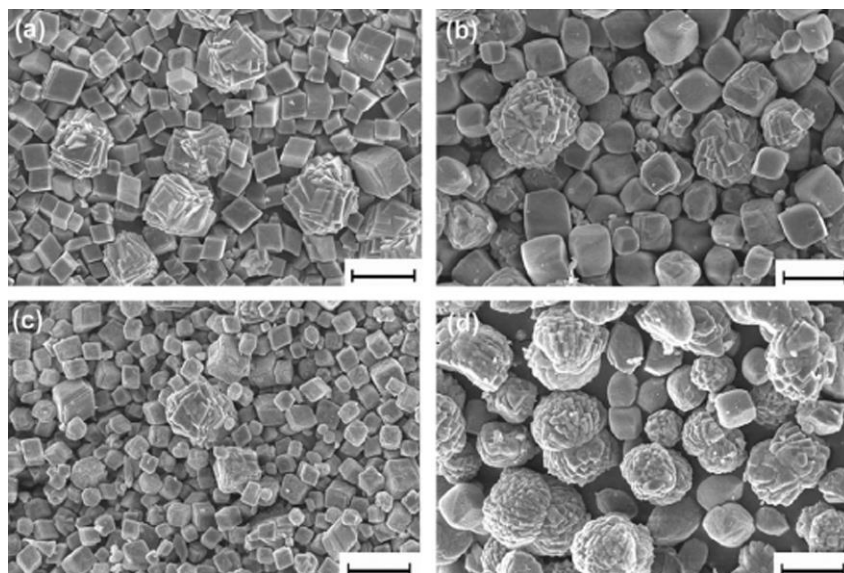
javlja se u tri polimorfizma: kalcit, aragonit i vaterit, a postoje i amorfni oblici, dok je kalcijum fosfat prisutan u skeletu kičmenjaka (**Slika 1.9c**) i karakteriše se većom kompleksnošću i brojem polimorfizama: brušit, oktakalcijum-fosfat, β -trikalcijum-fosfat i hidroksiapatit (HA) (Ashby i sar., 1995; Xie i sar., 2010).



Slika 1.9. Primeri biomineralizacije u biološkim sistemima: (a) skelet koralala; (b) školjka i sedef mekušaca; (c) skelet kičmenjaka.

Sinteza i deponovanje biominerala se vrši u organskom matriksu nalik hidrogelu, izgrađenom od fibrilarnih proteina, glikoproteina i proteoglikana, koji aktivno kontrolišu produkciju i strukturnu organizaciju biominerala u zavisnosti od specifičnih zahteva organizma (Mann, 2001). Razlika između matriksom-posredovane biomineralizacije i mineralizacije u rastvoru je, primarno, u sredini u kojoj se odvija nastanak mineralnih kristala. Naime, pošto hidrogel/matriks predstavlja trodimenzionalnu, hidratisanu mrežu biomolekula, formiranje kristala je ograničeno na veliki broj mikrokompartmenata rastvora unutar te mreže, što implicira, da je glavni transportni mehanizam mineralnih prekursora difuzija, i da ne može doći do njihove sedimentacije. Takođe i sama polimerna mreža aktivno učestvuje u procesu biomineralizacije. Ovaj uticaj se ostvaruje putem stepena poroznosti hidrogela ili prisustva funkcionalnih grupa na polimernim lancima. Ispitivanjem procesa biomineralizacije kalcijum karbonata u alginatnom hidrogelu, Ma & Feng (2011)

su utvrdili da dimenzije i morfologija inkorporiranih kristala zavise od M/G odnosa alginata i koncentracije mineralnih prekursora. Sa porastom udela guluronskih jedinica u alginatu, dolazi do boljeg umrežavanja hidrogela, odnosno, smanjenja poroznosti i nastaju minerali manjih dimenzija usled difuzionih limitacija, dok povećanje koncentracije dostupnih mineralnih prekursora dovodi do generalnog povećanja dimenzija minerala i izmene morfologije kristalnih agregata, nezavisno od tipa alginata **Slika 1.10**.



Slika 1.10. SEM mikrografije kalcijum karbonata dobijenih variranjem koncentracije mineralnih prekursora (0,02 i 0,1 M) u alginatnim hidrogelovima sa različitim udelom G-jedinica (“Low G”, LG i “High G”, HG): (a) LG002; (b) LG01; (c) HG002 i (d) HG01. Razmera 10 μm (Ma & Feng, 2011).

Pored poroznosti i prisustvo različitih funkcionalnih grupa na polimernom lancu, kao i aditiva, može aktivno uticati na biomineralizaciju. Ove grupe mogu inhibirati ili aktivirati mineralizaciju u zavisnosti od toga kako lokalno menjaju koncentraciju mineralnih prekursora i/ili deluju kao centri nukleacije kristala (Asenath-Smith i sar., 2012). Činjenica da polimer aktivno učestvuje u selekciji polimorfizma, morfologije i dimenzija minerala, iskorišćena je kao platforma za razvoj sistema za sintezu kristala specifičnih karakteristika (Hensch, 1988).

Pored toga što aktivno učestvuje u biomineralizaciji, polimerni matriks/hidrogel deluje i kao nosač na kome rastu i precipitiraju se novonastali biominerali. Na ovaj način,

kombinovanjem neorganske i organske komponente, kroz brojne interakcije na granici faza, nastaje nanokompozitni biomaterijal čije rezultujuće karakteristike su različite i bolje od karakteristika pojedinačnih konstituenata (Zafar i sar., 2016). Stoga, hidrogelom posredovana biomineralizacija, kao prirodno inspirisan princip dizajna, predstavlja optimalnu strategiju za produkciju i razvoj novih, nanokompozitnih biomaterijala (Alves i sar., 2010; Farbod i sar., 2014). Mineralizovani biomaterijali se izučavaju kao model sistemi biomineralizacije (Busch i sar., 2001; Falini i sar., 1997; Iwatsubo i sar., 2006), a pokazali su se i pogodnim kao matrice za kontrolisano otpuštanje lekova ili nosači u tkivnom inženjstvu kosti.

Ispitivanjem mogućnosti primene mineralizovanih čestica ili membrana na bazi alginata i poli(N-izopropilakrilamida) (Shi i sar., 2008), alginata i poli(uretan amina) (Yang i sar., 2015) odnosno, hitozana i palmitinske kiseline (Shi i sar., 2012), kao pametnih materijala za dopremanje lekova, utvrđeno je da prisustvo mineralne faze značajno utiče na stabilnost nosača, smanjuje stepen bubrenja i sprečava naglo otpuštanje leka.

Posebno atraktivnu oblast primene biomineralizovanih nanokompozitnih biomaterijala predstavljaju regenerativna medicina i tkivno inženjstvo biomineralizovanih tkiva kao što su kosti i zubi (Shakir i sar., 2016). Imitiranje strukture nativnih tkiva, usled prisustva HA i polimera koji su strukturno slični komponentama ECM kosti, omogućava razvoj tkivnih ekvivalenata *in vitro*, koji, ukoliko se implantiraju u organizam, obezbeđuju osteointegraciju i održavanje osteogenetskog fenotipa. Mata i saradnici (2010) su dizajnirali bioaktivni hidrogel sa sposobnošću indukovanja osteogeneze *in vivo*. Hidrogel se sastojao od polipeptida sa fosforilanim serinskim ostacima. Očekivalo se da prisustvo fosfatnih grupa pozitivno utiče na biomineralizaciju kroz stimulaciju nukleacije HA nakon implantacije u koštanu leziju pacova, što je eksperimentalno i potvrđeno.

Nasuprot biomineralizaciji u preformiranom hidrogelu, gde jedan ili oba mineralna prekursora difunduju u hidrogel, a zatim dolazi do reakcije između njih i deponovanja minerala unutar polimernog matriksa, nanokompozitne biomaterijale je moguće sintetisati i istovremenim formiranjem hidrogela i mineralne faze. Ovaj metod su primenili Xie i saradnici (2010) prilikom dizajna nanokompozita na bazi kalcijum alginata i HA. Prilikom ukapavanja rastvora alginata sa fosfatnim prekursorima u rastvor kalcijuma, dolazi do

paralelnih procesa geliranja i mineralizacije. Ista grupa je razvila i modifikovanu, poboljšanu verziju ovog nosača za tkivno inženjstvo kosti. Naime, imobilizacijom enzima alkalne fosfataze u alginatni hidrogel, omogućena je homogenija distribucija HA unutar hidrogela usled aktivnosti enzima koji je katalizovao proces biomineralizacije uz prisustvo odgovarajućeg supstrata. Tako je izbegnut efekat difuzionih limitacija mineralnih prekursora i dobijeni nanokompozit je imao bolje mehaničke karakteristike u odnosu na biomaterijal dobijen standardnom metodom difuzije kalcijuma iz rastvora za geliranje (Xie i sar., 2012).

1.5. Elektrostatička ekstruzija

Pored funkcionalnosti, bitan je i oblik u kom se biomaterijal sintetiše. Biomaterijal za tretman rana treba da obezbedi laku manipulaciju i aplikaciju, zatim da se što bolje prilagodi formi okolnog tkiva i bude fleksibilan u dovoljnoj meri da ne iritira oštećeno tkivo i omogućava pokrete ukoliko je rana lokalizovana na pokretnim delovima tela (npr. zglobovi). Za tretman dubokih rana, nepravilnog oblika, potencijalno bi bili najpogodniji biomaterijali u obliku mikročestica ili mikrovlakana jer se ponašaju kao punioci prostora, a ujedno i obezbeđuju veliku aktivnu površinu preko koje se oslobađa aktivni agens u okolno tkivo. Pogodan način za produkciju uniformne populacije, sfernih mikročestica malih dimenzija je elektrostatička ekstruzija. U pitanju je jednostavna metoda gde se variranjem operativnih uslova mogu lako kontrolisati karakteristike sintetisanih mikročestica. Sam proces se zasniva na primeni elektrostatičkog polja kako bi se savladao površinski napon polimernog rastvora i dobile čestice malih dimenzija. Naime, između vrha igle kroz koju izlazi polimerni rastvor i površine rastvora za geliranje se uspostavlja električno polje, u kome, pod dejstvom sila elektrostatičkog polja dolazi do otkidanja mlaza rastvora polimera na sitne kapljice, koje zatim pod dejstvom gravitacionog polja padaju u rastvor za geliranje (Poncelet i sar., 1999).

Veličina mikročestica uslovljena je karakteristikama polimernog rastvora (viskoznost), prečnikom igle, protokom polimernog rastvora, rastojanjem između elektroda i primenjenog napona (Bugarski i sar., 1994). Viskozniji rastvori, veći prečnici igle i

rastojanje među elektrodama, sporiji protoci i niže vrednosti primenjenog napona, generalno, dovode do povećanja dimenzija čestica i obrnuto.

Elektrostatička ekstruzija ima široku primenu jer predstavlja jednostavnu metodu za imobilizaciju aktivnih komponenti (arome, ekstrakti biljaka, itd.), enzima ili ćelija u odgovarajuće nosače, pri blagim uslovima (Kostić i sar., 2012; Lević i sar., 2014; Lević, 2014).

1.6. Aktivna ambalaža za pakovanje prehrambenih proizvoda

Zadatak ambalaže je da očuva svojstva proizvoda, ali i da omogući potrošaču da se informiše o samom proizvodu (Silvestre i sar., 2011). Kakav tip ambalaže će se primeniti, zavisi od svojstava proizvoda i tehnološkog tretmana prilikom proizvodnje date namirnice. Osnovni materijali koji se koriste za proizvodnju ambalaže su: staklo, metal, keramika i plastika, pri čemu se savremena ambalaža uglavnom bazira na primeni plastičnih, odnosno, polimernih materijala, kao što su polietilen (PE), polivinil hlorid (PVC), polipropilen (PP) i polistiren (PS). Široka zastupljenost polimernih materijala uslovljena je mogućnošću dobijanja ambalaže različitih oblika, transparentnosti i boje, koja je hemijski inertna, lagana i jeftina (Coles i sar., 2003).

Međutim, primena plastične ambalaže sa sobom nosi i niz problema koji se tiču bezbednosti po ljudsko zdravlje i životnu sredinu. Naime, polimerni materijali se dobijaju iz neobnovljivih izvora i nisu biodegradabilni. Takođe, tokom proizvodnje, u ambalaži često zaostaju monomeri ili druge komponente koje imaju sposobnost migracije u namirnice (Leontijević, 2016). Stoga se pojavila potreba za kreiranjem novih biodegradabilnih sistema pakovanja koji su bazirani na obnovljivim izvorima i tehnologijama.

Atraktivnu alternativu konvencionalnim polimernim materijalima predstavljaju biopolimeri koji se dobijaju iz sekundarnih proizvoda poljoprivredne i prehrambene industrije kao i obnovljivih sirovina biljnog i životinjskog porekla (Marsh & Bugusu, 2007; Siracusa i sar., 2008). Zahvaljujući tome što su biodegradabilni, biokompatibilni i dostupni,

razvoj pakovanja na bazi biomaterijala sa sobom nosi niz ekoloških i ekonomskih prednosti. Među biopolimerima koji se koriste u tehnologiji izrade ambalaže, polisaharidi predstavljaju posebno interesantnu kategoriju, zahvaljujući tome što su široko rasprostranjeni (spadaju u najzastupljenije biomolekule na planeti Zemlji), imaju dobar kapacitet za formiranje filmova, a pri tome su i jestivi (Zafar i sar., 2016). Pakovanja na bazi polisaharida su, najčešće, u vidu jestivih filmova, na primer, na površini voća i imaju funkciju očuvanja antioksidativnih svojstava proizvoda (Oms-Oliu i sar., 2008) ili sprečavanja tamnjenja (Rojas-Grau i sar., 2007). Neki od polisaharida koji se koriste u prehrambenoj industriji su alginat, agar, pektin, derivati celuloze i karagenan.

U cilju poboljšanja svojstava ambalaže, kvaliteta i roka trajanja namirnica, materijali se obično kombinuju ili modifikuju kako bi se dobila aktivna i inteligentna pakovanja. Pod aktivnim pakovanjem podrazumevamo ambalažni materijal u koji je dodata neka aktivna komponenta kako bi se povećala trajnost i očuvao kvalitet namirnice, dok inteligentno pakovanje ima svojstvo indikatora, odnosno, sposobnost da reaguje na određene promene u sredini ili proizvodu (Lee i sar., 2015). U zavisnosti od specifične namene određenog pakovanja, proizvodnja aktivne ambalaže se zasniva na dodatku neke aktivne komponente koja će mu obezbediti željena svojstva, kao na primer, antimikrobnu aktivnost. Kako je tema ove teze dizajn biomaterijala sa antimikrobnim svojstvima, posebna pažnja je posvećena antimikrobnim komponentama koje se mogu koristiti kod pakovanja namirnica, kao i aktivnim pakovanjima sa antimikrobnim svojstvima.

Neki od primera aktivnih pakovanja su dati u **Tabeli II.**

Tabela II. Primeri jestivih filmova i aktivnih pakovanja sa antimikrobnim efektom.

Sistem	Aktivna komponenta	Komentar	Literatura
Polilaktid filmovi	ZnO	Dobra antimikrobna svojstva prema <i>E. coli</i>	Marra i sar., 2012
Hitozanski filmovi	Ag nanočestice	Efikasan u suzbijanju plesni <i>Botrytis cinerea</i>	Moussa i sar., 2013
Hitozan i želatin filmovi	/	Dobra antimirkobna svojstva prema <i>Listeria monocytogenes innocua</i> i <i>E. coli</i>	Pereda i sar., 2011
Pektinski filmovi	Etarska ulja	Dobra antimikrobna svojstva prema različitim bakterijama	Aldana i sar., 2015
Jestivi filmovi na bazi proteina soje	Etarska ulja	Antimikrobna aktivnost tokom čuvanja mesa	Emiroglu i sar., 2010
Filmovi na bazi agara, karaginana, karboksimetil celuloze	ZnO	Efikasan u eliminaciji <i>E. coli</i> i <i>L. monocytogenes</i>	Kanmani & Rhim, 2014a
Agarni filmovi	Ag-Cu nanočestice	Efikasan u eliminaciji <i>Salmonella enterica sv. typhimurium</i> i <i>L. monocytogenes</i>	Ali Arfat i sar., 2017

Antimikrobna aktivnost ambalažnih materijala se može postići na dva načina: primenom materijala koji već poseduje antimikrobna svojstva ili dodatkom jedne ili više antimikrobnih komponenti u strukturu materijala za pakovanje.

Jedan od najviše proučavanih materijala za pakovanje hrane, sa inherentnim antimikrobnim svojstvima, je hitozan. Hitozan ima mnoga poželjna svojstva kako sa aspekta medicinske primene, tako i sa aspekta primene u prehrambenoj industriji (Dutta i sar., 2009). Hitozan se može koristiti sam (Ansorena i sar., 2011; Pereda i sar., 2011) ili u kombinaciji sa drugim antimikrobnim komponentama kako bi se pojačala efikasnost datog aktivnog pakovanja (Moussa i sar., 2013). Pored antimikrobnog, ima i dobra barijerna

svojstva, tako da povrće zaštićeno hitozanom nakon određenog perioda čuvanja zadržava masu, odnosno, pokazuje manji gubitak vode (Ansorena i sar., 2011).

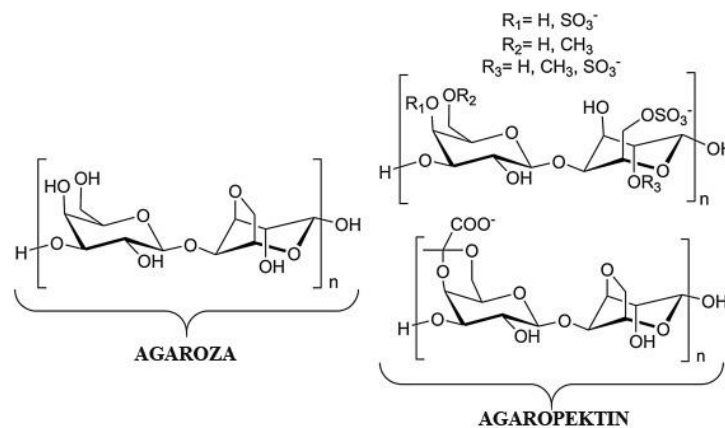
Kao što je već rečeno, antimikrobna aktivnost pakovanja se može postići i dodatkom komponente sa antimikrobnim dejstvom koja može biti organskog ili neorganskog porekla. U organske komponente sa antimikrobnim efektom spadaju na primer, etarska ulja. Mnoge grupe su razvile filmove na bazi pektina (Aldana i sar., 2015) ili proteina soje (Emiroglu i sar., 2010) sa inkorporiranim etarskim uljima koji su se pokazali kao dobri antimikrobni sistemi protiv različitih vrsta bakterija.

Od neorganskih antimikrobnih komponenti, kao dodaci ambalaži se mogu koristiti minerali i metalne nanočestice. Posebno mesto u ovoj kategoriji zauzima ZnO jer, pored toga što ima izraženo antimikrobno dejstvo, spada i u supstance koje su bezbedne za ljudsku upotrebu (FDA, 2017). U svom revijalnom radu, Perez Espitia i saradnici (2012) su temeljno prikazali dosadašnja iskustva sa sintezom nanočestica ZnO, uz detaljan opis mehanizma antimikrobnog dejstva kao i primere inkorporacije ZnO u biopolimerne filmove. Takođe, puno je ispitivano i antimikrobno dejstvo nanočestica srebra kao i mogućnosti njihovog dodavanja u aktivna pakovanja. Moussa i saradnici (2013). su pokazali da nanočestice Ag u kombinaciji sa hitozanskim filmovima formiranim na površini jagoda mogu u velikoj meri da spreče propadanje ovog voća izazvano dejstvom plesni *B. cinerea*. Sa druge strane, primena nanotehnologije sa sobom nosi niz potencijalnih problema jer još uvek nema relevantnih podataka o tome kako nanočestice migriraju u hranu niti kako nanomaterijali utiču na ljudsko zdravlje. Takođe, nedostaju i odgovarajući protokoli kao i zakonske regulative koji se tiču evaluacije bezbednosti nanomaterijala kao i procene eventualnog rizika.

Pored antimikrobne uloge, aktivni filmovi na bazi biopolimera mogu imati i zaštitna, barijerna svojstva. Na primer, filmovi na bazi karboksimetil celuloze (Ansorena i sar., 2011), kazeina (Matsakidou i sar., 2013) ili fibroina svile (Marelli i sar., 2016) sprečavaju isušivanje proizvoda tokom skladištenja. Dok se kalcijum alginatni filmovi, usled izraženih hidrofilnih svojstava, mogu koristiti kao zaštita od nakupljanja ulja (Xu i sar., 2016).

1.6.1. Agar-agar

Terminom agar-agar se označavaju članovi jedne klase galaktana, polisaharida koji se javljaju kao intracelularni materijal matriksa u mnogobrojnim vrstama crvenih algi (morske algereda *Rhodophita*, rodova *Gelidium* i *Gracilaria*). Imaju funkciju u strukturi algi, koja je analogna celulozi kopnenih biljaka. Agar-agar se sastoji od dve subjedinice: agaroze i agaropektina. Agarozna je neutralni, linearni molekul sastavljen od alterirajućih D-galaktoznih i 3,6-anhidro-L-galaktoznih jedinica povezanih β -(1,3) i α -(1,4) glikozidnim vezama (**Slika 1.11**) i posreduje u geliranju agarnih hidrogelova, dok je agaropektin naelektrisana, sulfatizovana, razgranata subjedinica (**Slika 1.11**), koja ne učestvuje u geliranju i tokom prerade polaznih sirovina, najčešće, biva potpuno uklonjena (Bertasa i sar., 2017; Raphael i sar., 2010).



Slika 1.11. Struktura subjedinica agara: agarozna i agaropektin (Bertasa i sar., 2017).

Primat u proizvodnji agar-agara drže Kina i Indonezija. Agar se iz prirodnih sirovina izdvaja toplom ekstrakcijom sa vodom, uz određene modifikacije, koje podrazumevaju primenu povišenog pritiska ili tretman kiselinama ili bazama, u zavisnosti od izvora. Proces počinje izvlačenjem biomase iz mora, koja se zatim ispira kako bi se uklonili pesak, nečistoće i morska so, nakon toga sledi kuvanje dok se ne dobije tečnost koja nakon hlađenja prelazi u gel sa oko 1 % agara. Nakon pranja, presovanja i sušenja dobijenog gela, mlevenjem suvog ostatka se dobija prah.

Agar se tradicionalno koristi u kuhinjama Dalekog Istoka kao niskoenergetsko sredstvo za geliranje bez neželjenih efekata po ljudsko zdravlje. Smatra se da čak 90% svetske proizvodnje agara odlazi na prehrambenu aplikaciju.

Što se ostalih primena agar-agara tiče, ovaj polisaharid ima značajnu ulogu u mikrobiologiji (kao komponenta podloga za gajenje mikroorganizama), biotehnologiji i farmaciji. Posebnim prečišćavanjem se dobija agarozna velike čistoće, pogodna kao nosač za gajenje ćelija u tkivnom inženjstvu (Verma i sar., 2007), neutralni matriks za izučavanje procesa biomineralizacije (Asenath-Smith i sar., 2012) ili gel za elektroforezu. Agar-agar može poslužiti i kao matrica za kontrolisano otpuštanje lekova (Saxena i sar., 2011) ili dobijanje hromatografskih medijuma za prečišćavanje biološki aktivnih komponenti (Asgari i sar., 2014).

Uzimajući u obzir da je agar-agar dostupan, biodegradabilan, biokompatibilan i jestiv, posebno zanimljivu oblast njegove primene predstavlja izrada jestive ambalaže u formi filmova ili zaštitnih omotača (Atef i sar., 2014; Wang & Rhim, 2015).

1.6.2. Aktivni filmovi na bazi alginata i agara

Od mnogobrojnih polisaharida koji se mogu koristiti kao prirodni ambalažni materijali, u ovom radu je stavljen akcenat na polisaharide izolovane iz morskih algi: alginat i agar. Oba materijala su bezbedna za upotrebu i široko zastupljena u prehrambenim proizvodima. Više o hemijskoj strukturi i svojstvima alginata, dato je u Poglavlju 1.1.

Alginat ili agar se, najčešće, kombinuju sa drugim materijalima/komponentama kako bi se dobili filmovi željenih karakteristika. Ove modifikacije su uslovljene specifičnom prirodom polisaharida. Naime, usled velikog broja hidroksilnih grupa na molekulima polisaharida, glavnu ulogu prilikom formiranja filmova imaju vodonične veze, tako da nastali filmovi nemaju zadovoljavajuće mehaničke karakteristike i propustljivi su za vodenu paru (Leontijević, 2016; Zafar i sar., 2016). Takođe, pošto su u pitanju biopolimeri izolovani iz prirodnih izvora, njihov kvalitet u velikoj meri može da varira, što posledično utiče i na mehaničku stabilnost. Dodatno, ni alginat ni agar ne poseduju funkcionalnost u

vidu antimikrobnih svojstva, tako da je njihova primena kao samostalnih omotača ograničena samo na ulogu barijere za gasove.

Neki od primera jestivih i aktivnih pakovanja na bazi alginata i agara su dati u **Tabeli III.**

Tabela III. Primeri jestivih i aktivnih pakovanja na bazi alginata i agara.

Sistem	Aktivna komponenta	Komentar	Literatura
Alginat/gelan	N-acetilcistein i glutation	Sprečavanje tamnjenja voća	Rojas-Grau i sar., 2007
Alginat/pektin/gelan	/	Omotač oko isečenog voća, očuvanje antioksidanasa	Oms-Oliu i sar., 2008
Agar/alginat/kolagen	Ekstrakt semenki grožđa Ag nanočestice	Antimikrobno dejstvo <i>L. monocytogenes</i> i <i>E. coli</i>	Wang & Rhim, 2015
Alginat	Vitamin C polifenoli čaja	Tretman ribljeg mesa	Song i sar., 2011
Agar/banana u prahu	Ag nanočestice	Antimikrobno dejstvo <i>L. monocytogenes</i> i <i>E. coli</i>	Orsuwan i sar., 2016
Agar/želatin/nano-glina	esencijelno ulje, timol	Antimikrobno dejstvo <i>L. monocytogenes</i> i <i>E. coli</i>	Jang i sar., 2010
Agar	ZnO nanočestice	Antimikrobno dejstvo <i>L. monocytogenes</i> i <i>E. coli</i>	Kanmani & Rhim, 2014a
Agar	Ekstrakt semena grejpruta	Antimikrobno dejstvo <i>B. cereus</i> i <i>E. coli</i>	Kanmani & Rhim, 2014b

Uzimajući u obzir da jedan materijal, najčešće, ne može da zadovolji sve zahteve koji se pred njega postavljaju sa aspekta očuvanja svojstava upakovanog proizvoda, razvijene su različite metode koje za cilj imaju poboljšanje karakteristika ambalaže. Najrasprostranjeniji način za unapređenje filmova na bazi polisaharida je dodavanje drugih komponenti

osnovnom polisaharidnom materijalu, odnosno, sinteza nanokompozitnog materijala (Rhim & Ng, 2007; Zafar i sar., 2016).

Mehanička stabilnost i fleksibilnost materijala predstavljaju važne parametre koji utiču na procesovanje pakovanja i manipulaciju proizvodom. Da bi se povećala fleksibilnost materijala, u smeše se često dodaju plastifikatori (glicerol). Tokom brojnih istraživanja utvrđeno je da i relativno mali dodatak nano-gline (Jang i sar., 2010), nanoceluloze (Reddy & Rhim, 2014; Shankar & Rhim, 2015), ili metalnih nanočestica (Ali Arfat i sar., 2017; Kanmani & Rhim, 2014a) u strukturu agara, poboljšava mehanička i barijerna svojstva dobijenih nanokompozita. Do poboljšanja jedino dolazi ukoliko je nanofaza uniformno dispergovana i sa biopolimerom gradi uniforman nanokompozit superiornih svojstava u odnosu na polazne konstituentne. Međutim, u situacijama kada se plastifikator ili nanofiler dodaju u većoj koncentraciji, može doći do razdvajanja faza, strukturne destabilizacije i narušavanja karakteristika dobijenih kompozita. Zato je neophodno dobro definisati kriterijume kvaliteta koje nanokompozitni filmovi treba da ispune pre odabira komponenti koje će ući u sastav filma.

Da bi se dobili aktivni filmovi, uobičajeno je, da se rastvor polisaharida pre formiranja filma, meša sa antimikrobnom komponentnom. Jedan od takvih primera je primena etarskih ulja poznatih antimikrobnih svojstava koja se dodaju alginatu u obliku nanoemulzija. Ovakav sistem ima dvostruku vrednost: film dobija antimikrobna svojstva, a imobilisano etarsko ulje biva zaštićeno od degradacije i lakše se njime rukuje (Acevedo-Fani i sar., 2015). Pored etarskih ulja i inkorporacija metalnih nanočestica obezbeđuje antimikrobna svojstva (Ali Arfat i sar., 2017; Kanmani & Rhim, 2014a; Orsuwan i sar., 2016; Wang & Rhim, 2015).

Najjednostavniji način za produkciju nanokompozita je da se nanofiler/aktivna komponenta doda u strukturu polisaharida pre formiranja filma. Međutim, u pojedinim slučajevima, ona se može inkorporirati u matrix polisaharida *in situ* sintezom. Ovaj pristup se pokazao uspešnim prilikom sinteze agar/HA i agar/želatin/HA nanokompozita za biomedicinske aplikacije, gde je mineralna faza - HA formirana u agarom matriksu biominerizacijom putem imerzione tehnike (Hu i sar., 2016), odnosno, elektroforetske depozicije (Deng i sar., 2013). Slična strategija se može primeniti i prilikom sinteze

nanokompozitnih filmova na bazi agara, odnosno, alginata koji su impregnirani mineralima. Dodatno, ukoliko deponovana mineralna faza predstavlja so metala sa izraženim antimikrobnim svojstvom kao što je cink, nastali nanokompozit bi bio poboljšan i u strukturnom i funkcionalnom smislu.

Treba istaći da pored formiranja filmova klasičnim izlivanjem u odgovarajuće kalupe ili nanošenjem oko samog proizvoda, u novije vreme se intenzivno radi i na dobijanju filmova metodom elektrospininga.

Elektrospining predstavlja tehniku dobijanja nanovlakana uz pomoć razlike potencijala između kapilare kroz koju teče rastvor materijla i suprotno naelektrisane površine na koju se hvataju vlakna. U toku procesa elektrospininga, dolazi do istovremenog formiranja vlakana i uklanjanja rastvarača. Kao rezultat se dobijaju suvi filmovi koji su sastavljeni od isprepletanih nanovlakana. Ovakvi filmovi se između ostalog mogu koristiti i kao nosači prehrambenih aditiva (Lević i sar., 2014).

Međutim, alginat iz svojih rastvora je gotovo nemoguće prevesti u oblik nanovlakana bez predhodnog dodatka nekog polimera koji treba da potpomogne proces formiranja vlakana. Jedan od najčešće korišćenih dodataka alginatu pri elektrospiningu je polietilen oksid (Lu isar., 2006).

Agar se takode može koristiti za dobijanje filmova procesom elektrospininga. Da bi se dobila vlakna, agar se može mešati sa poliakrilonitrilom, dok se kao rastvarač može koristiti dimetilformamid. Ovako dobijeni filmovi se mogu koristiti kao nosači lekova, pri čemu se dobijaju sistemi koji mogu dugo da obezbeđuju antimikrobnu aktivnost i kontrolisano otpuštanje leka (Yang et al., 2014).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja ove disertacije je dizajn i karakterizacija novih nanokompozitnih biomaterijala modulatornih karakteristika, na bazi alginata i agar-agara i esencijelnog jona metala cinka sa potencijalnom primenom u biomedicini i u pakovanju hrane.

U ovom doktoratu su ispitana dva načina sinteze novih, alginatnih hidrogelova poboljšanih karakteristika sa cinkom. Prvi, jednostavniji metod, podrazumeva geliranje alginata sa esencijelnim metalnim jonima (cinkom) i testiranje hipoteze da li se na ovaj način mogu dobiti biomaterijali sa antimikrobnim dejstvom. Drugi metod fabrikacije alginatnih hidrogelova poboljšanih karakteristika je zasnovan na prirodno-inspirisanom principu dizajna – biomineralizaciji. Ukoliko se alginatni matriks impregnira čvršćom fazom, na primer, mineralima, moguće je dobiti kompozit boljih svojstava i produžene stabilnosti. Dodatno, ukoliko ova mineralna faza predstavlja so nekog od esencijalnih metala, kao što je cink, mineralni depoziti deluju i kao rezervoar bioaktivnih i antimikrobnih metalnih jona u fiziološkim sistemima i doprinose ukupnom sadržaju metala u biomaterijalu. Metodom elektrostatičke ekstruzije, sintetisani su mineralizovani nanokompozitni biomaterijali zasnovani na alginatu i mineralima cinka (cink-karbonat i cink-fosfat). Ispitano je da li prisustvo mineralne faze utiče na morfologiju, stabilnost, ukupni sadržaj metala i kinetiku otpuštanja metala iz dobijenih nanokompozitnih biomaterijala a zatim je evaluiran i njihov antimikrobni potencijal. Potencijalna biomedicinska primena ovih biomaterijala, bilo kao obloga za rane sa antimikrobnim dejstvom ili bioaktivnih nosača u tkivnom inženjstvu, zasniva se na otpuštanju jona esencijalnih metala prilikom kontakta sa biološkim sistemima.

Kao posebni ciljevi se mogu izdvojiti:

- Sinteza i karakterizacija alginatnih hidrogelova sa esencijelnim metalnim jonom cinka kao umrežavajućim agansom.
- Sinteza Zn-mineralizovanih nanokompozitnih biomaterijala na bazi alginata.
- Karakterizacija Zn-mineralne faze unutar nanokompozita i ispitivanje interakcija između mineralne faze i polimera (alginata).

- Ispitivanje uticaja mineralne faze na morfologiju, ukupni sadržaj metala, termička svojstva i kinetiku otpuštanja cinka iz nanokompozitnih materijala.
- Evaluacija antimikrobnog potencijala nemineralizovanih i mineralizovanih biomaterijala na bazi alginata i cinka.

Uzimajući u obzir da se polisaharidi, pored široke primene u biomedicini, mogu koristiti i kao ekološki prihvatljive sirovine za izradu ambalaže, isti princip je primenjen i prilikom dizajna novih biokompatibilnih i antimikrobnih nanokompozitnih filmova na bazi alginata i agar-agara kao potencijalnih aktivnih pakovanja za hranu.

Kao posebni ciljevi se mogu izdvojiti

- Ispitivanje mogućnosti sinteze Zn-mineralizovanih alginata u formi nanokompozitnih filmova za primenu u pakovanju hrane.
- Ispitivanje mogućnosti sinteze Zn-mineralizovanih, nanokompozitnih filmova na bazi agara sa potencijalnom primenom kao materijala za pakovanje hrane.
- Karakterizacija dobijenih nanokompozitnih filmova i ispitivanje uticaja mineralne faze na mehanička, termička, optička i barijerna svojstva, kao i potencijal za otpuštanja cinka.
- Evaluacija antimikrobnog potencijala mineralizovanih nanokompozitnih filmova na bazi agara.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Biomaterijali na bazi alginata, cinka i minerala cinka za potencijalnu biomedicinsku primenu

3.1.1. Sinteza nemineralizovanih cink-alginata

Cilj ove studije je sinteza i karakterizacija Zn-alginata u formi mikročestica metodom elektrostatičke ekstruzije.

3.1.1.1. Materijali

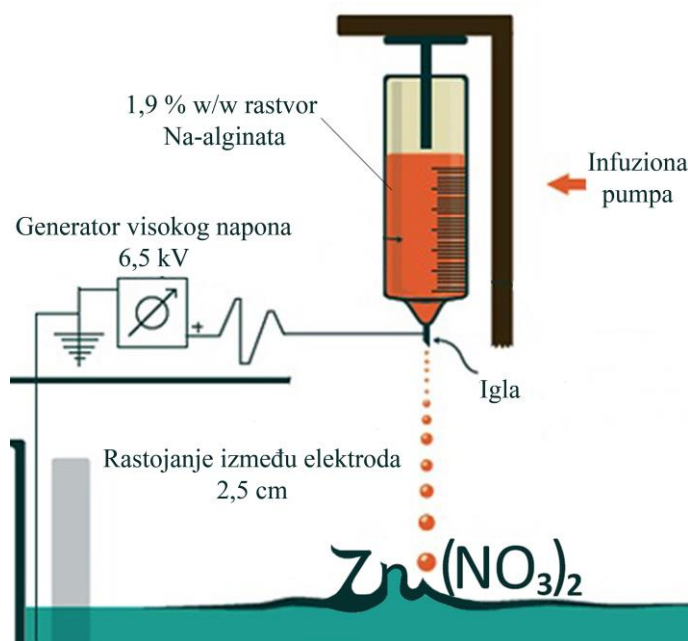
Korišćeni su natrijum-alginat niskog viskoziteta (A-2158, M/G odnos 1.56, stepen polimerizacije 60-400), natrijum-hlorid (NaCl), cink-nitrat heksahidrat ($Zn(NO_3)_2 \times 6H_2O$) (sve Sigma Aldrich, SAD) i azotna kiselina (HNO_3) (65 %, Zorka Pharma, Srbija). Za ispitivanje kinetike otpuštanja cinka korišćen je *Dulbecco* modifikovan *Eagle* medijum (DMEM) (Sigma Aldrich, MO, SAD).

3.1.1.2. Postupak sinteze nemineralizovanih cink-alginata

Zn-alginati su sintetisani u formi mikročestica metodom elektrostatičke ekstruzije, prema proceduri primenjenoj za dobijanje bakar-alginatnih mikročestica (Madzovska-Malagurski i sar., 2016).

Na-alginat je rastvoren u destilovanoj vodi, uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici da bi se dobio rastvor finalne koncentracije 1.9 % w/v. Alginatni rastvor je zatim potisnut, pri konstantnom protoku od 40 ml/h, kroz pozitivno naelektrisanu iglu od nerđajućeg čelika uz pomoć špric pumpe za potiskivanje tečnosti (Harvard Apparatus, SAD) u rastvor za geliranje (100 mM $Zn(NO_3)_2$) koji je konstantno mešan. Korišćen je špric od 20 ml i igla prečnika 20 G sa ravnim vrhom. Rastojanje između vrha igle i rastvora za geliranje je iznosilo 2,5 cm. Iz generatora visokog napona (Model 30R, Bertan Associates, SAD) izvedena je pozitivna elektroda i povezana sa iglom, a u rastvor za geliranje je uronjena uzemljena elektroda. Vrednost elektrostatičkog napona, između vrha igle i rastvora za geliranje, je iznosila 6,5 kV. Nakon ekstruzije, mikročestice su ostavljene 30 min u rastvoru za geliranje uz mešanje, a zatim su ostavljene još 23 h i 30 min u rastvoru

za geliranje, bez mešanja, kako bi se finalizovao proces formiranja hidrogela. Šematski prikaz procesa sinteze dat je na **Slici 3.1**.



Slika 3.1. Sinteza Zn-alginata u formi mikročestica: šematski prikaz metode elektrostatičke ekstruzije.

3.1.2. Metode karakterizacije nemineralizovanih cink-alginata

3.1.2.1. Optička mikroskopija

Dimenzije i morfologija mikročestica evaluirani su pomoću optičkog mikroskopa (Leica XTL-3 400D, Leica, Nemačka), koji je bio opremljen digitalnom kamerom (DC 300, Leica, Nemačka) i programom za analizu slike (IM 1000, Leica). Srednji prečnik određen je kao srednja vrednost na osnovu merenja najmanje 30 mikročestica.

3.1.2.2. Sadržaj Zn(II)

Ukupni sadržaj cinka u vlažnim mikročesticama određen je optičkom emisionom spektroskopijom sa induktivno kuplovanom plazmom (ICP-OES). 1 g uzorka je preko noći inkubirano u 9 ml koncentrovane azotne kiseline (65 % HNO₃). Koncentracija Zn(II) u

odgovarajućim razblaženjima kiselog rastvora je zatim merena pomoću ICP-OES spektrometra (Thermo, SAD). Sadržaj cinka je izražen u $\mu\text{mol Zn(II)}$ po g vlažnog Zn-alginatnog hidrogela.

3.1.2.3. Kinetika otpuštanja Zn(II)

Kinetika otpuštanja Zn(II) iz vlažnih mikročestica, ispitana je u fiziološki relevantnom okruženju, korišćenjem medijuma za kultivaciju ćelija, DMEM. 0,25 g vlažnih mikročestica je stavljeno u 5 ml DMEM i zatim inkubirano na 37 °C, u statičkim uslovima tokom 14 dana. U različitim vremenskim tačkama (inkubacioni dani 1, 3, 5, 7, 10 i 14), 4 ml inkubacionog medijuma je uzeto i zamenjeno istom zapreminom svežeg. Koncentracija otpuštenog Zn(II) u medijumu izmerena je pomoću ICP-OES.

3.1.3. Sinteza nanokompozita na bazi alginata i minerala cinka

Cilj ove studije je sinteza i karakterizacija novih nanokompozita na bazi alginata i minerala cinka u formi mikročestica, kao i ispitivanje uticaja mineralne faze na morfologiju, ukupni sadržaj metalnih jona, kinetiku otpuštanja Zn(II) u medijumu za gajenje ćelija i antimikrobni potencijal dobijenih uzoraka.

3.1.3.1. Materijali

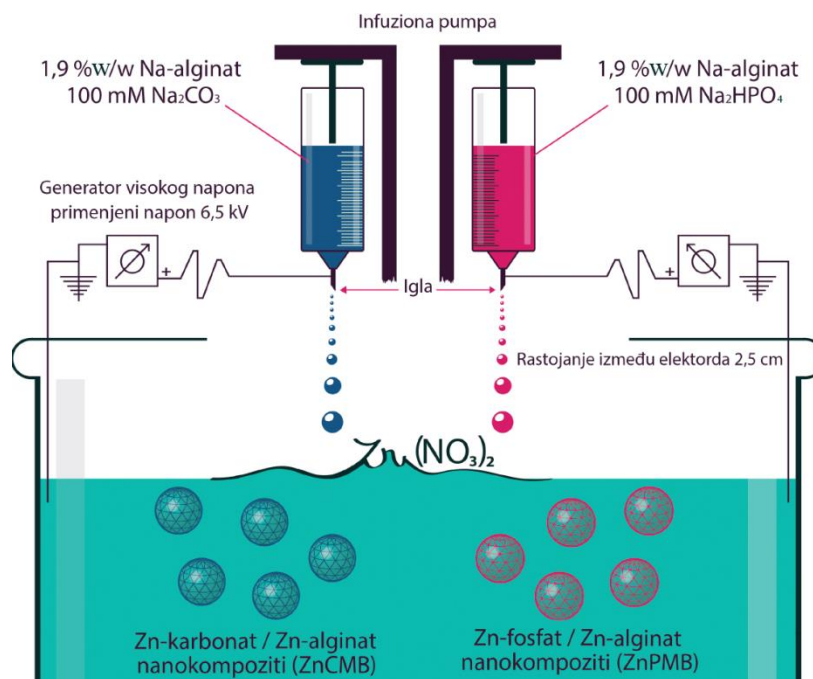
Korišćeni su natrijum-alginat niskog viskoziteta (A-2158, M/G odnos 1.56, stepen polimerizacije 60 - 400), natrijum-hlorid (NaCl), natrijum-karbonat (Na_2CO_3), natrijum-hidrogenfosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), cink-nitrat heksahidrat ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$) (sve Sigma Aldrich, MO, SAD) i azotna kiselina (Zorka Pharma, Šabac, Srbija). Za ispitivanje kinetike otpuštanja cinka korišćen je *Dulbecco* modifikovan *Eagle* medijum (DMEM) (Sigma Aldrich, MO, SAD).

U eksperimentima za ispitivanje antimikrobne aktivnosti korišćeni su hranjivi bujon (Nutrient Broth, NA), hranjivi agar (Nutrient Agar, NA), sladni ekstrakt bujon (Malt Extract Broth, MEB) i sladni ekstrakt agar (Malt Extract Agar, MEA) (sve HiMedia Laboratories, Mumbaj, Indija). Bakterijske kulture *Escherichia coli* ATCC 25922 i

Staphylococcus aureus ATCC 25923 i gljivica *Candida albicans* ATCC 10231 kupljeni su od American Type Culture Collection (Manassas, VA, SAD).

3.1.3.2. Postupak sinteze nanokompozita na bazi alginata i minerala cinka

Cink-mineralizovani alginatni nanokompoziti sintetisani su u formi mikročestica prema proceduri primenjenoj za sintezu bakar-mineralizovanih alginatnih nanokompozita (Bassett i sar., 2015), uz određene modifikacije. Na-alginat i mineralni prekursori (Na_2CO_3 ili Na_2HPO_4) su rastvoreni u destilovanoj vodi, uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici da bi se dobio rastvor finalne koncentracije 1,9 % w/v Na-alginat i 100 mM Na_2CO_3 , odn. 100 mM Na_2HPO_4 . Ekstruzioni rastvor alginata sa mineralnim prekursorima je zatim potisnut, pri konstantnom protoku od 40 ml/h, kroz pozitivno naelektrisanu iglu sa ravnim vrhom (20 G), u uzemljen i kontinualno mešan rastvor cink nitrata koncentracije 100 mM. Vrednost primenjenog napona je bila 6,5 kV, dok je razmak između elektroda, tj. površine rastvora za geliranje i vrha igle za ekstruziju, bio 2,5 cm. Dobijene mikročestice su ostavljene 24 h u rastvoru za geliranje kako bi se finalizovali simultani procesi umrežavanja hidrogela i formiranja mineralne faze unutar njega. Šematski prikaz metode sinteze Zn-mineralizovanih nanokompozita u formi mikročestica, prikazan je na **Slici 3.2**.



Slika 3.2. Šematski prikaz metode sinteze nanokompozita na bazi alginata i minerala cinka.

Nemineralizovane mikročestice, kao kontrola, sintetisane su prema istoj proceduri korišćenjem rastvora za ekstruziju bez mineralnih prekursora (1,9 % w/v Na-alginat).

Pre nego što se pristupilo karakterizaciji dobijenih Zn-mineralizovanih alginatnih nanokompozita, svi tipovi mikročestica su temeljno isprani destilovanom vodom i fiziolološkim rastvorom (0,9 % NaCl) kako bi se uklonili zaostali sintetski prekursori.

Slobodni cink-mineralni precipitati (cink-karbonat i cink-fosfat) pripremljeni su mešanjem zasićenih rastvora Na_2CO_3 , odn. Na_2HPO_4 , sa rastvorom za geliranje (100 mM $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$). Precipitirani minerali su zatim temeljno isprani destilovanom vodom, filtrirani i osušeni na sobnoj temperaturi. Prikaz svih uzoraka, njihovih oznaka i odgovarajućih formulacija, dat je u **Tabeli IV**

Tabela IV. Prikaz oznaka cink-mineralizovanih uzoraka i slobodnih cink-mineralnih precipitata i odgovarajućih formulacija.

Oznaka uzorka	Rastvor za ekstruziju		Rastvor za geliranje
	Na-alginat	Mineralni prekursori	
ZnAMB ^a		/	
ZnCMB ^b	1.9 % w/v Na-alginat	100 mM Na_2CO_3	
ZnPMB ^c		100 mM Na_2HPO_4	100 mM $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$
ZnC ^d	/	Na_2CO_3	
ZnP ^e	/	Na_2HPO_4	

^a nemineralizovane cink-alginatne mikročestice

^b mineralizovane cink-karbonat/cink-alginatne mikročestice

^c mineralizovane cink-fosfat/cink-alginatne mikročestice

^d cink-karbonat nastao precipitacijom u rastvoru

^e cink-fosfat nastao precipitacijom u rastvoru

3.1.4. Metode karakterizacije nanokompozita na bazi alginata i minerala cinka

3.1.4.1. Optička mikroskopija

Dimenzije i morfologija mikročestica evaluirani su prema proceduri datoj u Poglavlju 3.1.2.1.

3.1.4.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Površina mikročestica, prisustvo i morfologija mineralne faze ispitani su skenirajućim elektronskim mikroskopom JEOL JSM-6390LV (JEOL, Japan) pri naponu od 25 kV. Pre evaluacije uzorci su osušeni na sobnoj temperaturi i prevučeni zlatom pomoću uređaja BALTEC SCD 005 (Nemačka).

3.1.4.3. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)

Za FT-IR analize, suvi uzorci su pripremani u obliku peleta kalijum bromida na hidrauličnoj presi. FT-IR spektri uzoraka su snimljeni pomoću FT-IR spektrometra IRAffinity-1 (SHIMADZU, Japan) na sobnoj temperaturi, u rasponu talasnog broja od 500-4000 cm^{-1} , pri rezoluciji spektra od 4 cm^{-1} .

3.1.4.4. Difrakcija X-zraka (XRD)

XRD analiza je vršena na difraktometru Philips 1050 sa Cu- $K_{\alpha 1,2}$ radijacijom i Ni-filterom. Merenja su vršena u opsegu 2θ od 10 do 100°, sa korakom od 0,05° i vremenom izlaganja od 4 s po koraku.

3.1.4.5. Ramanska spektroskopija

Ramanska spektroskopija uzoraka je urađena na XploRA Ramanskom spektrometru/mikroskopu (Horiba Jobin Yvon, Francuska). Za analizu je korišćen laser na 532 nm. Sva merenja su vršena pri rezoluciji od 1 cm^{-1} , uz upotrebu objektiva sa uvećanjem 50x.

3.1.4.6. Termogravimetrijska analiza (TGA)

Termalna stabilnost uzoraka ispitana je pomoću uređaja SETARAM SETSYS Evolution 1750 (SAD). Analiza je vršena u atmosferi vazduha, pri brzini zagrevanja od 20 °C/min, protoku vazduha od 20 ml/min i temperaturnom opsegu od 30 do 1000 °C.

Podaci dobijeni TG analizom mineralizovanih uzoraka, iskorišćeni su i za izračunavanje sadržaja mineralne faze u sintetisanim nanokompozitima.

3.1.4.7. Ukupni sadržaj Zn(II)

Ukupni sadržaj cinka u Zn-mineralizovanim uzorcima određen je prema proceduri datoj u Poglavlju 3.1.2.2. Sadržaj Zn(II) je izražen u $\mu\text{mol Zn(II)}$ po g vlažnog Zn-mineralizovanog hidrogela.

3.1.4.8. Kinetika otpuštanja Zn(II)

Kinetika otpuštanja Zn(II) iz vlažnih mikročestica različitih formulacija, ispitana je u fiziološki relevantnom okruženju, korišćenjem medijuma za kultivaciju ćelija, DMEM. 0,25 g vlažnih mikročestica je stavljeno u 5 ml DMEM i zatim inkubirano na 37 °C, u statičkim uslovima tokom 14 dana. U različitim vremenskim tačkama (inkubacioni dani 1, 3, 5, 7, 10 i 14), 4 ml inkubacionog medijuma je uzeto i zamenjeno istom zapreminom svežeg. Koncentracija otpuštenog Zn(II) u medijum izmerena je pomoću ICP-OES.

3.1.4.9. Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost vlažnih nemineralizovanih i Zn-mineralizovanih uzoraka ispitana je na dva bakterijska i jednom gljivičnom soju: Gram-negativna bakterija *Escherichia coli* ATCC 25922, Gram-pozitivna bakterija *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i gljivica *Candida albicans* ATCC 10231. Prekonoćne kulture mikroorganizama, inkubirane na 37 °C za bakterije i 30 °C za gljivice, korišćene su za postizanje inicijalne koncentracije od 10^5 CFU/ml (Colony Forming Units) u suspenziji.

Neposredno pre ispitivanja antimikrobnog dejstva, nemineralizovane i Zn-mineralizovane Zn-alginatne mikročestice su sterilno sintetisane.

Antimikrobna aktivnost uzoraka ispitana je modifikovanom verzijom Brotovog makrodilucionog metoda (Klančnik i sar., 2010). U slučaju vlažnih mikročestica, odgovarajuća masa uzorka različitih formulacija dodata je u suspenziju sa mikroorganizmima kako bi se postigla finalna koncentracija uzorka u suspenziji od 300 mg/ml. Suspenzije mikroorganizama su zatim inkubirane 24 h u statičkim uslovima na 30 °C (gljivice) i 37 °C (bakterije). Tokom inkubacije, rast mikroorganizama je praćen uzimanjem uzoraka u različitim vremenskim tačkama (0, 1, 4 i 24 h). Odgovarajuća razblaženja uzorkovane suspenzije mikroorganizama su zatim zasejana na hranjivi agar

(bakterije), odn. sladni agar (gljivice) i inkubirana tokom 24 h na 37, odn. 30 °C, nakon čega su prebrojane izrasle kolonije. Antimikrobno dejstvo vlažnih nemineralizovanih i Zn-mineralizovanih Zn-alginatnih mikročestica izraženo je smanjenjem broja mikroorganizama u suspenziji sa testiranim uzorcima, izraženog kao \log_{10} CFU/ml.

Kulture mikroorganizama u hranjivom medijumu, bez prisustva testiranih uzoraka (tretmana), korišćene su kao kontrole.

3.1.4.10. Statistička analiza

Statistička analiza vršena je korišćenjem Studentovog t-testa i jednofaktorske analize varijanse (ANOVA) sa Takijevim testom. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija. Svi eksperimenti su rađeni u triplikatu. Razlike u vrednostima su smatrane statistički značajnim pri $p \leq 0.05$.

3.2. Bioaktivni filmovi na bazi cinka, minerala cinka, alginata i agara

3.2.1. Zn-mineralizovani Zn-alginatni filmovi

Cilj ove studije je sinteza i karakterizacija Zn-mineralizovanih nanokompozita na bazi alginata u formi filmova. Sinteza je vršena kombinacijom metodom izlivanja i otparavanja rastvarača (eng. "solvent casting") i eksternog geliranja i sastojala se od sledećih koraka: 1) formiranje suvih alginatnih filmova sa mineralnim prekursorima; 2) formiranje mineralne faze i geliranje alginata tj. dobijanje Zn-alginata uz simultano formiranje Zn-mineralne faze; i 3) sušenje dobijenih nanokompozita do konstantne mase.

3.2.1.1. Materijali

Za sintezu Zn-mineralizovanih Zn-alginatnih filmova je korišćen Na-alginat malog viskoziteta (A-2158, M/G odnos 1.56, stepen polimerizacije 60-400) proizvođača Sigma Aldrich (SAD). Kao mineralni prekursori su korišćeni Na_2CO_3 i Na_2HPO_4 , dok je kao rastvor za geliranje korišćen $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (sve Sigma Aldrich, SAD).

3.2.1.2. Postupak sinteze Zn-mineralizovanih Zn-alginatnih filmova

Sinteza mineralizovanih Zn-alginatnih filmova se sastojala iz tri faze. U prvoj fazi je 1,9 % w/v rastvor Na-alginata (sa odgovarajućim mineralnim prekursorom) izliven u standardne plastične Petri šolje (prečnika 85 mm) u kolicini od 15g. Kao mineralni prekursori su korišćeni 50 mM Na_2CO_3 i 50 mM Na_2HPO_4 . Uzorci su zatim ostavljeni da se suše na sobnoj temperaturi do konstantne mase. Nakon dobijanja suvih Na-alginatnih filmova sa mineralnim prekursorima, u drugoj fazi je vršeno geliranje Na-alginata tj. dobijanje Zn-alginata, uz istovremeno formiranje Zn-mineralne faze. Kao sredstvo za geliranje je korišćen 100 mM vodeni rastvor $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$. Suvi filmovi su bili potopljeni u 20 ml rastvora za geliranje u trajanju od jednog sata. Nakon geliranja i formiranja mineralnih faza, nanokompozitni filmovi su temeljno isprani sa destilovanom vodom i fiziološkim rastvorom kako bi se uklonili zaostali sintetski prekursori. Zatim su sušeni na sobnoj temperaturi do konstantne mase (treća faza). Na ovaj način su dobijeni uzorci tj. nanokompozitni filmovi koji se sastoje of Zn-alginata i odgovarajuće Zn-mineralne faze. Paralelno sa dobijanjem mineralizovanih Zn-alginatnih filmova, kao kontrola, sintetisani su

i nemineralizovani kontrolni Zn-alginatni filmovi prema istoj proceduri sa tim što je rastvor za formiranje filmova sadržao samo 1,9 % w/v Na-alginat.

3.2.1.3. Metode karakterizacije Zn-mineralizovanih Zn-alginatnih filmova

Dobijeni Zn-mineralizovani i kontrolni Zn-alginatni filmovi su morfološki analizirani kako bi se utvrdio efekat mineralizacije i geliranja na oblik filmova. Kriterijumi uzeti za analizu filmova su bili skupljanje filmova i morfologija nakon geliranja kao i raspodela mineralne faze u strukturi mineralizovanih filmova. Filmovi su nakon sinteze slikani standardnim digitalnim fotoaparatom.

3.2.2. Zn-mineralizovani nanokompozitni filmovi na bazi agar-agara

Cilj ove studije je sinteza, karakterizacija i ispitivanje antimikrobne aktivnosti Zn-mineralizovanih nanokompozita na bazi agar-agara u formi filmova za potencijalnu primenu u pakovanju hrane.

3.2.3. Sinteza Zn-mineralizovanih agarnih filmova sa naknadnom sintezom mineralne faze

Sinteza nanokompozitnih agarnih filmova sa naknadnom sintezom Zn-mineralne faze se odvija u tri koraka i zasniva na: 1) pripremi agara sa mineralnim prekursorima u formi suvih filmova, 2) tretiranju tako dobijenih filmova rastvorom cink-nitrata tj. formiranju mineralnih faza i 3) sušenju dobijenih filmova na 37 °C do konstantne mase.

3.2.3.1. Materijali i metode

Za sintezu mineralizovanih agarnih filmova je korišćen agar-agar proizvođača HiMedia Laboratories (Indija). Kao mineralni prekursori su korišćeni Na_2CO_3 i Na_2HPO_4 , dok je kao gelirajuće sredstvo korišćen $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ proizvođača Sigma Aldrich (SAD).

3.2.3.2. Postupak sinteze Zn-mineralizovanih nanokompozitnih filmova na bazi agar-agara - naknadna sinteza Zn-mineralne faze

Postupak sinteze mineralizovanih agarnih filmova naknadnim formiranjem mineralne faze je vršen u tri koraka. U prvom koraku je vodeni rastvor agara (2 % w/v) uz dodatak odgovarajućeg prekursora mineralne faze zagrevan do ključanja (kako bi se rastvorio agar),

a zatim sterilisan na 120 °C u trajanju od 15 min. u laboratorijskom autoklavu. Kao prekursor za sintezu karbonatne mineralne faze je korišćen 50 mM Na₂CO₃, odnosno 50mM Na₂HPO₄ kao prekursor za sintezu fosfatne mineralne faze. Nakon autoklaviranja, rastvori su ohlađeni na ≈ 50 °C i izliveni u plastične Petri šolje (prečnika 85 mm) u količini od 15 g. Petri šolje su ostavljene da na sobnoj temperaturi da agar očvrzne tj. formira gel, a zatim su i sušene na sobnoj temepraturi do dobijanja suvih agarnih filmova.

U drugoj fazi je vršena sinteza Zn-mineralne faze. Ovaj postupak se sastojao u prelivanju suvih agarnih filmova sa po 20 ml 100 mM rastvora Zn(NO₃)₂. Filmovi su ostavljeni da se rehidrišu u rastvoru cink nitrata u trajanju od jednog sata (sinteza mineralne faze), a zatim su isprani sa destilovanom vodom kako bi se uklonili zaostali mineralni prekursori i Zn(NO₃)₂. Nakon ispiranja, filmovi su ostavljeni da se suše na sobnoj temperaturi (treći korak). Kao kontrolni filmovi su korišćeni agarni filmovi dobijeni po istoj proceduri, samo bez dodatka mineralnih prekursora.

3.2.3.3. Metode karakterizacije Zn-mineralizovanih nanokompozitnih filmova na bazi agar-agara dobijenih naknadnom sintezom Zn-mineralne faze

Dobijeni filmovi su ispitivani morfološki tako što su nakon sinteze fotografisani, pri čemu su praćene promene u makromorfološkim karakteristikama filmova.

Dodatno, morfologija površine dobijenih Zn-mineralizovanih nanokompozitnih i nemineralizovanih, kontrolnih agarnih filmova ispitana je SEM analizom prema proceduri datoj u Poglavlju 3.1.4.2.

FTIR i Ramanska spektroskopija su urađene prema procedurama opisanim u Poglavlju 3.1.4.3., odn. 3.1.4.5.

3.2.4. Sinteza Zn-mineralizovanih agarnih filmova sa istovremenom sintezom mineralne faze

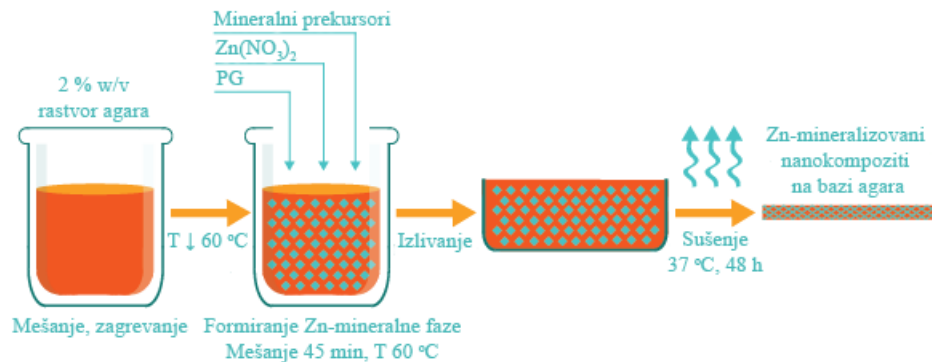
Sinteza je vršena kombinacijom *in situ* sinteze mineralne faze i metode izlivanja i otparavanja rastvarača i sastojala se od sledećih koraka: 1) priprema rastvora za formiranje filmova rastvaranjem agara i formiranjem mineralne faze unutar njega; i 2) sušenje dobijenih nanokompozita do konstantne mase.

3.2.4.1. Materijali

Za sintezu Zn-mineralizovanih nanokompozitnih filmova na bazi agara korišćeni su agar-agar proizvođača HiMedia Laboratories (Indija) i poliglicerol (PG), kao plastifikator, u vidu smeše diglicerola, triglicerola i tetraglicerola (85%) sa tragovima glicerola, proizvođača Solvay (Belgija). Za formiranje mineralne faze su korišćeni Na_2CO_3 i Na_2HPO_4 i $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (sve Sigma Aldrich, SAD). Kinetika otpuštanja cinka ispitana je korišćenjem etanola i sirćetne kiseline (Zorka Pharma, Srbija).

3.2.4.2. Postupak sinteze Zn-mineralizovanih nanokompozitnih filmova na bazi agara – simultana sinteza Zn-mineralne faze

Sinteza Zn-mineralizovanih nanokompozitnih filmova na bazi agara se sastojala iz dve faze: u prvoj fazi je pripreman rastvor za formiranje filmova rastvaranjem agara u destilovanoj vodi uz zagrevanje ($100\text{ }^\circ\text{C}$) i mešanje kako bi se dobio rastvor finalne koncentracije 2 % w/v. Pre dodatka ostalih komponenti, temperatura rastvora agara je snižena na $60\text{ }^\circ\text{C}$, a zatim su dodati poliglicerol (30 % w/w mase agara), $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (finalno 50 mM) i mineralni prekursori (Na_2CO_3 ili Na_2HPO_4 , finalno 25 mM) i rastvor je mešan 45 min na temperaturi od $60\text{ }^\circ\text{C}$. Formiranje mineralne faze u rastvoru je bilo vidljivo neposredno po dodatku mineralnih prekursora. U drugoj fazi je rastvor za fomiranje filmova, sa odgovarajućim formiranim Zn-mineralima, izliven u standardne plastične Petri šolje (prečnika 85 mm) u količini od 15 g, poravnan da se osigura uniformna debljina i uzorci su zatim ostavljeni da se suše u sušnici na $37\text{ }^\circ\text{C}$ tokom 48 h. Na ovaj način su dobijeni uzorci tj. nanokompozitni filmovi koji se sastoje od agara impregniranog odgovarajućom Zn-mineralnom fazom (**Slika 3.3**).



Slika 3.3. Šematski prikaz sinteze Zn-mineralizovanih nanokompozita na bazi agara

Paralelno sa dobijanjem Zn-mineralizovanih agarnih filmova, kao kontrola, sintetisani su i nemineralizovani kontrolni agarni filmovi prema istoj proceduri sa tim što je rastvor za formiranje filmova sadržao samo 2 % agar i PG (30 % w/w mase agara).

Prikaz oznaka uzoraka i odgovarajućih formulacija, dat je u **Tabeli V**.

Tabela V. Pregled oznaka uzoraka Zn-mineralizovanih nanokompozita na bazi agara i odgovarajućih formulacija.

Uzorak	Agar [%]	Zn(NO ₃) ₂ [mM]	Mineralni prekursori		PG [%]
			Na ₂ CO ₃ [mM]	Na ₂ HPO ₄ [mM]	
A ^a	2	-	-	-	
AC ^b	2	50	25	-	30 % w/w agar
AP ^c	2	50		25	
C ^d	-	100	-	100	-
P ^e	-	100	100	-	-

^a A, kontrolni, nemineralizovani agarni filmovi

^b AC, mineralizovani Zn-karbonat/agar nanokompozitni filmovi

^c AP, mineralizovani Zn-fosfat/agar nanokompozitni filmovi

^d C, slobodni cink-karbonat dobijen precipitacijom u vodenom rastvoru

^e P, slobodni cink-fosfat dobijen precipitacijom u vodenom rastvoru

3.2.5. Metode karakterizacije Zn-mineralizovanih nanokompozitnih filmova na bazi agara nastalih simultana sinteza Zn-mineralne faze

3.2.5.1. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Morfologija površine dobijenih Zn-mineralizovanih nanokompozitnih i nemineralizovanih, kontrolnih agar filmova ispitana je SEM analizom prema proceduri datoj u Poglavlju 3.1.4.2.

3.2.5.2. Energetska disperzivna spektroskopija (EDS)

Elementalna analiza površine dobijenih uzoraka vršena je primenom EDS analize pomoću JEOL JSM-6390LV (JEOL, Japan) elektronskog mikroskopa, na radnom naponu od 30 kV, korišćenjem Oxford Instruments detektora (Velika Britanija).

3.2.5.3. Optičke karakteristike

Optičke karakteristike dobijenih Zn-mineralizovanih nanokompozitnih i kontrolnih filmova ispitani su u ultraljubičastom i vidljivom delu spektra pomoću UV-VIS spektrofotometra HALO DB-20S (Dynamica Scientific Ltd. Švajcarska). Uzorci su isečeni na trake dimenzija 1 x 4 cm i postavljeni u test ćeliju spektrofotometra, normalno na pravac prostiranja svetlosnog zraka. Transparentnost filmova (T) je izračunata korišćenjem jednačine (Han & Floros, 1997):

$$T = A/x$$

gde je A izmerena vrednost absorbance filma na talasnoj dužini od 600 nm, a x debljina filma u mm.

3.2.5.4. Karakterizacija mineralne faze i mineral-polimer interakcija

Identifikacija Zn-mineralne faze unutar dobijenih nanokompozita, kao i ispitivanje potencijalnih interakcija između inkorporiranih minerala i polimernog matriksa, vršeni su XRD i FTIR analizom ukombinovanom sa Ramanskom spektroskopijom, prema procedurama opisanim u Poglavljima 3.1.4.3., 3.1.4.4. i 3.1.4.5.

3.2.5.5. Mehanička karakterizacija

Mehanička karakterizacija uzoraka vršena je pomoću Instron M 1185 universal uređaja za testiranje, pri brzini istezanja od 2 mm/min. Iz dobijenih kriva napon-deformacija određeni su zatezna čvrstoća (TS, MPa), Jungov modul elastičnosti (E, MPa) i izduženje pri kidanju (ϵ , %). Pre testiranja, uzorci su isečeni na trake (4,92 x 26,73 x 0,06 mm) i kondicionirani tokom 24 h u komori na 25 °C i 50 % vlažnosti vazduha. Merenja su vršena na sobnoj temperaturi, u sekstaplikatu. Dobijene vrednosti TS, E i ϵ su bile u opsegu ± 5 %.

U cilju ispitivanja uticaja sadržaja mineralne faze na mehaničke karakteristike dobijenih nanokompozita, dodatno su sintetisani i mehanički okarakterisani Zn-karbonat mineralizovani nanokompoziti na bazi agara sa različitim, rastućim sadržajem mineralne faze (5, 10 i 25 mM Na₂CO₃). Uzorci su označeni kao: A/5C, A/10C i A/25C. Karbonatni mineralni prekursor je izabran na osnovu povoljnih morfoloških karakteristika dobijenih nanokompozita i uniformne distribucije mineralne faze unutar polimernog matriksa.

3.2.5.6. Propustljivost vodene pare

Propustljivost vodene pare (eng. “Water Vapor Permeability”, WVP) je merena prema ASTM E96-95 metodi, koristeći CEAST metalne čaše sa unutrašnjim prečnikom od 30 mm. Čaše su bile napunjene destilovanom vodom i stavljene u komoru koja je podešena na temperaturu 25 °C i relativnu vlažnost vadauha od 50 %. Na osnovu merenja smanjenja mase destilovane vode u čaši u funkciji vremena (na svakih 2 h), izračunata je propustljivost vodene pare (WVP) na osnovu sledeće jednačine:

$$WVP = \frac{\Delta m \times l}{A \times t \times \Delta p}$$

gde je Δm promena mase (g), t vreme tokom koga je došlo do promene mase Δm (h), A testirana površina čaše (m²), l debljina filmova (m) i Δp razlika pritiska vode sa obe strane filma (Pa). Dobijene vrednosti su bile u opsegu ± 5 %.

Eksperimenti merenja propustljivosti vodene pare vršeni su na nanokompozitnim filmovima mineralizovanim različitim, rastućim koncentracijama Zn-karbonata (5, 10 i 25

mM). Karbonatom-mineralizovani filmovi su izabrani zbog povoljnih morfoloških karakteristika i uniformne interne strukture.

3.2.5.7. Termogravimetrijska analiza (TGA)

Termalna stabilnost uzoraka ispitana je pomoću uređaja SDT 2960 TGA/DSC Analyzer (TA INSTRUMENTS, SAD). Analiza je vršena u atmosferi vazduha, pri brzini zagrevanja od 20 °C/min, protoku vazduha od 20 ml/min i temperaturnom opsegu od 30 do 1000 °C.

3.2.5.8. Ukupni sadržaj Zn(II)

Ukupni sadržaj cinka u Zn-mineralizovanim agarnim nanokompozitnim filmovima određen je masenom spektrometrijom sa induktivno kuplovanom plazmom (ICP-MS). Priprema uzoraka za merenje je vršena digestijom u prisustvu vodonik-peroksida (30 % w/w) i azotne kiseline (70 % w/w) u mikrotalasnoj pećnici. Od dobijenog rastvora su, nakon hlađenja, napravljena odgovarajuća razblaženja i koncentracija Zn(II) je izmerena pomoću ICP-MS. Sadržaj cinka u dobijenim uzorcima izražen je u mg Zn po g dobijenog filma.

3.2.5.9. Kinetika otpuštanja Zn(II)

Uzimajući u obzir da je potencijalna primena Zn-mineralizovanih nanokompozitnih filmova različitih formulacija u industriji pakovanja hrane, eksperimenti ispitivanja kinetike otpuštanja Zn(II) iz dobijenih uzoraka izvedeni su korišćenjem medijuma koji simuliraju hranu: 10 % etanol (simulant hrane alkoholnog karaktera) i 3 % sirćetna kiselina (simulant hrane hidrofilnog karaktera čija pH vrednost je ispod 4.5) (JRC Scientific and technical reports, 2009; European Standard, 2004; Commission Regulation EU 10/2011).

Filmovi oblika traka (1 x 3 cm, ukupne aktivne površine 6 cm²) stavljeni su u 10 ml medijuma i inkubirani na sobnoj temperaturi, u statičkim uslovima, tokom 7 dana. Na kraju inkubacionog perioda, koncentracija otpuštenog Zn(II) u okolni medijum izmerena je pomoću ICP-MS. Rezultati su predstavljeni u mg otpuštenog cinka po kg testiranog medijuma.

3.2.5.10. Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost dobijenih uzoraka ispitana je prema proceduri opisanoj u Poglavlju 3.1.4.9. uz sledeće modifikacije: koncentracija tretmana je bila 50 mg/ml bakterijske suspenzije i broj kolonija je određen nakon 24 h inkubacije.

3.2.5.10. Statistička analiza

Statistička analiza vršena je korišćenjem Studentovog t-testa i jednofaktorske analize varijanse (ANOVA) sa Takijevim testom. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija. Svi eksperimenti su rađeni u triplikatu. Razlike u vrednostima su smatrane statistički značajnim pri $p \leq 0.05$.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Biomaterijali na bazi alginata, cinka i minerala cinka

U ovom poglavlju je opisana sinteza i karakterizacija nemineralizovanih i Zn-mineralizovanih Zn-alginatnih biomaterijala modulatornih karakteristika sa potencijalnom primenom u biomedicini.

4.1.1. Nemineralizovani i Zn-mineralizovani, nanokompozitni Zn-alginatni biomaterijali

Nemineralizovani Zn-alginati i nanokompozitni Zn-mineralizovani Zn-alginatni uzorci su sintetisani u formi mikročestica primenom metode elektrostatičke ekstruzije. Proces sinteze nanokompozita je zasnovan na simultanoj mineralizaciji i geliranju alginatnog matriksa. Dobijeni nemineralizovani Zn-alginatni uzorci su okarakterisani sa stanovišta morfologije i dimenzija mikročestica (optička mikroskopija), ukupnog sadržaja Zn(II) i potencijala otpuštanja Zn(II) u fiziološki relevantnoj sredini (ICP-OES), dok su dobijeni nanokompoziti okarakterisani u pogledu morfologije mikročestica (optička mikroskopija i SEM), karakteristika mineralne faze (XRD, FTIR, Ramanska spektroskopija), ukupnog sadržaja cinka (ICP), stabilnosti u *in vitro* uslovima, termičkih svojstava (TGA) i kinetike otpuštanja Zn(II) u fiziološki relevantnom okruženju. Dodatno je eksperimentalno određen antimikrobni potencijal uzoraka svih formulacija. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da prisustvo mineralne faze značajno utiče na morfologiju, povećava ukupni sadržaj Zn(II), poboljšava stabilnost, termička svojstva i potencijal za otpuštanje Zn(II) dobijenih uzoraka. Utvrđeno je da alginat, aktivno učestvuje u procesu mineralizacije što ima za posledicu nastanak specifičnih intimnih, interakcija između polimera i mineralne faze i stvaranje nanokompozita specifičnih, poboljšanih svojstava. Takođe, Zn-mineralizovani nanokompoziti poseduju izuzetna antimikrobna svojstva.

4.1.1.1. Morfologija

Dodavanjem mineralnih prekursora (Na_2HPO_4 ili Na_2CO_3) u alginatni rastvor i sukcesivnim izlaganjem rastvoru za geliranje, uspešno su dobijeni dvofazni nanokompoziti. Proces nastanka nanokompozita zasnovan je na dvostrukoj ulozi jona cinka: cink iz rastvora

za geliranje je istovremeno posredovao u procesu umrežavanja alginatnih lanaca (formiranje hidrogela) i deponovanja mineralne faze (formiranje nerastvornih cink-karbonata ili cink-fosfata) što je imalo za posledicu stvaranje Zn-alginatnog hidrogela impregniranog Zn-mineralnom fazom. Prikaz uzoraka različitih formulacija i njihovih karakteristika dat je u **Tabeli VI**.

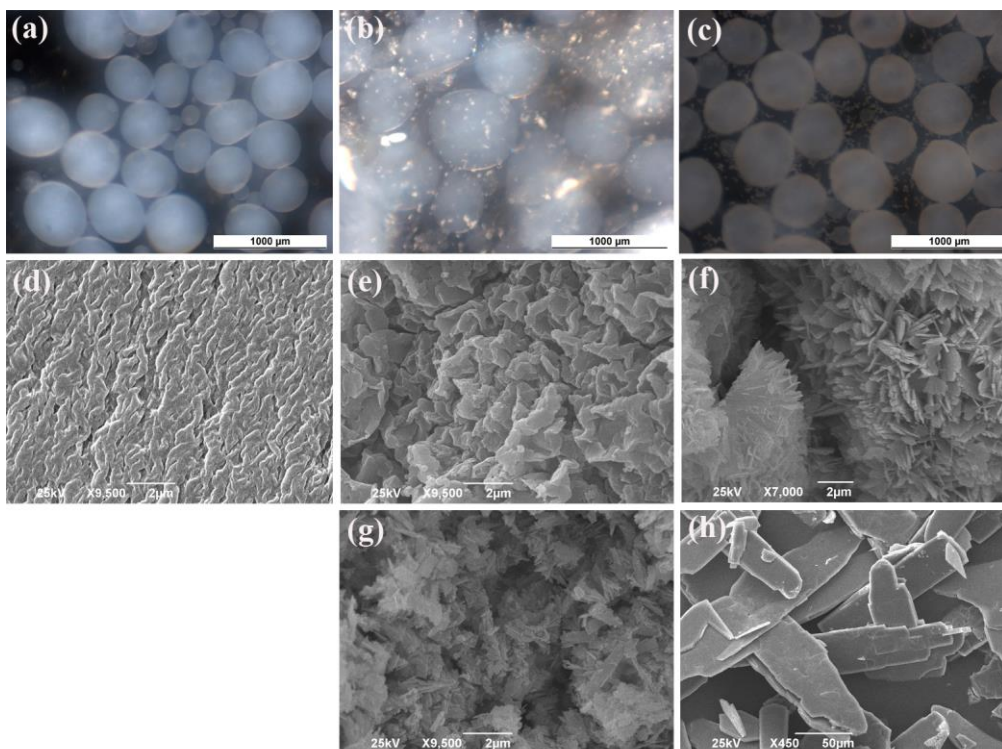
Tabela VI. Pregled oznaka i karakteristika dobijenih Zn-mineralizovanih nanokompozitnih uzoraka.

Oznaka uzorka	Prečnik [μm]	Suva masa ^a [%]	Sadržaj Zn(II) [μmol/g]	Sadržaj mineralne faze ^b [%]
ZnAMB	461 ± 27	4,5	159 ± 7	/
ZnCMB	670 ± 41	2,9	279 ± 21	24,08
ZnPMB	461 ± 32	7,1	333 ± 17	30,24

^a Prikazano kao procenat u odnosu na početnu vlažnu masu

^b Prikazano kao procenat u odnosu na suhu masu

Uniformne mikročestice, u pogledu dimenzija i sferičnosti, su dobijene korišćenjem alginatnog rastvora bez mineralnog prekursora (ZnAMB) i alginatnog rastvora sa fosfatnim mineralnim prekursorom (ZnPMB), dok su mikročestice sa Zn-karbonatnom fazom (ZnCMB) bile većih dimenzija i amorfno oblika (**Tabela VI, Slika 4.1a-c**).



Slika 4.1. Morfologija nemineralizovanih i Zn-mineralizovanih, nanokompozitnih Zn-alginatnih mikročestica: Optičke mikrografije: (a) ZnAMB; (b) ZnCMB i (c) ZnPMB. SEM mikrografije površine mikročestica: (d) ZnAMB; (e) ZnCMB i (f) ZnPMB. Slobodni mineralni precipitati: (g) ZnC i (h) ZnP.

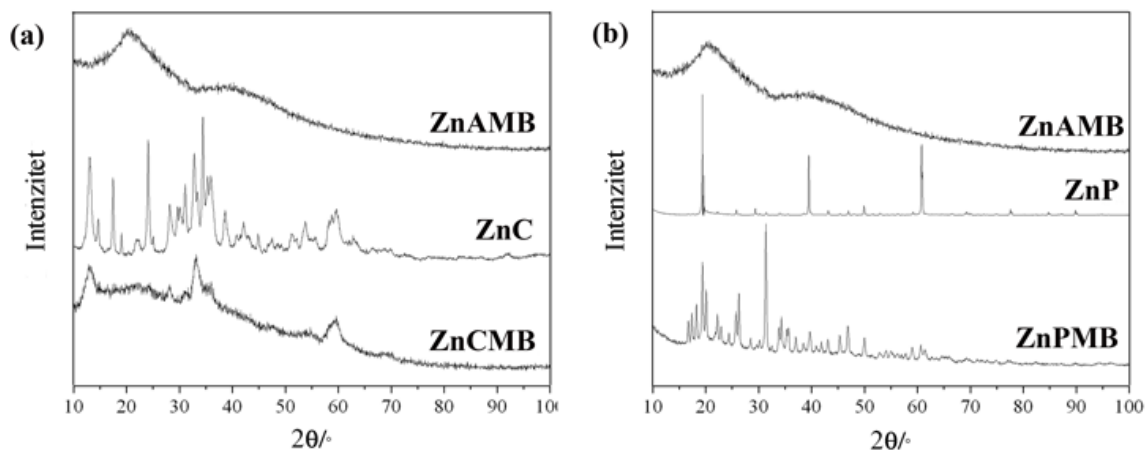
Na SEM mikrografijama se uočava jasna razliku u morfologiji površine između nemineralizovanih i mineralizovanih mikročestica. Dok su nemineralizovane mikročestice glatke (**Slika 4.1d**), na površini mineralizovanih uzorka evidentno je prisustvo mineralnih precipitata (**Slika 4.1e i 4.1f**). Bitno je naglasiti da je ne tako uniformno gladak izgled suvih nemineralizovanih Zn-alginatnih uzoraka, artefakt nastao usled sušenja na vazduhu prilikom pripreme za SEM. Hidrogelovi predstavljaju kontinualne trodimenzionalne polimerne mreže ispunjene vodom, koja je, u kvantitativnom smislu, njihov glavni konstituent. Tokom sušenja na vazduhu i tranzicije hidrogela u kserogel, usled visokog površinskog napona vode, dolazi do kolabiranja interne strukture hidrogela i deformacije površine. U slučaju suvih Zn-mineralizovanih uzoraka, površinska deformacija mikročestica je pored sušenja na vazduhu, delimično uzrokovana i visokim sadržajem mineralnog prekursora u odnosu na dostupan Zn(II) u rastvoru za geliranje (Xie et al.,

2010). Uzimajući u obzir da su geliranje i mineralizacija simultani i dinamički procesi, u situacijama kada je mineralni prekursor prisutan u višku, formiranje hidrogela može biti inhibirano (npr. usled precipitacije mineralne faze u vidu barijere na površini mikročestica), što ima za posledicu nastanak nestabilne i neuniformno gelirane polimerne 3D mreže. Pošto je ova pojava bila izraženija kod nanokompozita mineralizovanih cink-karbonatom (vlažne ZnCMB su bile većih dimenzija usled slabog umrežavanja i retencije strukturne vode i imale su najmanju suhu masu u poređenju sa nemineralizovanim i uzorcima mineralizovanim cink-fosfatom, **Tabela IV**), može se zaključiti da i koncentracija i tip mineralnog prekursora utiču na stabilnost i morfologiju dobijenih nanokompozita.

4.1.1.2. Karakterizacija inkorporirane Zn-mineralne faze u nanokompozitima

4.1.1.2.1. XRD analiza

Identifikacija i karakterizacija mineralne faze primarno je vršena XRD analizom. U cilju ispitivanja potencijalnog uticaja alginata, kao organskog matriksa, na proces mineralizacije, paralelno sa Zn-mineralizovanim nanokompozitima, koji sadrže minerale nastale u prisustvu alginata, sintetisani su i slobodni Zn-minerali precipitacijom u vodenom rastvoru. Difraktogrami dobijeni XRD analizom slobodnih mineralnih precipitata, nemineralizovanog Zn-alginata i Zn-mineralizovanih nanokompozita, prikazani su na **Slici 4.2**.



Slika 4.2. XRD spektri nemineralizovanih, Zn-mineralizovanih uzoraka i slobodnih mineralnih precipitata: (a) ZnCMB i (b) ZnPMB.

Analizom difraktograma slobodnih minerala, utvrđeno je da su se slobodni mineralni precipitati Zn-karbonata (ZnC) predominantno sastojali od $Zn_5(CO_3)_2(OH)_6$, sa relativno malim udelom $ZnCO_3$ i $Zn_4(CO_3)(OH)_6$, dok je nakon mineralizacije karbonatnim mineralnim prekursorom, tj. unutar ZnCMB dominantna faza bila $Zn_5(CO_3)_2(OH)_6$. Primenom Šererove jednačine izračunate su dimenzije pojedinačnih kristalita i rezultati su sledeći: kristaliti slobodnih mineralnih precipitata su bili ~ 22 nm, dok su kristaliti minerala nastalih u prisustvu alginata bili ~ 3 nm.

U slučaju Zn-fosfata oba uzorka i ZnP i ZnPMB, su kristalisala u formi $Zn_3(PO_4)_2(H_2O)_4$, ali sa potpuno različitim morfološkim odlikama pojedinačnih kristalita (**Slika 4.1f** i **4.1h**). Slobodni mineralni precipitati su se karakterisali ekstremnim anizotropnim rastom kristalita, koji je rezultirao u pločastom obliku čiji [010] pravac je bio normalan na ravne strane kristalita (**Slika 4.1h**). Nasuprot tome, fosfatni minerali nastali u prisustvu alginata su bili izotropni sa potpuno nasumičnom orijentacijom kristala (**Slika 4.1f**). Izračunate dimenzije pojedinačnih kristalita u slobodnoj cink-fosfatnoj mineralnoj fazi i mineralima unutar nanokompozita su: ~ 43 i ~ 28 nm.

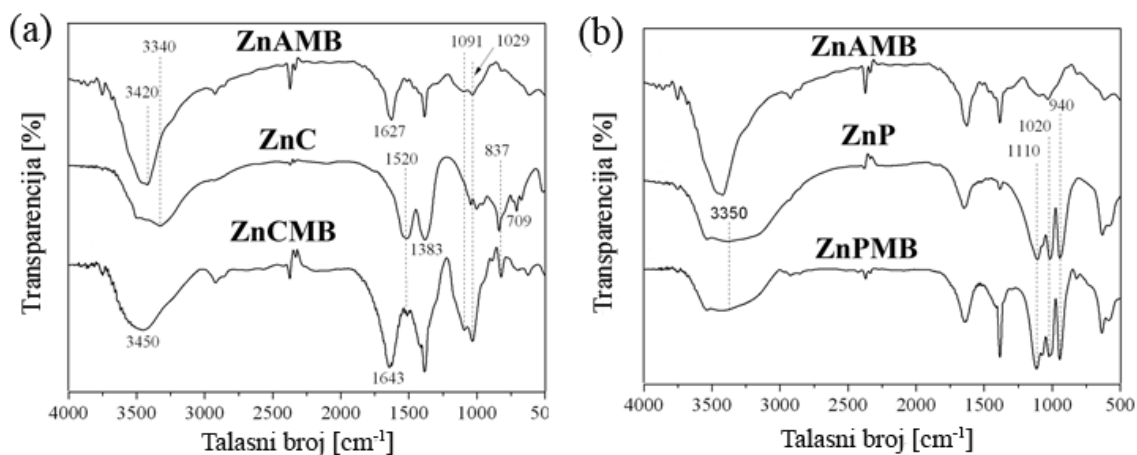
Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da alginat aktivno učestvuje u procesu mineralizacije i da je formiranje kristala unutar alginata drugačiji proces od precipitacije u vodenom rastvoru. Minerali nastali unutar alginata su bili manjih dimenzija u slučaju oba nanokompozita (ZnCMB i ZnPMB), sa tim što je ovaj efekat bio izraženiji kod karbonata gde su kristaliti slobodnih minerala bili skoro 7 puta veći od kristalita nanokompozita ZnCMB. Fosfatni uzorci nisu pokazali tako drastičnu razliku u pogledu dimenzija (kristaliti slobodnih minerala su bili duplo veći u odnosu na minerale unutar nanokompozita ZnPMB), ali su imali potpuno različite morfologije. Takođe, u slučaju karbonata, alginat je vršio selekciju određenog polimorfizma, tj. favorizovano je bilo njegovo formiranje u odnosu na polimorfizme slobodne mineralne faze.

Ovaj fenomen se može objasniti specifičnim uslovima pod kojima se odvija mineralizacija u hidrogelu. Nasuprot mineralizaciji u rastvoru, mineralizacija u prisustvu alginata je ograničena na mikroprostore unutar 3D-fibrilarne mreže hidrogela (Mann, 2001) tako da strukturne karakteristike alginata, kao što su sastav monomera, dužina G-blokova, funkcionalne grupe na polimernim lancima i poroznost hidrogela aktivno učestvuju u

procesu mineralizacije modifikujući lokalno koncentraciju mineralnih prekursora ili formiranje nukleacijskih centara (Ma & Feng, 2011, Asenath-Smith i sar., 2012). Slična pojava da alginat utiče na karakteristike minerala, primećena je na primeru kalcijum-karbonata i kalcijum-fosfata (Olderøy et al., 2011; Xie et al., 2010), kao i minerala bakra (Bassett et al., 2015). Polimerna mreža predstavlja skelu ili nosač na kome se formira mineralna faza, a između organske i neorganske faze dolazi do specifičnih, intimnih interakcija koje za posledicu imaju nastanak nanokompozita određenih svojstava. Uzimajući u obzir da alginat aktivno učestvuje u procesu mineralizacije bilo putem selekcije polimorfizama, orijentacije, morfologije ili dimenzija kristalita, možemo zaključiti da alginatom posredovana biomineralizacija predstavlja dobru strategiju za dizajn biomaterijala precizno definisanih svojstava za specifične biomedicinske aplikacije.

4.1.1.2.2. FTIR

FTIR spektroskopija je korišćena kako bi se potvrdilo prisustvo minerala u nanokompozitima i ispitale potencijalne hemijske interakcije između mineralne faze i alginata. FTIR spektri slobodnih mineralnih precipitata, nemineralizovanih i mineralizovanih, nanokompozitnih uzoraka su predstavljeni na **Slici 4.3**.



Slika 4.3. FTIR spektri: (a) ZnCMB i (b) ZnPMB.

U FTIR spektru nemineralizovanih Zn-alginata (ZnA) uočavaju se intenzivne trake na 1091 cm^{-1} (O-C-O) i 1029 cm^{-1} (C-O), karakteristične za prirodne polisaharide (Singh i sar.,

2009), kao i trake na 1420 i 1627 cm^{-1} usled prisustva karboksilne grupe i 3420 cm^{-1} koja potiče od hidroksilne grupe (Huang i sar., 1999; Ribeiro i sar., 2004).

Slobodni karbonatni precipitati (ZnC) pokazuju trake na $\sim 3340 \text{ cm}^{-1}$ usled vibracija -OH, dok su trake na 1520 cm^{-1} , 1383 cm^{-1} , 837 cm^{-1} i 709 cm^{-1} posledica prisustva karbonatne grupe (**Slika 4.3a**) (Haq & Azad, 2012). U spektru slobodnih fosfatnih precipitata (**Slika 4.3b**), uočavaju se intenzivne trake na $\sim 3350 \text{ cm}^{-1}$ koje odgovaraju vibracijama hidroksilne grupe, kao i trake na 1110 cm^{-1} , 1020 cm^{-1} i 940 cm^{-1} uzrokovane vibracijama fosfatne grupe (Jung i sar., 2009).

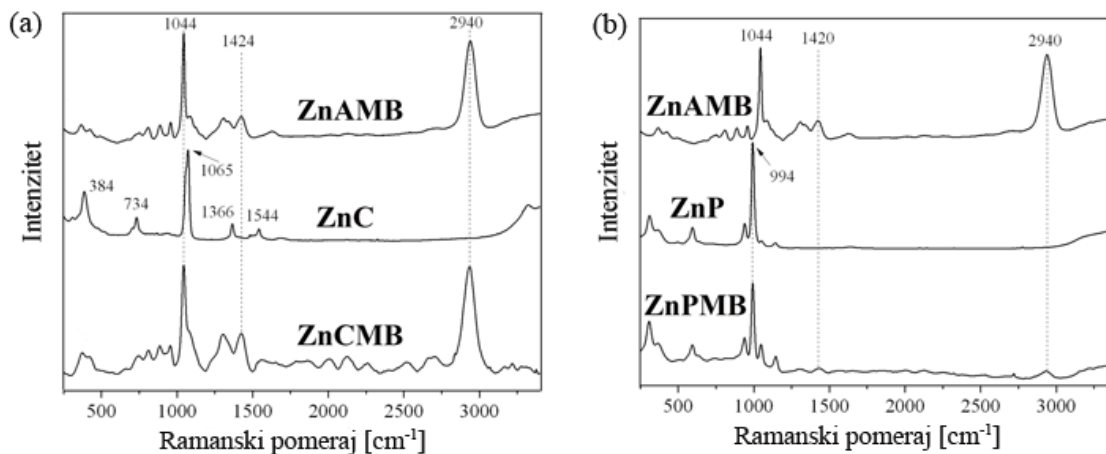
FTIR spekar nanokompozita mineralizovanih fosfatom (ZnPMB), jasno pokazuje prisustvo traka karakterističnih za fosfate (**Slika 4.3b**), dok je spektar nanokompozita mineralizovanih karbonatom (ZnCMB) bio, u velikoj meri, sličan spektru nemineralizovanih Zn-alginata i dominirale su trake karakteristične za alginat (**Slika 4.3a**). Dobijeni rezultati mogu se objasniti relativno malom količinom nastale karbonatne mineralne faze u odnosu na fosfatnu u odgovarajućim nanokompozitima. Mala količina mineralne faze, kao i male dimenzije pojedinačnih kristala, kod karbonatom mineralizovanih uzoraka, verovatno, su posledica ograničenog rasta kristala unutar alginata usled nastanka mineralne barijere na površini mikročestica ZnCMB, koja je sprečavala difuziju cinka ka unutrašnjosti, što je imalo za posledicu inhibiciju umrežavanja alginata i deponovanje mineralne faze.

U spektru ZnCMB, primećeno je i pomeranje pika koji odgovara karboksilnoj grupi sa pozicije 1627 ka 1643 cm^{-1} , što potencijalno može ukazivati na postojanje hemijskih interakcija između inkorporirane karbonatne mineralne faze i alginata. Slični rezultati su zabeleženi i prilikom mineralizacije alginata kalcijumovim solima (Xie i sar., 2010) i objašnjeni su formiranjem veza između metala i karboksilne grupe polimera. Postojanje hemijskih veza između konstituenata nanokompozita je, verovatno, značajan faktor za regulaciju formiranja i rasta kristala minerala u prisustvu alginata.

Rezultati FTIR analize su potvrdili prisustvo Zn-mineralnih faza unutar nanokompozita i, na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da između mineralne faze i polimera postoje hemijske interakcije koje su aktivno uključene u proces mineralizacije.

4.1.1.2.3. Ramanska spektroskopija

Metoda Ramanske spektroskopije se smatra komplementarnom FTIR spektroskopiji u identifikaciji molekula, jer se pomoću FTIR analize preciznije određuju bočne grupe, dok se Raman koristi za analizu skeleta molekula. Ramanski spektri slobodnih mineralnih precipitata, nemineralizovanih i Zn-mineralizovanih uzoraka su prikazani na **Slici 4.4**.



Slika 4.4. Ramanski spektri: (a) ZnCMB i (b) ZnPMB.

Ramanski spektar nemineralizovanih uzoraka (ZnAMB) je u saglasnosti sa literaturnim podacima za alginat (Campos-Vallette i sar., 2010): najizraženije su trake na 2940 cm⁻¹ usled C-H vibracija i trake karakteristične za uronske jedinice (600 – 1500 cm⁻¹).

U spektrima slobodnih mineralnih precipitata uočene su trake karakteristične za Zn₅(CO₃)₂(OH)₆ (Falgayrac i sar., 2014; Hales & Frost, 2007) – ZnC (**Slika 4.4a**), odn. Zn₃(PO₄)₂(H₂O)₄ (Kouisni i sar., 2004) - ZnP (**Slika 4.4b**) što je dodatno potvrdilo identifikaciju minerala izvršenu XRD analizom.

Analizom Ramanskih spektara mineralizovanih nanokompozita, utvrđeno je da mineralizacija karbonatnom fazom nije mnogo promenila spektar dobijenog ZnCMB nanokompozita u odnosu na nemineralizovane uzorke. Naime i dalje su najizraženije trake karakteristične za alginat (**Slika 4.4a**). Nasuprot tome, u Ramanskom spektru fosfatom mineralizovanih uzoraka (ZnPMB) evidentno je bilo prisustvo traka karakterističnih za fosfate, i, čak, je bio umanjen intenzitet alginatne trake na 2940 cm⁻¹ (**Slika 4.4b**). Na

osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je formiranje fosfatne mineralne faze u prisustvu alginata, efikasnije od formiranja karbonatne mineralne faze i da rezultuje i stvaranju bolje mineralizovanih ZnPMB nanokompozita. Dobijeni rezultati su u skladu i sa SEM evaluacijom, gde je primećeno da su ZnCMB mikročestice većih dimenzija i, generalno, amorfne i slabije umrežene u odnosu na ostale uzorke.

4.1.1.3. Evaluacija karakteristika dobijenih Zn-mineralizovanih/Zn-alginatnih nanokompozita

4.1.1.3.1. Sadržaj Zn(II)

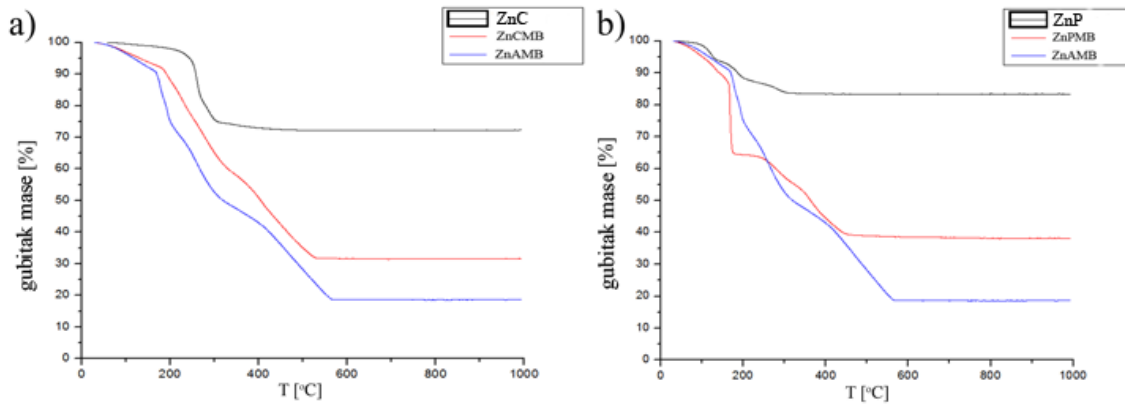
Ukupni sadržaj Zn(II) u dobijenim uzorcima, izražen u $\mu\text{mol Zn(II)}$ po g vlažnog uzorka, prikazan je u **Tabeli VI**. Prisutvo Zn-mineralne faze ima za posledicu značajno povećanje ukupnog sadržaja cinka u dobijenim nanokompozitima jer je cink sadržan i u strukturi hidrogela i u mineralnoj fazi. Takođe, uzorci mineralizovani fosfatom imaju više cinka u odnosu na uzorke mineralizovane karbonatom što može biti posledica većeg afiniteta cinkovih jona ka fosfatnom anjonu.

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa literaturom. Naime, Bassett i sar. (2015) su pokazali da se sadržaj bakra u alginatu može značajno povećati inkorporiranjem minerala na bazi bakra u alginatni matriks.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se totalni sadržaj cinka u biomaterijalima može modulirati bilo promenom formulacije materijala (introdukcijom Zn-mineralne faze), bilo izborom specifičnog mineralnog prekursora (Na_2HPO_4 ili Na_2CO_3).

4.1.1.3.2. TGA

Termalna stabilnost materijala je izuzetno bitna sa tehnološkog aspekta, uzimajući u obzir da procesuiranje i sinteza materijala često zahtevaju primenu visokih temperatura. Metodom termogravimetrijske analize ispitana je termalna stabilnost dobijenih uzoraka. Na **Slici 4.5** su prikazane TGA krive slobodnih minerala, nemineralizovanih i Zn-mineralizovanih, nanokompozitnih uzoraka.



Slika 4.5. Termogravimetrijska analiza: (a) ZnCMB; (b) ZnPMB.

TG analiza nemineralizovanih (ZnAMB) uzoraka pokazuje četiri faze gubitka mase, što je u skladu i sa literaturnim podacima (Said & Hassan, 1993): 1) $T \leq 100$ °C, gubitak mase od ~ 9 % usled gubitka adsorbovane vode; 2) $100 \leq T \leq 200$ °C, gubitak mase od ~16 % usled dehidratacije; 3) $200 \leq T \leq 400$ °C, degradacija alginata (~33 % gubitak mase) iza koga ostaje Zn-karbonat; i 4) od 404 do 560 °C, dalja razgradnja Zn-karbonata procesom kalcinacije do ZnO i CO₂, praćena dodatnim gubitkom mase od oko 24 %.

Slobodna karbonatna mineralna faza (ZnC) pokazuje dve faze termalne degradacije, desorpcija vode i kalcinacija do ZnO i CO₂, dok je slobodna fosfatna mineralna faza (ZnP) ostala stabilna do 900 °C, sa manjim gubitkom mase koji je bio posledica gubitka površinski adsorbovane vode, strukturne vode i kalcinacije karbonatnih nečistoća zaostalih tokom sinteze (Daniel da Silva i sar., 2007).

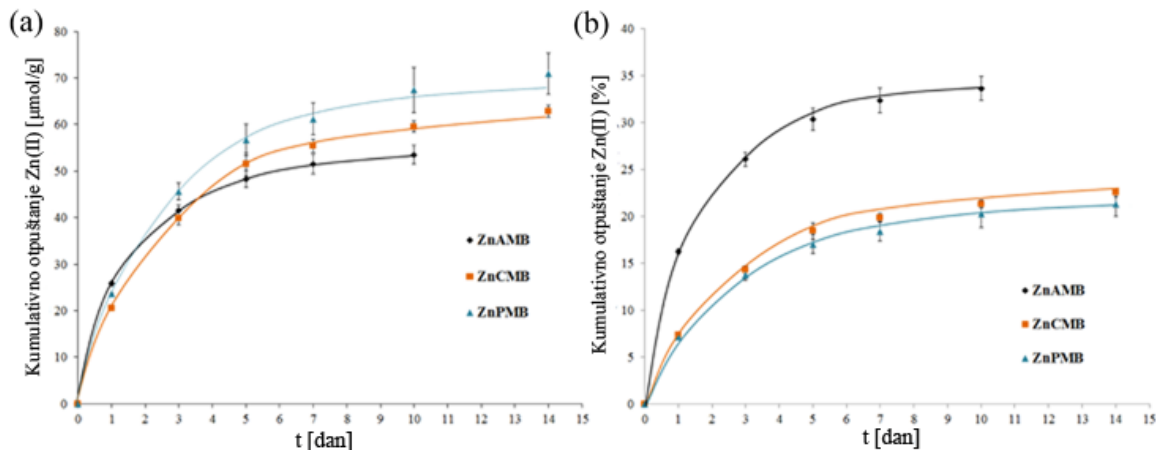
Upoređujući TGA krive nanokompozita i nemineralizovanih uzoraka, može se primetiti da prisustvo Zn-mineralne faze u velikoj meri modifikuje termička svojstva dobijenih nanokompozita. Obe formulacije nanokompozita su ispoljile slične degradacione profile do određene temperature: inicijalni gubitak mase usled desoprcije vode ($T \leq 200$ °C), praćen degradacijom organske faze do Zn-karbonata ($200 \leq T \leq 340$ °C) i kalcinacijom Zn-karbonata do ZnO i CO₂ ($340 \leq T \leq 550$ °C). Od ove tačke, Zn-karbonatna faza iz ZnCMB je nastavila da se degradira, doprinoseći ukupnom gubitku mase, dok je Zn-fosfat iz ZnPMB, ostao stabilan. Različiti termalni degradacioni profili su imali za posledicu i različite rezidualne mase: ZnAMB ~18 %, ZnCMB ~31 % i ZnPMB ~39 %. Takođe je

primećeno da u TGA krivi fosfatom mineralizovanih uzoraka postoji nagli gubitak mase na temperaturi od oko 200 °C. Ova pojava je zabeležena u literaturi (Horga i sar., 2007) i može se objasniti potencijalnom intenzivnom i naglom termalnom degradacijom organske faze u prisustvu prelaznih metalnih jona, koji deluju kao katalizatori oksidativnih procesa. Sličan fenomen je zabeležen prilikom termalne degradacije alginatnih nanokompozita sa inkorporiranom bakarnom mineralnom fazom (Bassett i sar., 2015).

Na osnovu rezultata TG analize određena je količine mineralne faze u mineralizovanim uzorcima polazeći od pretpostavke da TGA kriva nanokompozita predstavlja kombinaciju TGA kriva slobodne mineralne faze i nemineralizovanih uzoraka (Xie i sar., 2010). Izračunati sadržaji mineralne faze u nanokompozitima različitih formulacija su prikazani u **Tabeli VI**. Može se zaključiti da je proces mineralizacije bio efikasniji u slučaju ZnPMB nanokompozita rezultujući većim sadržajem mineralne faze i cinka, generalno, što je u skladu sa rezultatima SEM, FTIR i Ramanske analize. Manji sadržaj mineralne faze u ZnCMB uzorku ide u prilog tvrdnji da su ZnCMB uzorci bili slabo umreženi i mineralizovani, sa mineralnom fazom primarno skoncentrisanom na površini mikročestica i velikim sadržajem strukturne vode.

4.1.1.3.3. Kinetika otpuštanja Zn(II)

Uzimajući u obzir, da je potencijalno bioaktivno i antimikrobno dejstvo sintetisanih biomaterijala posredovano otpuštenim jonima cinka u okolnu sredinu, izvedeni su eksperimenti ispitivanja kinetike otpuštanja Zn(II). Stabilnost i kinetika otpuštanja Zn(II) iz vlažnih nemineralizovanih i Zn-mineralizovanih alginatnih mikročestica ispitane su u statičkim uslovima, na temperaturi od 37 °C, korišćenjem medijuma za kultivaciju ćelija, DMEM. DMEM je izabran kao biološki relevantan medijum, jer sadrži brojne biomolekule (amino kiseline, vitamine, itd.), koji mogu aktivno interagovati sa biomaterijalom i direktno uticati na njegovu stabilnost ili rastvorljivost (Graddon & Munday, 1961). Kumulativni profili otpuštanja Zn(II) iz mikročestica su prikazani na **Slici 4.6**.



Slika 4.6. Kinetika otpuštanja Zn(II) iz uzoraka u DMEM na 37 °C: (a) kumulativno otpuštanje Zn(II) tokom inkubacije, izraženo u μmol Zn(II) po g vlažnih mikročestica; i (b) kumulativno otpuštanje Zn(II), izraženo u procentima u odnosu na inicijalni sadržaj Zn(II) u mikročesticama.

Na kraju inkubacionog perioda, uzorci ZnAMB, ZnCMB i ZnPMB su kumulativno otpustili: $53,5 \pm 2,0$, $62,9 \pm 1,3$, odn. $70,9 \pm 4,4$ μmol Zn(II) po g vlažnih mikročestica (**Slika 4.6a**). Na osnovu dobijenih profila otpuštanja, može se uočiti da prisustvo Zn-mineralne faze ima značajan uticaj na kinetiku otpuštanja Zn(II) i to u nekoliko aspekata:

- 1) Mineralizovani uzorci otpuštaju veću količinu Zn(II) u odnosu na nemineralizovane što se može i očekivati jer sadrže više metala. Takođe postoji razlika u profilima otpuštanja između karbonatom i fosfatom-mineralizovanih uzoraka, što je opet posledica različitog sadržaja metala (**Tabela VI**);
- 2) Posmatranjem otpuštanja tokom prvog dana (tzv. “initial burst release”), može se uočiti da su mineralizovani uzorci otpustili manju količinu metala u odnosu na nemineralizovane, verovatno usled prisustva mineralne barijere na površini mikročestica. Ovaj trend je povoljan jer je poželjno da se metali otpuštaju na kontrolisan i kontinualan način iz biomaterijala. Svako naglo povećanje koncentracije metala u okolnoj sredini, usled naglog otpuštanja veće količine metala, može potencijalno dovesti do lokalnog ili sistemskog toksičnog efekta;
- 3) Uzorci otpuštaju Zn(II) različitom brzinom u zavisnosti od formulacije (**Slika 4.6b**). Nemineralizovani uzorci su otpustili veći udeo svojih strukturnih jona ($\sim 34\%$), za

kraće vreme, što je dovelo do strukturne destabilizacije. Nasuprot tome, mineralizovani uzorci su tokom inkubacije, otpustili manji udeo Zn(II) (~24 %, odn. ~21 % za ZnCMB, odn. ZnPMB). I u ovom slučaju, za potencijalnu biomedicinsku primenu, povoljniji su sporiji profili otpuštanja iz mineralizovanih uzoraka;

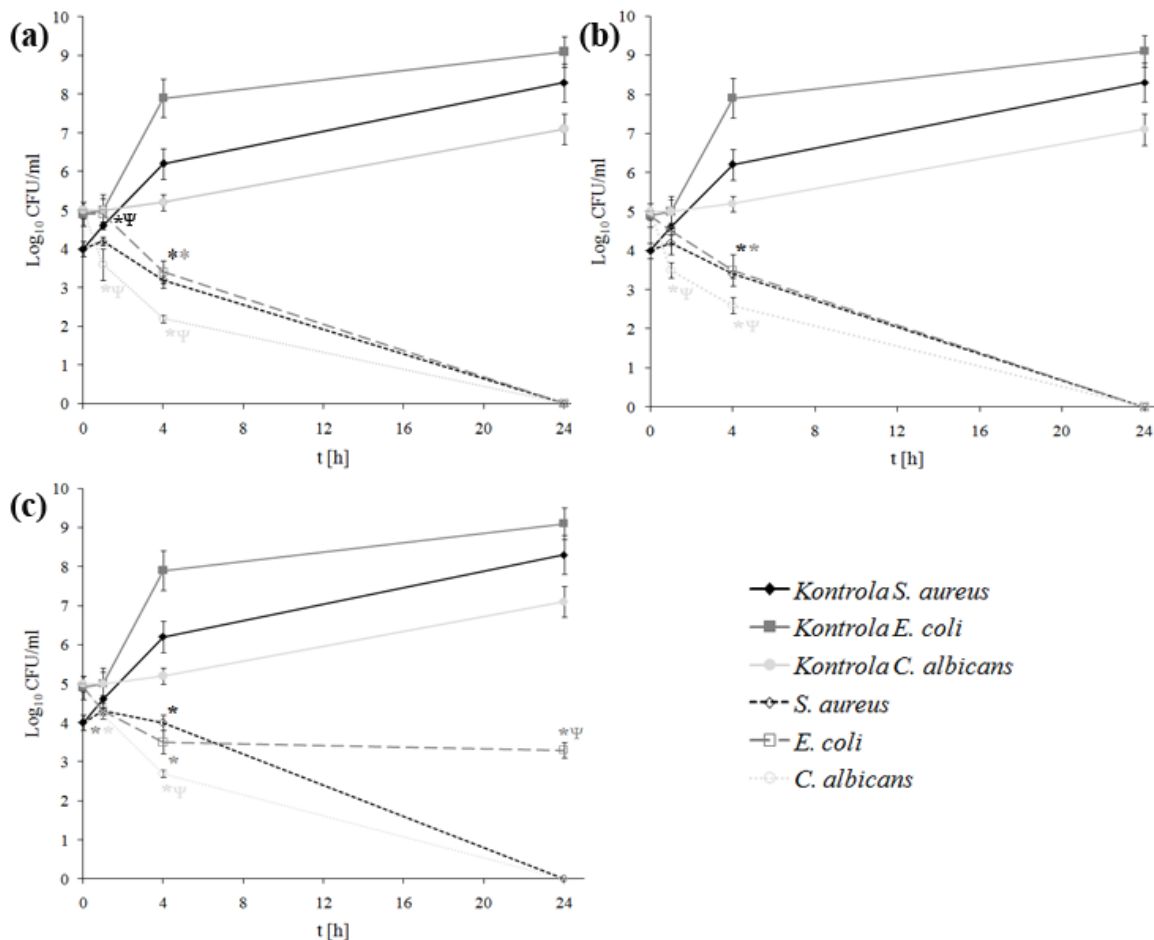
- 4) Prisustvo mineralne faze utiče na stabilnost dobijenih nanokompozita. Mineralizovani uzorci su bili stabilni tokom celog inkubacionog perioda, dok su nemineralizovani izgubili strukturni integritet nakon 10 dana (**Slika 4.6**) što je dovelo do pojave amornog taloga na dnu test tuba. Poboļšana stabilnost nanokompozitnih materijala mođe biti objašnjena time da otpušteni Zn(II) iz mineralne faze, delom posreduje i u reumrežavanju destabilisanih lanaca alginata.

Na osnovu dobijenih rezultata mođe se zaključiti da inkorporacija Zn-mineralne faze značajno utiče na kinetiku otpuštanja Zn(II) (u kontekstu količine, brzine i inicijalnog otpuštanje cinka) i doprinosi opštoj stabilnosti dobijenih mineralizovanih nanokompozita u odnosu na nemineralizovane uzorke.

4.1.1.3.4. Antimikrobna aktivnost

U cilju ispitivanja mogućnosti primene dobijenih nanokompozita kao biomaterijala sa antimikrobnim svojstvima, evaluirana je njihova antimikrobna aktivnost modifikovanom bujon makrodilucionom metodom i korišćenjem dva bakterijska i jednog gljivičnog soja: Gram-negativna bakterija *Escherichia coli* ATCC 25922, Gram-pozitivna bakterija *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i gljivica *Candida albicans* ATCC 10231.

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti su prikazani na **Slici 4.7**.

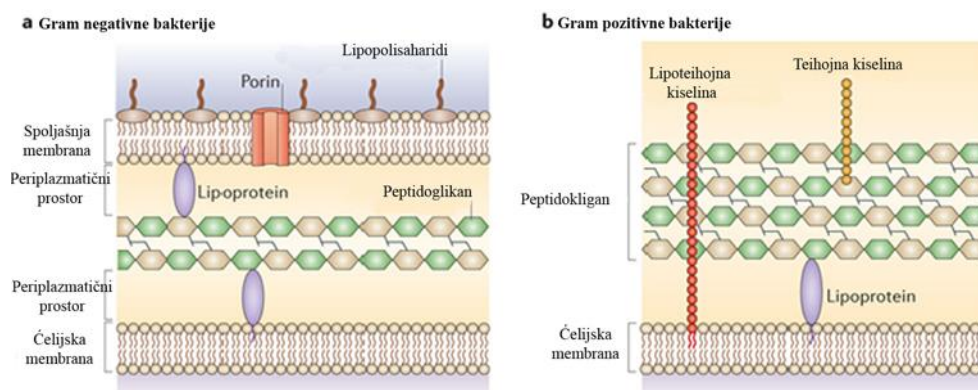


Slika 4.7. Antimikrobna aktivnost nemineralizovanih i Zn-mineralizovanih alginatnih uzoraka: (a) ZnAMB; (b) ZnCMB i (c) ZnPMB. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu su označene asteriskom,* ($*p \leq 0,05$), dok su statistički značajne razlike u okviru iste vremenske tačke, za određeni mikroorganizam označene sa psi, Ψ ($\Psi p \leq 0,05$).

Tretman *S. aureus* sa ZnAMB i ZnCMB, doveo je do smanjenja rasta tokom prva 4 h inkubacije za jednu logaritamsku jedinicu (**Slika 4.7a** i **4.7b**), dok tretman sa ZnPMB nije značajnije uticao na rast bakterija u tom periodu (**Slika 4.7c**). Nakon 24 h, potpuni antibakterijski efekat ostvaren je dejstvom svih uzoraka (**Slika 4.7**).

Tretman *E. coli* uzorcima svih formulacija, doveo je do postepenog smanjenja broja aktivnih ćelija tokom prva 4 h (**Slika 4.7**). Nakon 24 h, potpuno biocidno dejstvo ostvareno je sa tretmanom ZnAMB i ZnCMB (**Slika 4.7a** i **4.7b**), dok je tretman sa ZnPMB imao samo bakteriostatički efekat (**Slika 4.7c**). Ova razlika u osetljivosti na antibakterijsko

dejstvo Zn(II) između Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija uslovljena je razlikom u građi bakterijskog ćelijskog zida (Soderberg i sar., 1989). Gram negativne bakterije poseduju kompleksan ćelijski zid koga čine peptidoglikanski sloj i spoljšnja membrana sa lipopolisaharidima (**Slika 4.8a**), dok je kod Gram pozitivnih on izgrađen samo od debelog sloja peptidoglikana sa lipoteihojnom kiselinom (**Slika 4.8b**) (Brown i sar., 2015). Smatra se da na ćelijskom zidu Gram pozitivnih bakterija postoje specifični biomolekuli koji omogućavaju interakciju sa jonima cinka i povećavaju afinitet ka njima, kao i da je neto negativno naelektrisanje Gram pozitivnih bakterija manje u odnosu na Gram negativne, što olakšava penetraciju ROS (Sonohara i sar., 1995). Takođe, deblji i kompleksnije građen zid Gram negativnih bakterija, verovatno, deluje odbrambeno, obezbeđuje rezistenciju na ROS i sprečava penetraciju kako jona tako i nanočestica (Russell, 2003).



Slika 4.8. Građa ćelijskog zida: (a) Gram negativne i (b) Gram pozitivne bakterije (Brown i sar., 2015).

Potencijalan uzrok slabijeg antibakterijskog dejstva fosfatom mineralizovanih uzoraka u slučaju *E. coli* i pored većeg sadržaja cinka (**Tabela VI**), može biti slabija rastvoljivost Zn-fosfata u prisustvu metabolita *E. coli* (Fasim i sar., 2002).

Testirani uzorci su pokazali najjače antimikrobno dejstvo u suspenziji *C. albicans*. Već posle prvog sata, zapažena je izražena inhibicija rasta gljivice pri tretmanu sa ZnAMB i ZnCMB. Nakon 4 h svi uzorci su imali sličan antimikrobni efekat, dok je nakon 24 h ostvareno potpuno biocidno dejstvo.

Dobijeni rezultati su pokazali da i nemineralizovani i mineralizovani, nanokompozitni uzorci pokazuju snažno antimikrobno dejstvo i kao takvi se potencijalno mogu primenjivati u biomedicini. Takođe, u saglasnosti su sa literaturnim podacima koji se odnose na antimikrobnu aktivnost biomaterijala koji sadrže cink kao strukturnu i funkcionalnu komponentu. Tako su se nanokompoziti na bazi alginata i nanočestica ZnO, dobijeni *in situ* sintezom ZnO unutar alginatnog matriksa, pokazali izuzetno efikasnim u eliminaciji kako *S. aureus*, tako i *E. coli* (Trandafilovic i sar., 2012), dok su hitozan/hidroksiapatit/Zn nanokompoziti, razvijeni kao nosači za tkivno inženjerstvo kosti, pored antimikrobnog, imali i bioaktivno, osteoinduktivno djestvo (Tripathi i sar., 2012). Vasile i sar. (2014) su razvili kompozite na bazi hitozana sa ZnO i gentamicinom koji su pokazali izuzetnu antimikrobnu aktivnost, posredovanu sinergističkim dejstvom cinka i gentamicina, prema *S. aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*. Takođe i sami Zn-alginati, dobijeni internim (Straccia i sar., 2015) ili eksternim (Qin, 2008) geliranjem, eksprimiraju značajan antimikrobni potencijal.

4.2. Bioaktivni filmovi na bazi cinka, minerala cinka, alginata i agara

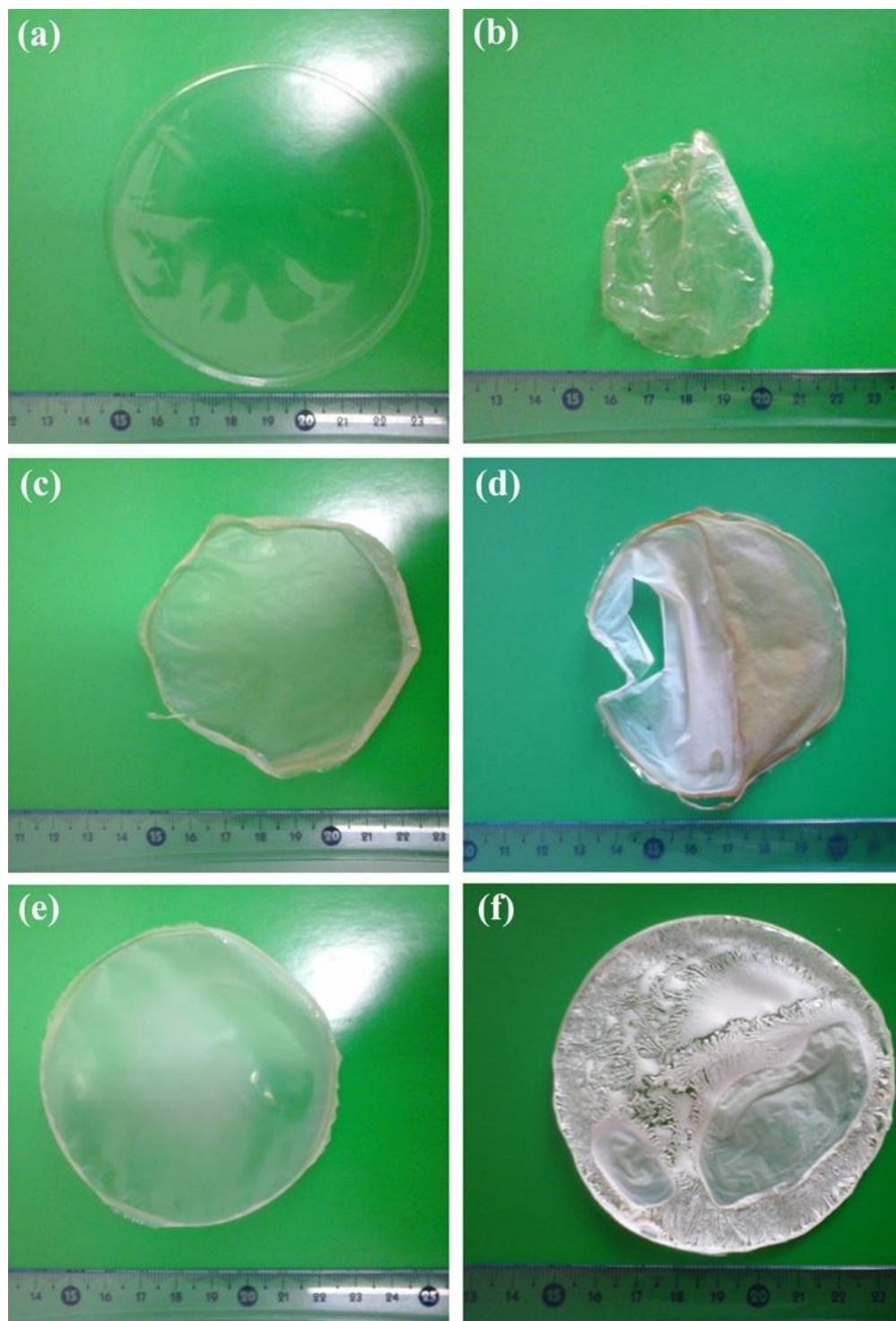
U ovom poglavlju je opisana sinteza i karakterizacija Zn-mineralizovanih materijala na bazi alginata ili agar-agara, u formi filmova sa potencijalnom primenom u biomedicini ili industriji pakovanja hrane.

4.2.1. Zn-mineralizovani Zn-alginatni filmovi

Primena alginata, kako za tretman povređenih tkiva i generalno u antimikrobnim aplikacijama, olakšana je ukoliko je sam materijal tj. alginat dobijen u obliku filmova. Filmovi mogu relativno lako da se nanese na povređeno tkivo, ili se pak mogu koristiti kao antimikrobni filmovi preko proizvoda koje treba zaštititi od neželjenog dejstva mikroorganizama.

Nanokompozitni filmovi su dobijeni rehidracijom i eksternim geliranjem osušenih alginatnih filmova sa mineralnim prekursorima u rastvoru cink nitrata. Cilj je bio da se dobiju nanokompozitni alginatni filmovi koji bi, zahvaljujući dodatnoj mineralnoj fazi, imali bolje karakteristike i antimikrobna svojstva. Međutim, nakon geliranja, precipitacije mineralne faze i naknadnog sušenja na sobnoj temperaturi, dobijeni filmovi su u velikoj meri izgubili morfološka svojstva koja su imali pre samog geliranja i formiranja Zn-minerala.

Pre geliranja, svi filmovi su bili relativno kompaktni i u velikoj meri su zadržali oblik posude u kojoj su izliveni pre sušenja. Primećeno je da je prisustvo mineralnih prekursora (natrijum karbonata za Zn-karbonat mineralizovane i natrijum hidrogenfosfata za Zn-fosfat mineralizovane nanokompozite) dovelo do smanjenja transparentnosti i delimične kontrakcije filmova nakon sušenja (**Slika 4.9a, 4.9c i 4.9e**). Najveće skupljanje je primećeno kod filmova sa karbonatnim prekursorom. S druge strane, kontrolni Na-alginatni film je u potpunosti zadržao svoj oblik nakon sušenja uz izraženu transparentnost, što je u saglasnosti sa već objavljenim literaturnim podacima za fizička svojstva alginatnih filmova (Paula i sar., 2015) i činjenicom da polisaharidi imaju dobar kapacitet za formiranje filmova (Rhim & Ng, 2007).



Slika 4.9. Opšti prikaz filmova na bazi alginata: (a) Na-alginat; (b) Zn-alginat; (c) film Na-alginata sa karbonatnim prekursorom; (d) nanokompozitni Zn-karbonat/Zn-alginatni film; (e) film Na-alginata sa fosfatnim prekursorom i (f) nanokompozitni Zn-fosfat/Zn-alginatni film.

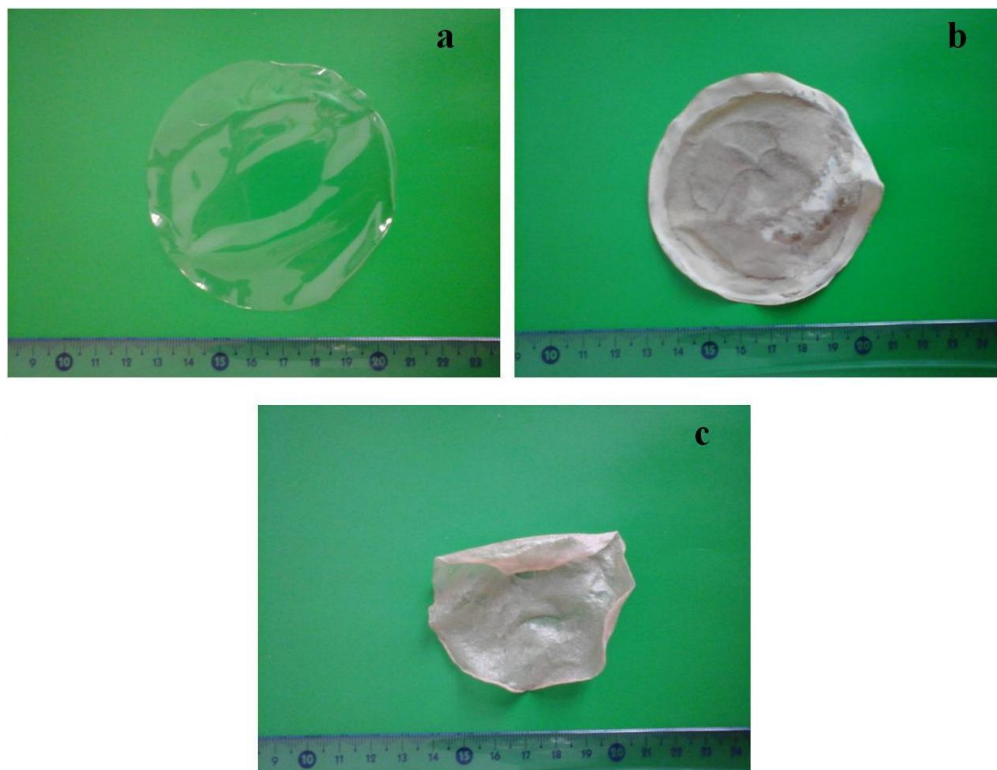
Međutim, nakon geliranja i sušenja, filmovi su u velikoj meri izgubili oblik i došlo je do nekontrolisanog skupljanja i gubitka oblika. Šta više, kod filmova sa mineralnim prekursorima (**Slika 4.9d** i **4.9f**) nakon geliranja i sušenja je došlo do cepanja filmova i pojave velikih šupljina u strukturi, što je sa aspekta primene ovakvih filmova kao antimikrobnih sredstava neprihvatljivo. Pored toga, formirana mineralna faza je uticala na boju krajnjih filmova koji su postali beli, dok su Zn-alginatni filmovi, generalno, ostali prozirni uz manji gubitak transparentnosti (**Slika 4.9b**). Osnovni problem koji se javlja kod formiranja filmova na bazi alginata je interakcija gelirajućeg agensa i alginata, što za posledicu ima smanjenje tj. skupljanje dobijenih formi, filmova u ovom slučaju. Pojava skupljanja filmova i gubitka oblika se javlja nakon sušenja, dok su vlažni gelirani filmovi pre sušenja relativno kompaktni.

Pojava kontrakcije i destabilizacije dobijenih filmova nakon umrežavanja alginata i formiranja mineralne faze može se objasniti eksternim procesom geliranja i difuzionim limitacijama na granici rastvor za geliranje-film kao i artefaktom usled sušenja na vazduhu. Alginat gelira tj. formira stabilne hidrogelove u kontaktu sa dvovalentnim katjonima što za posledicu ima približavanje alginatnih lanaca i skupljanje gelova – sinerezis (Donati & Paoletti, 2009). Prilikom sušenja na vazduhu, usled velikog površinskog napona vode, dolazi do deformacije alginatne mreže unutar hidrogela, što ima za posledicu deformaciju uzorka (Zn-alginatnih filmova). Uzimajući u obzir da su umrežavanje alginata i formiranje mineralne faze dinamički i simultani procesi koji su posredovani jonima cinka, prilikom rehidracije i difundovanja Zn(II) iz rastvora za geliranje u strukturu filma, na samoj površini se javlja barijera od precipitirane mineralne faze i umreženog alginata koja otežava dalju difuziju pozitivno naelektrisanog Zn(II) u unutrašnjost filma i inhibira stvaranje nanokompozita. Kao rezultat, nakon izlaganja rastvoru za geliranje, dobijaju se rehidratirani, ali neuniformni nanokompozitni filmovi, sa mineralnom fazom primarno skoncentrisanom na površini i središnjim, negeliranim delom sa velikim sadržajem vode. Uzimajući u obzir činjenicu da se sa postojećim formulacijama na bazi Na-alginata i mineralnih prekursora nisu dobili filmovi odgovarajućih svojstava, prešlo se na sintezu filmova na bazi agara.

4.2.2. Zn-mineralizovani nanokompozitni filmovi na bazi agara

4.2.2.1. Zn-mineralizovani agarni filmovi dobijeni sa naknadnom sintezom mineralne faze

Agar je korišćen kao osnovni materijal za dobijanje mineralizovanih filmova. Sinteza se sastojala iz faze formiranja agarnog filma sa mineralnim prekursorom, dok je u drugoj fazi vršeno formiranje finalne mineralne faze putem kontakta filma i rastvora cink nitrata. Dobijeni filmovi, nakon sinteze mineralne faze i sušenja, su prikazani na **Slici 4.10**.



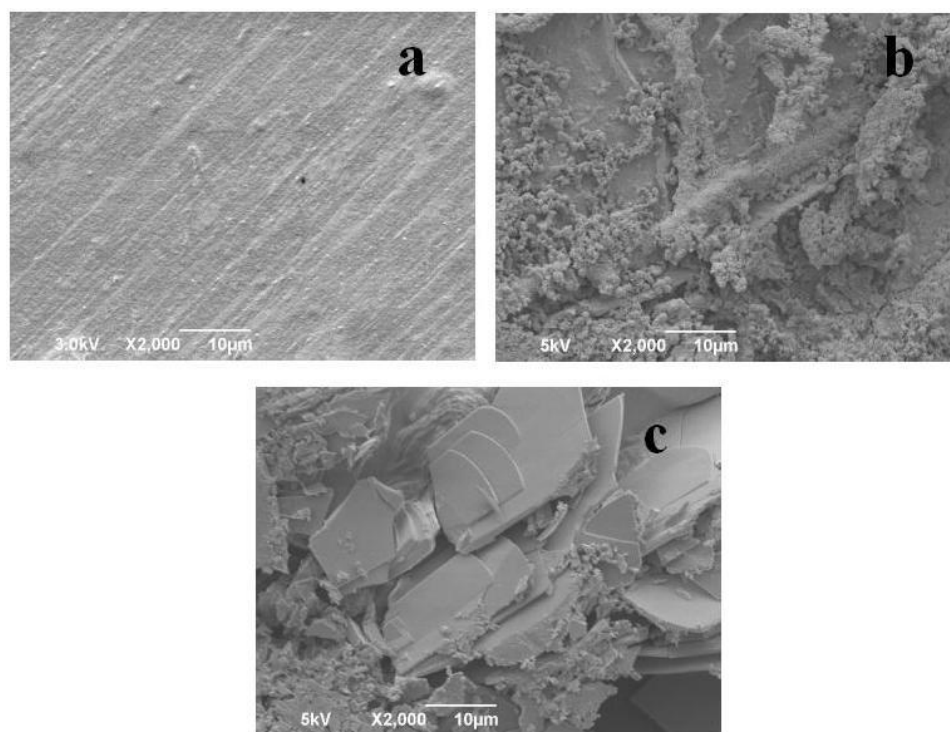
Slika 4.10. Filmovi na bazi agara, dobijeni metodom naknadne sinteze mineralne faze: (a) kontrolni, nemineralizovani agarni film; (b) nanokompozitni agarni film sa karbonatnom mineralnom fazom; c) nanokompozitni agarni film sa fosfatnom mineralnom fazom.

Dobijeni nanokompozitni filmovi su pokazali značajnu promenu u obliku nakon formiranja mineralne faze i sušenja (**Slika 4.10**). Ova promena se pre svega ogledala u kontrakciji filma sa mineralnom fazom nakon sinteze. Pored toga, promene su uočene i tokom pripreme mešavine mineralnih prekursora i agara. Po svemu sudeći, mineralna faza

remeti proces formiranja filmova, verovatno ometajući prostorni raspored molekula polisaharida tj. agara, ali i ometajući kapilarne procese prilikom sušenja filmova.

Takođe, došlo je do promene boje rastvora sa mineralnim prekursorima: od providne i blago opalescentne tečnosti u braon (sa karbonatnim prekursorom), odnosno žutu (sa fosfatnim prekursorom). Ova pojava je, najverovatnije, uzrokovana visokim temperaturama prilikom zagrevanja i sterilizacije materijala. Nakon formiranja mineralne faze, filmovi su zadržali boju koju su dobili prilikom formiranja inicijalnog filma sa prekursorima. Kao i u slučaju alginatnih filmova, usled eksternog geliranja, formiranje mineralne faze se primarno odvijalo na površini filmova. Ova lokalna precipitacija minerala na površini filmova se uočavala u vidu beličastih do braon naslaga.

Da se zaista radi o mineralizovanoj fazi na površini filmova, potvrđeno je SEM mikroskopijom (**Slika 4.11**).



Slika 4.11. SEM mikrografije površine filmova na bazi agara: (a) kontrolni, nemineralizovani agarni film; (b) mineralizovani agarni film sa karbonatnom mineralnom fazom; i (c) mineralizovani agarni film sa fosfatnom mineralnom fazom.

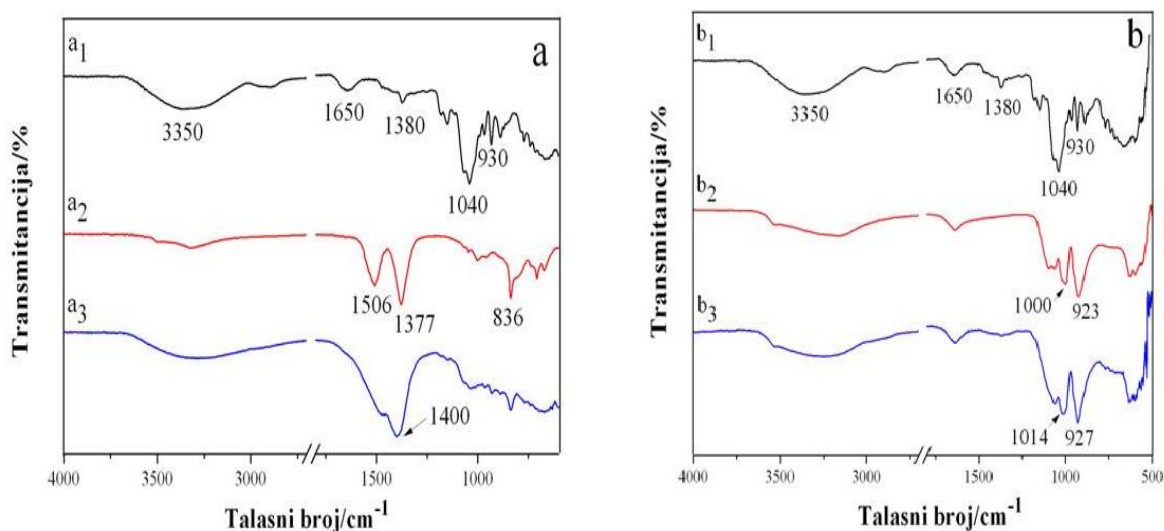
Na **Slici 4.11a** je prikazana SEM fotografija površine nemineralizovanog agarnog filma. Površina ovog filma je relativno glatka, bez vidljivih pukotina. Međutim, nakon formiranja mineralne faze, kao što je već rečeno, dolazi do morfoloških promena kod mineralizovanih filmova i to kako na makroskopskom, tako i na mikroskopskom nivou.

Na površini agarnih filmova sa karbonatnom mineralnom fazom uočene su naslage minerale faze relativno nepravilne forme minerala (**Slika 4.11b**). S druge strane, kod mineralizovanih agarnih filmova sa fosfatnom mineralnom fazom je uočeno formiranje pločastih mineralnih naslaga (**Slika 4.11c**). Iz prikazanih SEM mikrografija, jasno je da se mineralizacija odvija nepravilno, tj. primarno na površini filmova, dok je mineralizacija po celoj strukturi filmova sekundarni proces, u kome učestvuje preostala količina neizreagovalog cink nitrata i mineralnih prekursora zarobljenih u unutrašnjosti agarnog filma.

Površinski precipitirana mineralna faza ispitana je i metodom ATR-FTIR, gde je za analizu uzima mala površina uzorka tj. filma, pri čemu je mogućnost dubinske analize limitirana. Rezultati ATR-FTIR analize nemineralizovanih i mineralizovanih agar filmova su prikazani na **Slici 4.12**. Radi olakšavanja identifikacije i uporedivosti, ATR-FTIR spektri nemineralizovanih agarnih filmova i slobodnih mineralnih precipitata su prikazani uporedo sa spektrima mineralizovanih filmova.

Dobijeni spektri nemineralizovanih agarnih filmova su generalno u saglasnosti sa spektrima koji se mogu naći u literaturnim podacima. Dominantne trake koje su identifikovane u ovim uzorcima (**Slika 4.12a** a₁spektar i **Slika 4.12b** b₁spektar) su: široka traka na oko 3350cm⁻¹ (-OH vibracije), ~2900cm⁻¹ (C-H vibracije), kao i traka na 930cm⁻¹ (C-O vibracije) (Yang et al., 2014). Široka i intenzivna traka u opsegu 1090 – 1000 cm⁻¹, najverovatnije, potiče od C-O-C i C-O vibracija i generalno je prisutna u FTIR spektrima polisaharida (Singh i sar., 2009). Ostale trake koje su uočene u ATR-FTIR spektru nemineralizovanih agarnih filmova su na oko 1650cm⁻¹ (C-C) i ~1380cm⁻¹ (C-H) (Lam i sar., 2012). U ATR-FTIR spektru slobodne cink karbonatne faze se mogu pre svega uočiti trake koje najverovatnije potiču od prisustva karbonatne grupe (**Slika 6a₂**) (Haq & Azad, 2012).

Slobodna cink fosfatna mineralna faza (**Slika 4.12b** b₂spektar) generalno pokazuje trake koje najverovatnije potiču od prisustva PO₄³⁻ grupe (Jung et al., 2009).



Slika 4.12. ATR-FTIR spektri nemineralizovanih i mineralizovanih agarnih filmova dobijenih metodom naknadne sinteze mineralne faze: (a) a₁-nemineralizovani agarni film; a₂-slobodna cink karbonatna mineralna faza; a₃-mineralizovani agarni film sa cink karbonatnom mineralnom fazom; (b) b₁-nemineralizovani agarni film; b₂-slobodna cink fosfatna mineralna faza; b₃-mineralizovani agarni film sa cink fosfatnom mineralnom fazom.

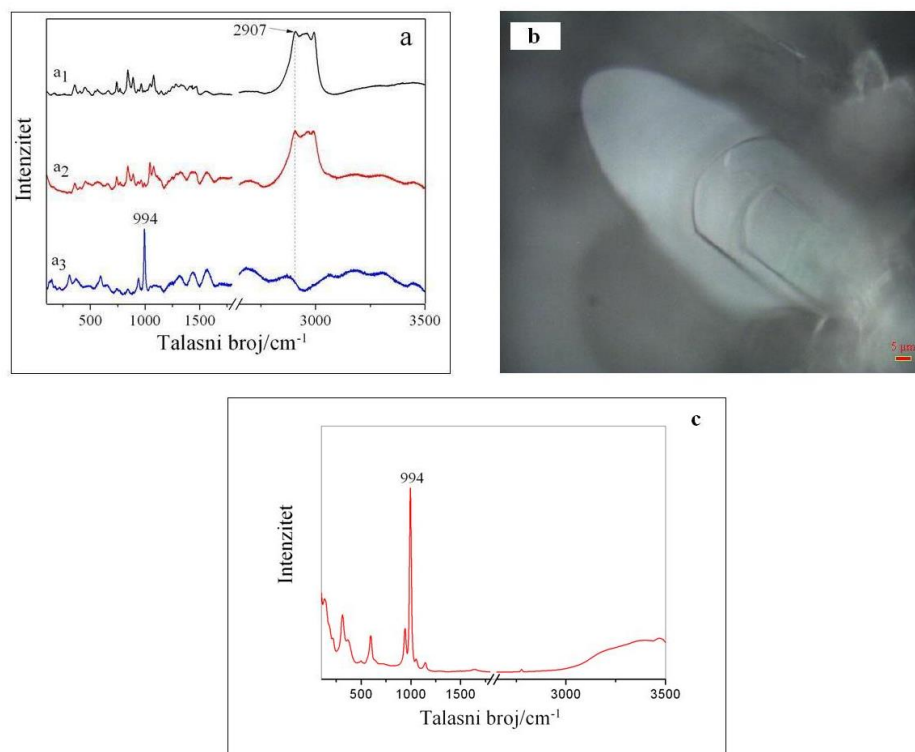
Međutim, nakon formiranja mineralne faze u prisustvu agara, došlo je do određenih pomeranja u pozicijama traka. Naime, trake kod filma mineralizovanog sa cink karbonatnom mineralnom fazom su pokazale pomeranje u poziciji, pri čemu se traka na 1506 cm⁻¹ (karakteristična za slobodne karbonatne minerale) ne može jasno uočiti kod mineralizovanog filma (**Slika 4.12a** a₃spektar), S druge strane, promene u poziciji traka su uočene i kod mineralizovanog agarnog filma sa fosfatnom mineralnom fazom (**Slika 4.12b** b₃ spektar).

Kod oba mineralizovana agarna filma je primetno i odsustvo karakterističnih traka koje bi se povezale sa prisustvom agara kao nosećeg materijala u sistemu.

Rezultati ATR-FTIR analize ukazuju na sledeće pojave koje se javljaju prilikom sinteze mineralizovanih agarnih filmova naknadnim formiranjem mineralne faze. Prvo, po svemu sudeći, mineralne faze se formiraju prvenstveno na površini agarnih filmova, čineći neku vrstu kore-omotača oko agara. Ovo je verovatno i razlog odsustva karakterističnih traka agara u ATR-FTIR spektru mineralizovanih agaranih filmova. Kao što je napomenuto, ovaj mineralni omotač nije stabilan i relativno se lako uklanja sa površine filmova. Drugo, promene u spektrima samih mineralnih faza ukazuju da prilikom njihovog formiranja, odnosno mineralizacije agarnih filmova, dolazi do različitih interakcija mineralnih komponenti i agara, što je dodatno pojačano visokim temperaturama koje su primenjivane prilikom sinteze filmova. Bitno je napomenuti da su visoke temperature u pojedinim fazama pripreme agara neophodne kako bi se dobio film željenih svojstava.

Svojstva agarnih filmova su ispitana i Ramanskom spektroskopijom/mikroskopijom. Površina uzoraka je prvo ispitana mikroskopski, a zatim je vršena analiza uočenih formi na površini filmova Ramanskom spektroskopijom. Dobijeni rezultati su dalje poređeni sa spektrom čiste agarne i fosfatne mineralne faze. Pokušaj da se dobiju Ramanski spektri agarnih filmova mineralizovanih sa karbonatnom mineralnom fazom nisu uspeali zbog izražene fluorescencije koja je onemogućavala dobijanje signala potrebnog kvaliteta.

Na **Slici 4.13** su prikazani Ramanski spektri uzoraka mineralizovanih fosfatom. Kao što se može videti na **Slici 4.13a**, spektar a_1 , Ramanski spektar nemineralizovanog agarnog filma je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Pereira i sar., 2003). Prema istim autorima, trake u opsegu $500 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ su karakteristične za agar. Pored toga, u Ramanskom spektru agarnog filma dominira široka traka na 2907 cm^{-1} koja verovatno potiče od C-H veze u strukturi ovog polisaharida. Ova traka je dalje korišćena za analizu mineralizovanih agarnih filmova, kao potvrda prisustva agara jer je bilo za očekivati da trake manjeg intenziteta u opsegu $500 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ budu preklopljene trakama koje potiču od fosfatne mineralne faze.



Slika 4.13. Ramanski spektri površine agarnih filmova mineralizovanih fosfatom: (a) a_1 agarni film, a_2 agarni film nakon mineralizacije (bez vidljive fosfatne mineralne faze), a_3 izdvojena fosfatna mineralna faza na površini agarnog filma; (b) mikrografija slobodne fosfatne mineralne faze na površini agarnog filma koja odgovara spektru a_3); i c) Ramanski spektar čiste (slobodne) fosfatne mineralne faze.

Analizom površine mineralizovanih agarnih filmova svetlosnim mikroskopom (koji je sastavni deo sistema za Ramansku spektroskopiju), uočeno je pre svega izraženo formiranje fosfatne mineralne faze na površini mineralizovanih agarnih filmova (**Slika 4.13b**). Ovakva struktura fosfatne mineralne faze kod mineralizovanih agarnih filmova je već opisana kod rezultata za SEM mikroskopiju.

Kao to se može videti na **Slici 4.13a**, spektri a_2 i a_3 , Ramanski spektri agara i izdvojene fosfatne mineralne faze se generalno poklapaju sa spektrima čistih komponenti. Ovo implicira da se ove dve faze formiraju nezavisno i da agar, najverovatnije, ne učestvuje značajno u formiranju slobodnih fosfatnih kristala na svojoj površini pri sintezi mineralizovanih agarnih filmova. Identifikacija fosfatne mineralne faze je izvršena na bazi

spektra čiste fosfatne mineralne faze sa karakterističnim maksimumom na 994 cm^{-1} (**Slika 4.13c**).

Rezultati sinteze mineralizovanih agarnih filmova sa karbonatnom i fosfatnom mineralnom fazom postupkom naknadne sinteze mineralnih faza pokazuju da se dobijaju filmovi neujednačenih morfoloških karakteristika, sa jasno izdvojenim mineralnim fazama. Izdvajanje mineralne faze na površini filmova je bilo više izraženo u slučaju agarnih filmova mineralizovanih fosfatima. Dalje, mineralne faze su se odvajale sa površine filmova kako tokom sinteze, tako i nakon sušenja. Ovo je uslovalo dobijanje filmova sa neujednačenim hemijskim sastavom.

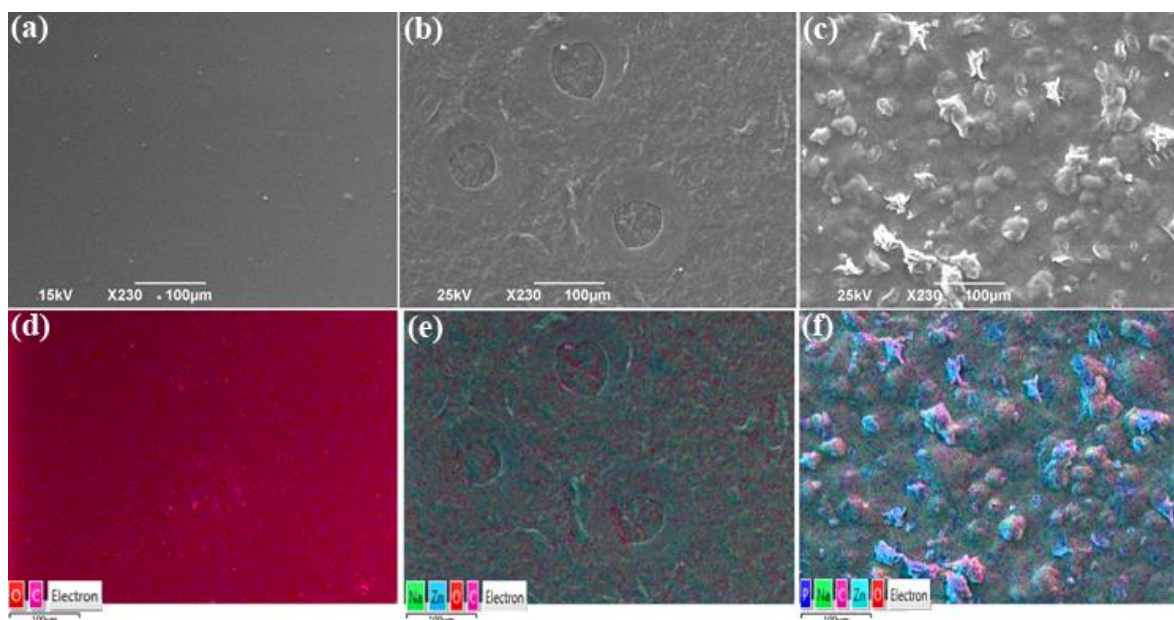
Posmatrajući potencijalnu primenu mineralizovanih agarnih filmova dobijenih ovom metodom, može se zaključiti da oni u velikoj meri ne odgovaraju zahtevima koji ovakvi filmovi moraju da ispune. Loša morfološka svojstva ovih filmova, tj. njihovo nekontrolisano skupljanje nakon sinteze, limitira njihovu potencijalnu aplikaciju. Iz gore navedenih razloga, izvršena je promena u proceduri sinteze mineralizovanih agarnih filmova, pri čemu se mineralna faza dobija u rastvoru agara, a ne nakon formiranja filma. Rezultati ovih oglada dati su u narednom poglavlju.

4.2.2.2. Zn-mineralizovani agarni filmova dobijeni sa simultanom sintezom mineralne faze

Zn-mineralizovani nanokompozitni filmovi na bazi agara uspešno su sintetisani kombinacijom *in situ* sinteze mineralne faze i metode izlivanja. Proces sinteze je zasnovan na formiranju Zn-mineralne faze unutar agarnog rastvora, pre formiranja nanokompozitnog agarnog hidrogela i sušenja do filmova. Dobijeni uzorci su okarakterisani u pogledu morfologije (SEM), karakteristika inkorporirane mineralne faze (XRD, FTIR, Raman), ukupnog sadržaja cinka (ICP-MS), mehaničkih i termičkih svojstava (TGA), transparentnosti (UV-VIS), kinetike otpuštanja Zn(II) u medijumima relevantnim za industriju pakovanja hrane i antimikrobnog potencijala. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se impregniranjem agarnih filmova sa Zn-mineralnom fazom, dobijaju nanokompozitni materijali drugačije morfologije i poboljšanih, mehaničkih, termičkih i optičkih svojstava, koji poseduju antimikrobna svojstva.

4.2.2.2.1. Morfologija

SEM mikrografije kontrolnih i nanokompozitnih uzoraka su prikazane na Slici 4.14a-c.



Slika 4.14. SEM mikrografije površine filmova dobijenih *in situ* mineralizacijom: (a) kontrolni, nemineralizovani agarni film, A; (b) mineralizovani Zn-karbonat/agar nanokompozitni film, AC; i (c) mineralizovani Zn-fosfat/agar nanokompozitni film, AP. EDS analiza: (d) A; (e) AC i (f) AP.

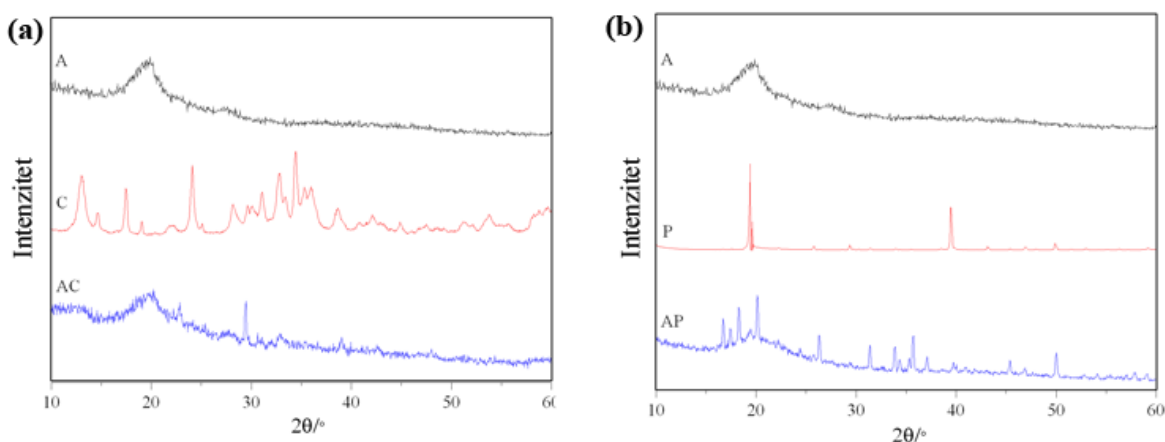
Kao što se može videti, postoji evidentna razlika u morfologiji površine između kontrolnih (**Slika 4.14a**) i nanokompozitnih uzoraka (**Slika 4.14b i c**). Kontrolni filmovi su delovali homogeno i glatko, dok je u matriksu nanokompozitnih filmova bila vidljiva inkorporirana mineralna faza. Dodatno je primećena razlika i u morfologiji između samih nanokompozita, uslovljena prisustvom različite Zn-mineralne faze: karbonatni minerali u AC uzorku su bili manjih dimenzija i uniformno distribuirani po polimernom matriksu (**Slika 4.14b**), dok su u AP uzorku fosfatni minerali obrazovali nasumično raspoređene agregate većih dimenzija (**Slika 4.14c**).

Primenom elementalne analize površine dobijenih uzoraka (EDS) potvrđeno je prisustvo različitih Zn-mineralnih faza unutar nanokompozita različitih formulacija (**Slika 4.14d-e**).

4.2.2.2. Karakterizacija inkorporirane Zn-mineralne faze u nanokompozitima na bazi agara dobijenih simultanom sintezom mineralne faze

4.2.2.2.1. XRD

Identifikacija minerala i određivanje njihove kristalne strukture je vršeno XRD analizom. Difraktogrami dobijenih nanokompozita, kontrolnih filmova i slobodnih mineralnih precipitata su prikazani na **Slici 4.15**.



Slika. 4.15. Difraktogrami: (a) A – kontrolni film, C - slobodni Zn-karbonati nastali precipitacijom u vodenom rastvoru i AC - mineralizovani Zn-karbonat/agar nanokompozitni film; (b) A – kontrolni film, P – slobodni Zn-fosfati nastali precipitacijom u vodenom rastvoru i AP - mineralizovani Zn-fosfat/agar nanokompozitni film.

Kao što je već pokazano (Poglavlje 4.1.1.2.1.), slobodni karbonatni mineralni precipitati su identifikovani kao $Zn_5(CO_3)_2(OH)_6$, sa relativno malim udjelom $ZnCO_3$ i $Zn_4(CO_3)(OH)_6$, dok se kod fosfata slobodna mineralna faza sastojala od $Zn_3(PO_4)_2(H_2O)_4$. Izračunate vrednosti veličine kristala su bile ~ 22 , odn. ~ 43 nm.

Na difraktogramu kontrolnog, agarnog filma (**Slika 4.15**) uočava se široki difrakcioni maksimum na $2\theta = 19^\circ$ koji je karakterističan za agar (Ali Arfat i sar., 2017; Freile-Pelegrin i sar., 2007). Međutim, nakon mineralizacije, došlo je do značajnih promena u spektrima dobijenih nanokompozitnih filmova usled pojave pikova karakterističnih za mineralnu fazu.

Kod filmova sa karbonatnom mineralnom fazom (AC), utvrđeno je da se mineralna faza sastojala od slabo definisanog $Zn_5(CO_3)_2(OH)_6$ uz značajno prisustvo $NaNO_3$ (**Slika 4.15a**).

Veličina kristala unutar AC nanokompozita je bila ~4 nm, što je u saglasnosti sa rezultatima veličine Zn-karbonatne faze formirane u prisustvu alginata (Poglavlje 4.1.).

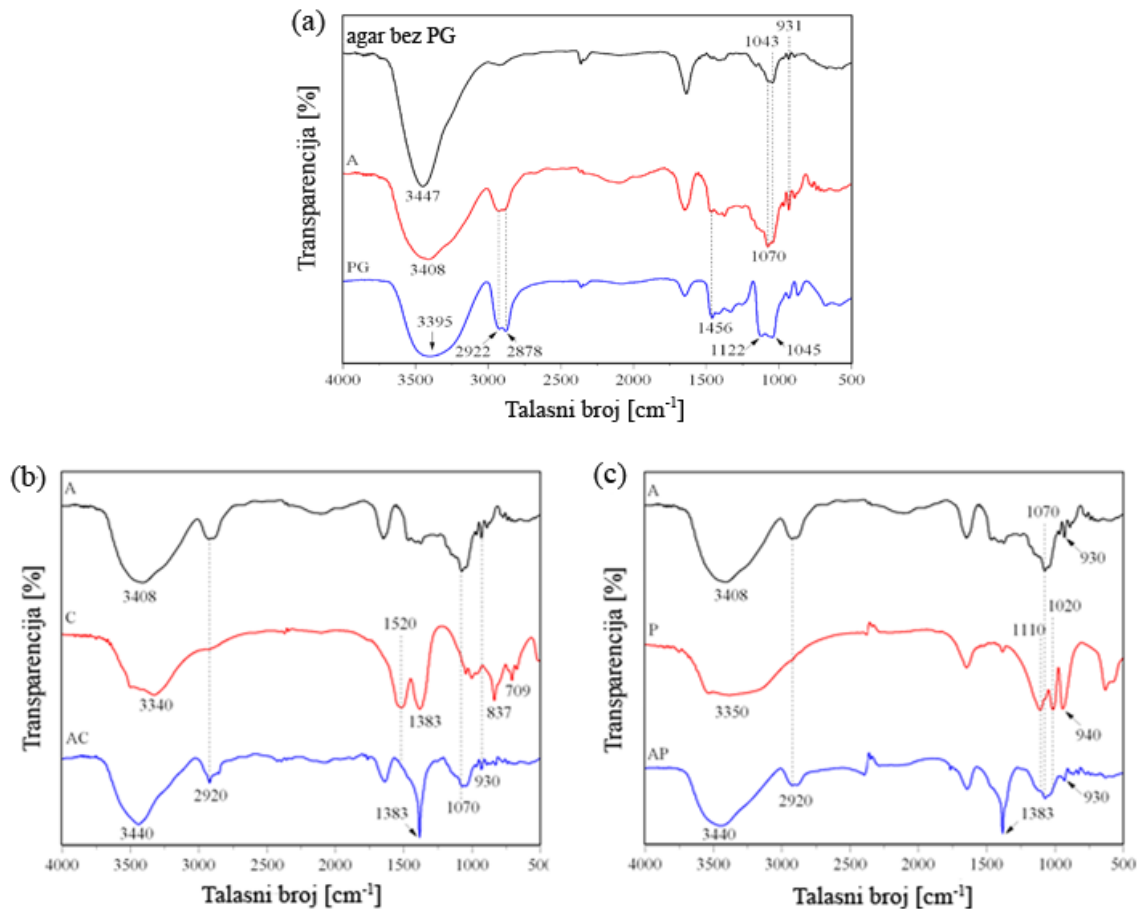
Prilikom mineralizacije agara fosfatima (uzorak AP), utvrđeno je da se minerali nalaze u obliku $Zn_3(PO_4)_2(H_2O)_4$, sa veličinom kristala od ~ 45 nm (**Slika 4.15b**).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je prisustvo agara značajno uticalo na formiranje Zn-karbonatne mineralne faze, što se ogledalo u selekciji određenog polimorfa i smanjenju dimenzija kristala za oko pet puta u odnosu na slobodne karbonatne precipitate. Nasuprot tome, fosfatni minerali nisu pokazali značajnu razliku između slobodnih mineralnih precipitata i onih nastalih u prisustvu agara.

Oaki & Imai (2003) su pokazali da je formiranje različitih kristala u prisustvu agara primarno zavisilo od poroznosti agarnog hidrogela. Naime, u gušćim delovima hidrogela, difuzija mineralnih prekursora je limitirana dovodeći do inhibicije rasta kristala i izmenjene morfologije. Kao rezultat, umesto dobro definisanih kristala su nastajali polikristalni agregati. Izostajanje ovog efekta kod fosfatom impregniranih nanokompozita može se objasniti činjenicom da je formiranje Zn-mineralne faze vršeno u rastvoru agara pre formiranja hidrogela i sušenja, što je bliže klasičnoj precipitaciji iz rastvora nego formiranju kristala u hidrogelu. Sa druge strane, u slučaju karbonatne faze, prisustvo polimernih lanaca u rastvoru je bilo dovoljno da stvori centre nukleacije za rast kristala, rezultujući u ravnomerno dispergovanim mineralima malih dimenzija unutar agarnog matriksa.

4.2.2.2.2. FTIR

FTIR spektri slobodnih mineralnih faza, kontrolnog agarnog filma i filmova sa mineralnim fazama su prikazani na **Slici 4.16**. FTIR evaluacija je izvršena kako bi se potvrdilo prisustvo mineralnih faza u agarnim filmovima i postojanje eventualnih hemijskih interakcija između komponenti nanokompozita.



Slika 4.16. FTIR spektri: (a) kontrolni agarni film bez poliglicerola; (b) AC i (c) AP.

U FTIR spektru kontrolnog agarnog filma (**Slika 4.16a**) se mogu uočiti trake koje su karakteristične za agar i to: traka na 3447 cm^{-1} (OH), $\sim 2930\text{ cm}^{-1}$ (C-H), 1070 cm^{-1} (C-O-C) i 931 cm^{-1} (C-O), (Kanmani & Rhim, 2014; Yang et al., 2014). Dodatak poliglicerola je doveo do povećanja intenziteta traka u obasti $2950 - 2850\text{ cm}^{-1}$ (**Slika 4.16a**). Takođe, traka koja potiče od vibracija OH grupa je pomeren ka nižim pozicijama (3408 cm^{-1}), što ukazuje na formiranje novih interakcija, kao što su vodonične veze, unutar agarnog filma.

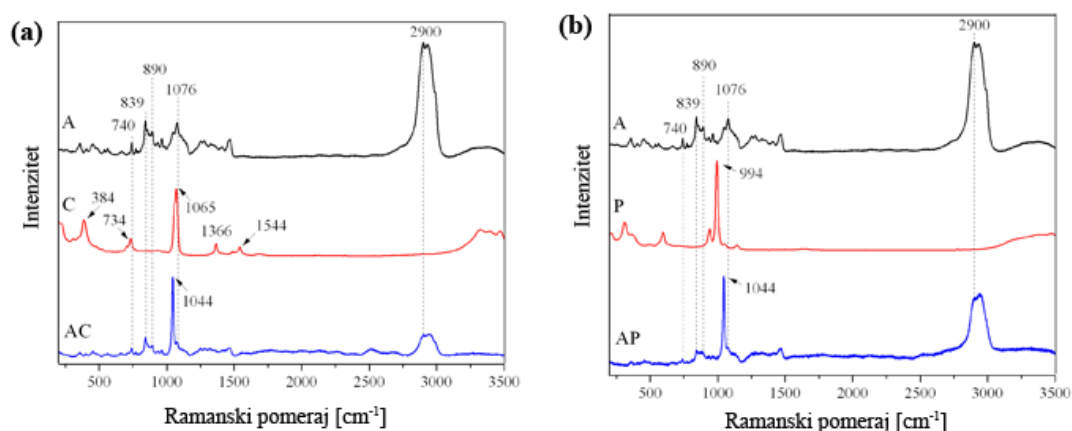
Slobodna karbonatna (C) i fosfatna (P) mineralna faza pokazuju trake koje su karakteristične za ove minerale i u saglasnosti su sa literaturnim podacima (Jung i sar., 2009; Malagurski i sar., 2017).

FTIR spektri mineralizovanih agarnih filmova su u velikoj meri slični spektru kontrolnog agarnog filma (**Slika 4.16b** i **4.16c**). Međutim, pomeranje pozicije traka koje

potiču od OH grupa ($3400 - 3450 \text{ cm}^{-1}$) potencijalno ukazuje na formiranje vodoničnih veza između mineralnih faza i polimera tj. agara. Takođe, nova traka na 1383 cm^{-1} , najverovatnije, potiče od nitratnih anjona koji zaostaju nakon formiranja mineralne faze (Singh & Rath, 2015).

4.2.2.2.3. Ramanska spektroskopija

Ramanski spektri slobodnih mineralnih precipitata, kontrolnog agarnog filma i filmova sa mineralnim fazama su prikazani na **Slici 4.17**.



Slika 4.17. Ramanski spektri: (a) AC i (b) AP.

U Ramanskom spektru kontrolnih agarnih filmova (A) uočava se nekoliko traka karakterističnih za agar: 740 cm^{-1} (usled prisustva galaktoze), 839 cm^{-1} (C-H vibracije), 890 cm^{-1} (C-H vibracije) i 1076 cm^{-1} (C-O i C-C vibracije) (Pereira i sar., 2003), dok je intenzivna traka na $\sim 2900 \text{ cm}^{-1}$, najverovatnije uzrokovana C-H vibracijama (**Slika 4.17**). Dodatak poliglicerola nije imao uticaja na spektar dobijenih kontrolnih filmova.

Objašnjenje spektara slobodnih mineralnih precipitata je dato u Poglavlju 4.1.1.2.3.

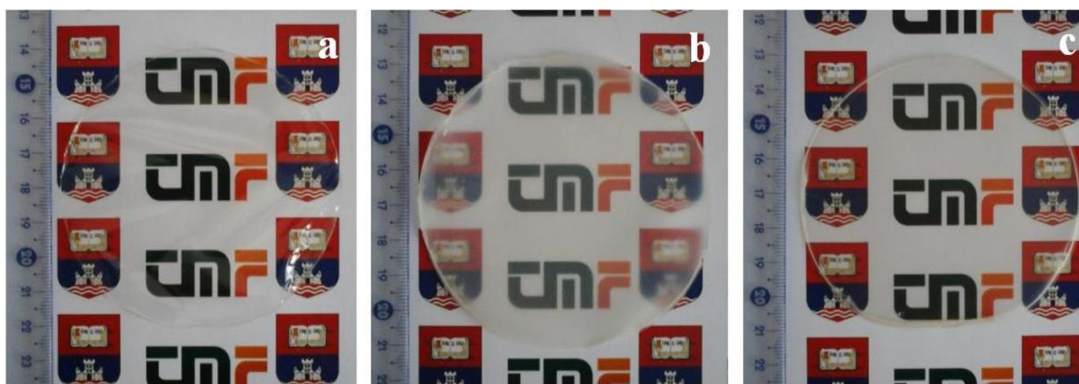
Mineralizacija nije izazvala značajne promene u Ramanskom spektru nanokompozita u poređenju sa kontrolom, samo je detektovano smanjenje intenziteta trake na 2900 cm^{-1} koja se vezuje za prisustvo agara (**Slika 4.17**). Obe formulacije nanokompozita su imale naglašen pik na 1044 cm^{-1} koji je, verovatno, posledica zaostalog nitratnog jona iz cink-nitrata koji je bio prisutan u višku. Izostanak traka karakterističnih za mineralnu fazu u

spektrom nanokompozitnih filmova na bazi agara ne znači da u nanokompozitu nema minerala, već je posledica činjenice da se Ramanskom spektroskopijom primarno izučava površina filmova. Za razliku od nanokompozita na bazi alginata (ZnCMB i ZnPMB), gde je formiranje mineralne faze uzrokovano difundovanjem cinkovih jona iz okolnog rastvora u mikročesticu što dovodi do formiranja Zn-mineralne faze kako na površini tako i u unutrašnjosti mikročestice, u nanokompozitima na bazi agara, deponovanje Zn-mineralne faze je ograničeno na unutrašnjost nanokompozita, tj. rastvor za filmove, rezultujući u izostanku mineralne faze na samoj površini nanokompozitnih filmova. Odsustvo mineralne faze na samoj površini filmova sa potencijalnom primenom kao materijala za pakovanje hrane, može se smatrati poželjnom karakteristikom uzimajući u obzir da omogućava kontrolisano bubrenje i otpuštanje cinka kao antimikrobnog agensa.

4.2.2.2.3. Karakterizacija Zn-mineralizovanih agarnih filmova dobijenih simultanom sintezom mineralne faze

4.2.2.2.3.1. Optičke karakteristike

U cilju ispitivanja mogućnosti primene dobijenih nanokompozitnih materijala na bazi agara kao materijala za pakovanje hrane, evaluirana je njihova sposobnost da blokiraju svetlost. Optičke karakteristike filmova, tj. propustljivost u ultraljubičastom (100 – 400 nm) i vidljivom (400 – 700 nm) delu spektra, su važne u sprečavanju degradacije osetljivih komponenti hrane prilikom izlaganja svetlu. Makroskopske slike nemineralizovanih, kontrolnih i mineralizovanih, nanokompozitnih filmova su date na **Slici 4.18**.



Slika 4.18. Fotografije nemineralizovanih i mineralizovanih filmovana bazi agara: (a) A; (b) AC i (c) AP.

Može se primetiti da deponovanje Zn-mineralne faze unutar agarnog matriksa ima za posledicu smanjenje transparentnosti dobijenih nanokompozita i to sledećim redosledom: A > AP > AC. Razlike u transparentnosti među nanokompozitima različitih formulacija, posledica su razlike u internoj strukturi. Filmovi mineralizovani karbonatom su najmanje transparentni jer je karbonatna faza uniformno raspoređena u polimernom matriksu i sa njime gradi kompaktan nanokompozit, čije karakteristike su sinergističkim delovanjem oba konstituenta, poboljšane. Nasuprot tome, agregati fosfatnih minerala su veliki i nasumično distribuirani po agaru što ima za posledicu nastanak strukturno i morfološki neujednačenog, fazno-razdvojenog, mikrokompozita, čije karakteristike nisu mnogo različite od kontrolnog filma.

Na osnovu evaluacije transmisije svetlosti određenih talasnih dužina u UV i VIS delu spektra, kao i vrednosti transparentnosti na 600 nm (**Tabela VII**), zaključeno je da prisutvo mineralne faze značajno smanjuje transmisiju svetlosti od strane nanokompozita, posebno u UV oblasti. I ovde su se uzorci mineralizovani karbonatom pokazali efikasnijim u blokiranju UV zraka u odnosu na fosfatne.

Tabela VII. Transmisija svetlosti i transparentnost kontrolnih i Zn-mineralizovanih agarnih filmova.

Uzorak	Transmisija svetlosti određenih talasnih dužina (%)							Transparentnost
	200 nm	280 nm	350 nm	400 nm	500 nm	600 nm	800 nm	
A	11,1	72,22	84,35	86,74	88,65	89,54	89,7	0,78 ± 0,04
AP	1,76	4,49	13,02	9,72	10,58	12,02	14,51	15,18 ± 0,83
AC	1,77	2,87	8,2	4,16	4,32	5,51	8,3	22,25 ± 4,10

Polisaharidni filmovi su generalno transparentni i često zahtevaju modifikaciju u smeru dodataka komponenti koje blokiraju svetlost. U literaturi postoje brojni primeri nanokompozita čije optičke karakteristike su poboljšane bilo inkorporiranjem esencijelnih ulja (Hosseini i sar., 2015), gline (Rhim, 2012) ili nanočestica (Ali Arfat i sar., 2017).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da Zn-mineralizovani nanokompozitni filmovi na bazi agara, efikasno blokiraju svetlost, posebno u UV delu spektra, što je

poželjna karakteristika materijala za pakovanje hrane. Pri tome su dovoljno transparentni da omoguće vizuelnu observaciju upakovanog proizvoda.

4.2.2.2.3.2. Mehaničke karakteristike

Potencijalna primena dobijenih nanokompozitnih filmova u industriji pakovanja hrane, nameće izvesne zahteve u pogledu mehaničkih karakteristika materijala. Filmovi bi trebalo da zadrže strukturni integritet tokom svih koraka procesovanja i manipulacije. U cilju ispitivanja mogućnosti primene dobijenih uzoraka kao materijala za pakovanje hrane, izvršena je njihova mehanička karakterizacija. Dobijene vrednosti zatezne čvrstoće (TS), izduženja pri kidanju (ϵ) i modula elastičnosti (E) su prikazane u **Tabeli VIII**.

Tabela VIII. Pregled debljine filmova, sadržaja cinka i mehaničkih karakteristika kontrolnih i mineralizovanih, nanokompozitnih filmova.

Uzorak	Debljina [μm]	Zn(II) [mg/g]	TS [MPa]	ϵ [%]	E [MPa]
A	60	/	0,39	18,3	278,5
AP	70 - 90	159 ± 2	1,7	16,3	312,8
AC	70 - 90	194 ± 28	20,52	4,64	3355,7

Iz dobijenih rezultata može se videti da prisustvo mineralne faze utiče na debljinu i mehaničke osobine dobijenih filmova. Inkorporacija mineralne faze dovela je do porasta debljine filma sa 60 (A) na 70 - 90 μm (AC i AP). Uzimajući u obzir da debljina filma zavisi od sadržaja čvrste faze, ovaj trend je razumljiv. Takođe, dolazi i do porasta zatezne čvrstoće. Vrednosti TS se kreću od 0,39 do 20.52 MPa i najveće su za karbonatom mineralizovane uzorke (AC). Porast zatezne čvrstoće AC uzoraka, bio je praćen i porastom modula elastičnosti u odnosu na kontrolu što dovodi do zaključka da je inkorporacija karbonatne faze dovela do nastanka čvršćih i krućih nanokompozitnih materijala. Nasuprot tome, prisustvo fosfatne mineralne faze unutar agar imalo je neznan uticaj na mehaničke osobine dobijenih nanokompozita: vrednost TS i E su vrlo malo porasle u odnosu na kontrolu.

Porast zatezne čvrstoće, obično ima za posledicu smanjenje izduženja pri kidanju, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj studiji. Naime, impregnacija mineralnom fazom imala je za posledicu smanjenje vrednosti izduženja pri kidanju i to za obe formulacije nanokompozita, sa tim što je ovaj efekat bio više izražen kod AC uzoraka (**Tabela VIII**).

Mehaničke karakteristike nanokompozita su u najvećoj meri određene interakcijama između konstituenata. Ukoliko postoje jake i mnogobrojne interakcije između nanofaze i polimernog matriksa (npr. u vidu brojnih vodoničnih veza), one će rezultirati i u brojnim inter- i intralančanim asocijacijama, samim tim i boljim mehaničkim karakteristikama (Alexandre & Dubois, 2000). Ovo je bio slučaj sa AC filmom, u kome je karbonatna faza, usled malih dimenzija i aktivnog učešća agara u procesu mineralizacije, bila uniformno distribuirana po celoj zapremini filma i ostvarila brojne interakcije sa polimerom. Za razliku od karbonata, fosfati su, usled tendencije ka aglomeraciji, doveli do faznog razdvajanja i heterogenog izgleda celokupnog AP uzorka, što je imalo za posledicu nazatno povećanje vrednosti TS i E. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima SEM i XRD analize (Odeljci 4.2.2.2.1. i 4.2.2.2.2.1).

Činjenica da je vrednost izduženje pri kidanju, kao mera elastičnosti materijala, bila smanjena kod oba nanokompozitna materijala može se objasniti time da su intermolekulske interakcije između konstituenata ipak bile dovoljno jake da smanje slobodni prostor između polimernih lanaca i ograniče klizanje lanaca, tj. kretanja na granici mineral-agar (Wang i sar., 2015).

Poboljšanje mehaničkih karakteristika nanokompozita nakon kombinovanja polimernog matriksa sa nanofazom je, zbog praktične aplikacije, često izučavan fenomen i u literaturi postoje brojni podaci o nanokompozitima na bazi agara koji su impregnirani sa nanoglinom (Jang i sar., 2010), nanočesticama (Kanmani i sar., 2014a; Ali Arfat i sar., 2017) ili biomolekulima (Atef i sar., 2014; Reddy i sar., 2014). Ali kapacitet za poboljšanje je ograničen, prevelika koncentracija nanofilera (Orsuwan i sar., 2016; Rhim, 2011), ili nedostatak biokompatibilnosti između konstituenata nanokompozita (Gimenez i sar., 2013), dovode do narušavanja intermolekulskih asocijacija polimernih lanaca i fizičkih karakteristika, generalno.

U cilju ispitivanja mogućnosti modulisanja mehaničkih osobina putem variranja sadržaja mineralne faze, sintetisani su karbonatom mineralizovani filmovi sa rastućim sadržajem mineralne faze i mehanički okarakterisani. Rezultati testiranja su dati u **Tabeli IX**.

Tabela IX. Mehaničke karakteristike karbonatom mineralizovanih filmova u funkciji sadržaja mineralne faze.

Uzorak	Na ₂ CO ₃	TS [MPa]	ε [%]	E [MPa]
A	/	0,39	18,3	278,5
A/5C	5 mM	0,53	17,3	261,7
A/10C	15 mM	4,17	40,6	1191
A/25C	25 mM	20,52	4,64	3355,7

Iz tabele se vidi da sa porastom količine mineralne faze, rastu i vrednosti TS i E, odnosno, dolazi do opadanja vrednosti ε odgovarajućih nanokompozita. Poboljšanje mehaničkih osobina sa povećanjem sadržaja mineralne faze, posledica je stvaranja kompaktnijih, bolje umreženih nanokompozita, usled ekstenzivnih interlančanih asocijacija posredovanih većim brojem vodoničnih veza između mineralne faze i polimera.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da prisustvo Zn-mineralne faze značajno utiče na mehaničke osobine dobijenih nanokompozita, ali da finalni efekat zavisi kako od prirode tako i od količine inkorporiranih minerala. Karbonatom mineralizovani nanokompoziti su se pokazali pogodnijim za potencijalnu primenu u industriji pakovanja hrane zato što uniformno raspoređena mineralna faza, obezbeđuje poboljšanje mehaničkih karakteristika sintetisanih nanokompozita, uz mogućnost modulisanja putem količine inkorporirane mineralne faze.

4.2.2.2.3.3. Propustljivost vodene pare

U **Tabeli X** su prikazane vrednosti propustljivosti vodene pare kroz Zn-karbonatom mineralizovane filmove na bazi agara.

Tabela X. Pregled vrednosti propustljivosti vodene pare za karbonatom mineralizovane nanokompozitne filmove, u funkciji sadržaja Zn-karbonatne faze.

Uzorak	Na ₂ CO ₃	WVP [g m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹]
A	/	3,63E-10
A/5C	5 mM	2,66E-10
A/10C	15 mM	2,51E-10
A/25C	25 mM	2,37E-10

Uočava se da prisustvo mineralne faze značajno utiče na permeabilnost za vodenu paru dobijenih nanokompozita. Naime, impregnacija agara Zn-karbonatnom fazom ima za posledicu smanjenje propustljivosti za vodu i ovaj efekat je srazmeran količini prisutne mineralne faze. Nanokompozit sa najvećim sadržajem mineralne faze (A/25C) pokazuje poboljšanje od skoro 35 % u odnosu na kontrolne filmove.

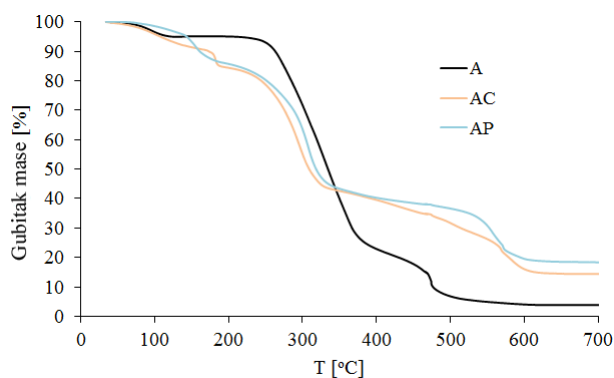
Primarna funkcija ambalaže je da zaštiti proizvod od nepovoljnih uticaja sredine, u koji spada i transfer vlage. Stoga se propustljivost vodene para smatra jednim od najvažnijih parametara prilikom dizajna materijala za pakovanje hrane. Polisaharidni filmovi, generalno, zbog svoje hidrofilne prirode imaju mali kapacitet za inhibiciju transporta molekula vode i zbog toga često zahtevaju modifikacije kako bi im se poboljšale barijerne sposobnosti. Jedan od načina da se smanji propustljivost filma je povećanje stepena umreženosti polimernih lanaca. Očigledno prisustvo nepropusne karbonatne mineralne faze, koja ostvaruje brojne interakcije sa agarom, dovodi do stvaranja gušće polimerne mreže, ograničava mobilnost polimernih lanaca, smanjuje slobodne površine filma i na taj način otežava difuziju molekula vode kroz nanokompozitni film. Sa povećanjem količine inkorporirane mineralne faze se povećava dužina puta koji bi molekul vode teorijski trebalo da pređe da bi prošao sa jedne na drugu stranu filma, tj. rastu i difuzione limitacije.

Dobijeni rezultati idu u prilog rezultatima mehaničke karakterizacije i u korelaciji su sa literaturnim podacima. Dodatak nanofilera, najčešće, poboljšava permeabilnost odgovarajućih nanokompozita, kao što je slučaj sa sistemima agar/ZnO (Kanmani i sar.,

2014a), agar/prah banane (Orsuwan i sar., 2016), ili agar/alginat/kolagen/AgNP (Wang & Rhim, 2015), ali ukoliko dođe do destabilizacije interne strukture, npr. usled velike koncentracije metalnih nanočestica ili nedostatka kompatibilnosti sa polimerom, može doći i do suprotnog efekta. Čak i ista supstanca može imati potpuno drugačiji efekat na permeabilnost nanokompozita, u zavisnosti od dimenzija. Ilustrativan primer su nanokompoziti na bazi agara i celuloze: ukoliko su impregnirani nanocelulozom, permeabilnost opada, dok inkorporacija mikroceluloze dovodi do porasta permeabilnosti usled disruptivnog efekta na interlančane asocijacije (Shankar & Rhim, 2014).

4.2.2.2.3.4. TGA

Rezultati termogravimetrijske analize kontrolnih i mineralizovanih filmova na bazi agara su prikazani na **Slici 4.19**.



Slika 4.19. TGA krive kontrolnih i Zn-mineralizovanih nanokompozita na bazi agara.

TGA kriva kontrolnog filma pokazuje dve faze gubitka mase: inicijalni gubitak mase od ~ 8 % usled dehidracije ($T \leq 180$ °C) praćen termalnom degradacijom agara i poliglicerola ($T \geq 200$ °C) (Orsuwan i sar., 2016; Shankar i sar., 2014). Kao i kod nanokompozita na bazi alginata, prisustvo Zn-mineralne faze je modifikovalo termičke karakteristike dobijenih nanokompozitnih filmova. Oba nanokompozita su imale slične degradacione profile do određene temperature: 1) gubitak mase usled dehidracije ($T \leq 180$ °C); i 2) gubitak mase usled degradacije organske faze ($200 \leq T \leq 340$ °C), dok je treći stupanj termalne degradacije bio različit za različite formulacije. U AC filmu, karbonatna

faza je nastavila da se degradira do ZnO i CO₂, dok je fosfatna faza u AP filmu ostala stabilna, uzrokujući najveću rezidualnu masu.

Poređenjem početne faze gubitka mase uzrokovano desoprcijom vode, mogu se uočiti razlike u sadržaju vode između kontrole i nanokompozitnih filmova (**Slika 4.19**). Voda, kao glavni konstituent hidrogela, se nalazi u tri oblika u hidrogelu: 1) slobodna voda, 2) intermedijerna voda, koja slabo reaguje sa mineralnom fazom i polimerom i nalazi se u stanju koje nije ni slobodno ni vezano i 3) vezana voda, koja reaguje putem uspostavljanja vodoničnih veza sa obe komponente nanokompozita i ima drugačije agregatno stanje u odnosu na slobodnu vodu (Jhon & Andrade, 1973). Na osnovu razlike u TGA krivama, može se zaključiti da inkorporacija Zn-mineralne faze u agarni matriks ima za posledicu povećanje količine intermedijerne i vezane vode usled većeg broja naelektrisanih grupa koje mogu da reaguju sa molekulima vode.

Iz **Slike 4.19** se vidi da prisustvo mineralne faze ne utiče na početnu temperaturu termalne degradacije agara, ali u temperaturnom regionu iznad 340 °C, nanokompoziti su pokazali drugačije degradacione profile u odnosu na kontrolu, što navodi na zaključak da mineralna faza ipak deluje termostabilno na dobijene nanokompozite.

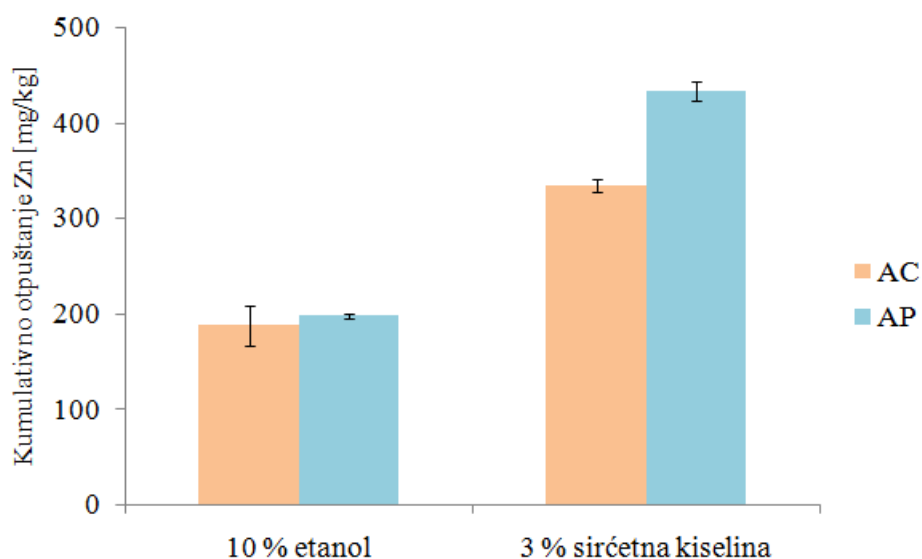
4.2.2.2.3.5. Sadržaj cinka

Ukupni sadržaj Zn(II) u nanokompozitnim filmovima, izražen u mg cinka po g filma, određen je pomoću ICP-MS. Rezultati su prikazani u **Tabeli VIII**. Iako je u sistemu postojala inicijalno ista količina cinka u obe formulacije, kada se sadržaj metala izrazi po jedinici mase formiranog filma, dobiju su različite koncentracije u nanokompozitima različite formulacije, tj. karbonatni filmovi imaju veći sadržaj cinka u odnosu na fosfatne. Ova, uslovno rečeno, nelogičnost posledica je uticaja agara na formiranje i ugradnju mineralne faze između lanaca polimera. Naime, Zn-karbonati nastali u prisustvu agara, usled malih dimenzija i uniformne distribucije, ostvaruju brojne interkacije sa polimernim matriksom, što za posledicu ima približavanje lanaca i smanjivanje slobodnih volumena, tj nastanak kompaktnih nanokompozita (**Slika 4.14b**). Nasuprot tome, agar uopšte ne utiče na formiranje Zn-fosfatne faze: slobodno precipitirana Zn-fosfatna faza ima skoro iste karakteristike kao i ona nastala u prisustvu agara. Deponovani fosfati obrazuju agregate i

neuniformno su raspoređeni po agarom matriksu što za posledicu ima fazno raslojavanje i destabilizaciju interakcija među polimernim lancima.

4.2.2.2.3.6. Kinetika otpuštanja Zn(II)

U cilju ispitivanja mogućnosti primene dobijenih nanokompozitnih filmova kao funkcionalnih pakovanja za hranu, evaluiran je potencijal otpuštanja cinka iz nanokompozita korišćenjem medijuma koji simuliraju hranu. Kumulativni profili otpuštanja cinka iz mineralizovanih nanokompozita na bazi agara, izraženi u mg otpuštenog cinka po kg medijuma, prikazani su na **Slici 4.20**.



Slika 4.20. Kumulativo otpuštanje cinka iz mineralizovanih nanokompozita na bazi agara u 10 % etanolu i 3 % sirćetnoj kiselini.

Iz **Slike 4.20** se vidi da potencijal otpuštanja cinka iz dobijenih nanokompozita zavisi kako od tipa medijuma tako i od prirode mineralnog prekursora. Obe formulacije mineralizovanih nanokompozita na bazi agara su otpustile sličnu količinu cinka u 10 % etanolu, dok je u 3 % sirćetnoj kiselini, generalno, poboljšana kinetika otpuštanja i to posebno u slučaju fosfatom mineralizovanih uzoraka. Pošto deponovana Zn-mineralna faza nije rastvorljiva u vodi i etanolu, može se zaključiti da otpušteni cink u 10 % etanolu, mahom potiče od cinka adsorbovanog na polimerne lance (obe formulacije rastvora za filmove su sadržale cink u višku) i zato je slična količina otpuštena u slučaju oba

nanokompozita, dok u 3 % sirćetnoj kiselini, ukupnoj količini cinka otpuštenog u medijum doprinosi i rastvaranje Zn-mineralne faze usled nižeg pH. Moguće je da su razlike u profilima otpuštanja različitih nanokompozita uslovljene i različitom internom strukturom samih nanokompozita. Naime, prilikom potapanja filma u medijum, kompaktni i dobro razvijeni kompozitni materijali, kao što je uzorak AC, verovatno slabije bubre usled jakih interakcija na granici mineral-polimer, tako da je karbonatna faza uslovno rečeno zaštićena od okolnog medijuma. Nasuprot tome, u uzorku AP, fosfati su obrazovali heterogeno distribuirane agregate velikih dimenzija koji nisu uniformno impregnirali agarni matriks, što je verovatno uticalo na stepen njihove rastvorljivosti u kiseloj sredini.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da niža pH vrednost 3 % sirćetne kiseline (pH 4,5) pogoduje otpuštanju cinka iz nanokompozita usled povećane rastvorljivosti mineralne faze i da, pri zadatim eksperimentalnim uslovima, Zn-fosfatana faza ima veću rastvorljivost u odnosu na Zn-karbonatnu.

Kinetika otpuštanja je ispitana zbog potencijalne primene nanokompozita kao materijala za pakovanje hrane, gde bi otpušteni cink imao dvojaku funkciju antimikrobnog agensa i esencijelnog elementa u ishrani ljudi. Količina agensa koja difunduje iz pakovanja u hranu, označava se kao specifična migracija i za svaku agens, ili element je propisana maksimalna dozvoljena količina od strane regulacionih tela EU (EUR-Lex, 2011). Za cink ona iznosi 25 mg/kg simulacionog medijuma. Iako oslobođene količine cinka iz mineralizovanih kompozita na bazi agara umnogome prevazilaze dozvoljene vrednosti, treba uzeti u obzir da se ova studija odnosi na razvoj koncepta aktivnih pakovanja za hranu i da svaka potencijalna praktična primena zahteva ekstenzivnu optimizaciju u skladu sa specifičnim zahtevima.

4.2.2.2.3.7. Antimikrobna aktivnost

U cilju ispitivanja potencijalne primene dobijenih nanokompozita na bazi agara kao aktivnih pakovanja za hranu sa antimikrobnom funkcijom, ispitana je njihova antimikrobna aktivnost korišćenjem 2 bakterijska i jednog gljivičnog soja: Gram-negativna bakterija *Escherichia coli* ATCC 25922, Gram-pozitivna bakterija *Staphylococcus aureus* ATCC

25923 i gljivica *Candida albicans* ATCC 10231. Rezultati antimikrobne aktivnosti su prikazani u **Tabeli XI**.

Tabela XI. Antimikrobna aktivnost kontrolnih (A) i Zn-mineralizovanih, nanokompozitnih filmova na bazi agara (AC, AP), praćeno putem smanjenja broja mikroorganizama u suspenziji sa testiranim uzorcima, izraženog kao \log_{10} CFU/ml. MBC – potpun biocidni efekat.

Mikroorganizam		0h	24h
<i>S. aureus</i>	Kontrola		8,5 ± 0,4 ^a
	+ A	4,9 ± 0,1	8,7 ± 0,1
	+ AC		MBC
	+ AP		MBC
<i>E. coli</i>	Kontrola		9,5 ± 0,7
	+ A	4,9 ± 0,1	9,1 ± 0,3
	+ AC		6,2 ± 0,3*
	+ AP		6,5 ± 0,2*
<i>C. albicans</i>	Kontrola		8,2 ± 0,1
	+ A	5,2 ± 0,1	7,9 ± 0,4
	+ AC		2,5 ± 0,4*
	+ AP		2,7 ± 0,7*

^aStatistički značajne razlike u odnosu na kontrolu su označene asteriskom, * (*p ≤ 0.05).

Tretman kontrolnim filmom nije pokazao antimikrobni efekat, kao što se i očekivalo jer agar ne poseduje antimikrobna svojstva. Nasuprot tome, tretman nanokompozitima sa cinkom imao je različito dejstvo na različite mikroorganizme. Obe formulacije (AC i AP) dovele su do potpune eliminacije *S. aureus* nakon 24 h. Slični rezultati, tj. jak antimikrobni efekat uočen je i kod *C. albicans*, dok je *E. coli* bila u manjoj meri inhibirana.

Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima antimikrobnog testiranja nanokompozita na bazi alginata (Poglavlje 4.1.1.3.4.), naime, u oba eksperimenta je uočena različita senzitivnost Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija ka antimikrobnom dejstvu jona cinka, pri čemu su, u oba slučaja, Gram pozitivne bakterije (*S. aureus*) bile potpuno eliminisane nakon tretmana sa dobijenim uzorcima pri datim eksperimentalnim uslovima. Takođe, dobijeni rezultati su u saglasnosti i sa drugim studijama koje se tiču izučavanja

antimikrobnog potencijala nanokompozitnih filmova sa cinkom. U svrhu dizajna funkcionalnih materijala za pakovanje hrane, niz nanokompozita na bazi ZnO i agara, karaginana, karboksimetil celuloze (Kanmani & Rhim, 2014a), polisaharida izolovanog iz soje (Salarbashi i sar., 2016), želatina (Nafchi i sar., 2013; Ali Arfat i sar., 2014) i polilaktidne kiseline (Marra i sar., 2016) koji su aktivno inhibirali rast kako bakterija, tako i gljivica, je do sada razvijen. Bitno je naglasiti da primena polisaharidnih filmova sa cinkom nije ograničena samo na industriju pakovanja hrane, primer za to su pektinski filmovi umreženi cinkom koji se koriste kao prevlake medicinskog pribora (Nešić i sar., 2017).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da mineralizovani nanokompozitni filmovi na bazi agara pokazuju funkcionalnost u smislu jakog antimikrobnog dejstva protiv *S. aureus* i *C. albicans* i blagog bakteriostatičkog efekta na *E. coli*. I kao takvi mogu se potencijalno koristiti kao aktivna pakovanja u industriji hrane.

5. ZAKLJUČAK

U ovoj studiji je ispitana mogućnost sinteze novih, poboljšanih biomaterijala na bazi alginata, agara i cinka, primenom biomimetičkog principa dizajna – biomineralizacije. Cilj istraživanja je bio dizajn i karakterizacija novih nanokompozitnih biomaterijala, sa potencijalnom primenom u biomedicini i pakovanju hrane.

Prvi deo teze se odnosio na produkciju novih, poboljšanih biomaterijala na bazi alginata za potencijalnu biomedicinsku primenu. Neminerizovani Zn-alginati i nanokompozitni Zn-mineralizovani Zn-alginatni uzorci (cink-karbonat/cink-alginat i cink-fosfat/cink-alginat) su sintetisani u formi mikročestica primenom metode elektrostatičke ekstruzije. Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Dodavanjem mineralnih prekursora (Na_2HPO_4 ili Na_2CO_3) u alginatni rastvor i sukcesivnim izlaganjem rastvoru za geliranje, uspešno su dobijeni dvofazni (cink-karbonat/cink-alginat i cink-fosfat/cink-alginat) nanokompoziti;
- Alginat, kao biopolimerni matriks, aktivno učestvuje u procesu mineralizacije putem selekcije određenog polimorfa, morfologije i ograničavanju rasta inkorporiranih kristala. Između biopolimera i inkorporirane mineralne faze i biopolimera postoje hemijske interakcije što ima za posledicu nastanak nanokompozita specifičnih poboljšanih svojstava.
- Proces mineralizacije je efikasniji kod fosfatom mineralizovanih uzoraka što je dovelo do većeg sadržaja mineralne faze i cinka u odnosu na karbonatom mineralizovane uzorke
- Mineralizovani uzorci su imali veći sadržaj Zn(II), poboljšanu stabilnost i povoljnije profile otpuštanja Zn(II) u biološki relevantnom okruženju u poređenju sa neminerizovanim.
- Svi testirani uzorci su pokazali antimikrobno dejstvo posredovano otpuštenim Zn(II), ali je postojala razlika u osetljivosti bakterijskih sojeva na antimikrobno dejstvo Zn(II).

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da alginatom posredovana biomineralizacija, gde mineralna faza predstavlja so esencijalnog metala cinka, predstavlja dobru strategiju za dizajn antimikrobnih i bioaktivnih biomaterijala sa potencijalnom biomedicinskom primenom. Aktivno dejstvo ovih biomaterijala, bilo kao obloga za rane sa antimikrobnim dejstvom ili bioaktivnih nosača u tkivnom inženjerstvu, zasniva se na otpuštanju jona cinka u okolnu sredinu (biološki sistem). Produkcija Zn-mineralizovanih alginata je jednostavna, jeftina i pruža mogućnost modifikovanja karakteristika biomaterijala putem variranja sintetskih parametara.

U drugom delu teze ispitana je mogućnost sinteze Zn-mineralizovanih biomaterijala na bazi alginata i agara sa potencijalnom primenom u medicini i industriji pakovanja hrane. Materijali su sintetisani u formi filmova primenom metode izlivanja i otparavanja rastvarača. Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Metoda rehidracije i eksternog geliranja se nije pokazala uspešnom za sintezu nanokompozitnih, Zn-mineralizovanih Zn-alginatnih, kao i Zn-mineralizovanih agarnih filmova, usled neuniformnog geliranja i deponovanja mineralne faze na površini filmova.
- Zn-mineralizovani nanokompozitni filmovi na bazi agara (Zn-karbonat/agar I Zn-fosfat/agar) uspešno su sintetisani kombinacijom *in situ* sinteze mineralne faze i metode izlivanja.
- Inkorporacija Zn-mineralne faze u agar imala je značajan uticaj na morfologiju, karakteristike i funkcionalnost dobijenih nanokompozitnih filmova. Agar je aktivno učestvovao u procesu biomineralizacije karbonatima, dok je kod fosfata ovaj efekat bio manje izražen. Razlike u mikrostrukturi rezultovale su i u različitim karakteristikama odgovarajućih nanokompozita.
- U oba slučaja, deponovanje Zn-mineralne faze unutar agara ima za posledicu poboljšanje optičkih svojstava dobijenih filmova, ali su uzorci mineralizovani karbonatom bili najmanje transparentni i ujedno su se pokazali i efikasnijim u blokiranju UV zraka u odnosu na fosfatne.

- Inkorporacija Zn-karbonatne faze je dovela do nastanka čvršćih i krućih nanokompozitnih filmova i ovo poboljšanje mehaničkih karakteristika je bilo srazmerno količini mineralne faze. Nasuprot tome, prisustvo fosfatne mineralne faze imalo je neznatan uticaj na mehaničke osobine odgovarajućih filmova.
- Takođe, impregnacija agara karbonatnom fazom ima za posledicu smanjenje propustljivosti za vodu i ovaj efekat je srazmeran količini prisutne mineralne faze.
- Brojne interakcije između karbonatne mineralne faze i agara dovele su do nastanka kompaktnih kompozita sa većim sadržajem cinka po jedinici mase biomaterijala u odnosu na fosfatne uzorke. I pored većeg sadržaja cinka, karbonatom mineralizovani uzorci su pokazali povoljnije profile otpuštanja cinka jer su u tečnoj sredini, kompaktni kompoziti slabije bubrili. Generalno, za obe formulacije, utvrđeno je da niža pH vrednost pogoduje otpuštanju cinka iz nanokompozita usled povećane rastvorljivosti mineralne faze.
- Obe formulacije nanokompozita u pokazale jako antimikrobno dejstvo na *S. aureus* i *C. albicans* i blag bakteriostatički efekat na *E. coli*.

Poboljšane mehaničke, optičke i barijerne karakteristike ambalažnog materijala, ukombinovane sa antimikrobnom aktivnošću, olakšavaju procesovanje i manipulaciju i, ujedno, obezbeđuju bolji kvalitet i duži rok trajanja upakovanog proizvoda. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se impregniranjem agarnih filmova sa Zn-karbonatnom fazom dobijaju biodegradabilni i biokompatibilni, nanokompozitni materijali poboljšanih i modularnih mehaničkih, termičkih i optičkih svojstava, koji su ujedno i antimikrobni i kao takvi mogu se potencijalno koristiti kao aktivna pakovanja za hranu.

Literatura

- Abe, M., Kan, C., Zaw, K. K., & Ishikawa, O. (2001). Induction of matrix metalloproteinase-1 in *in vitro* experimental wound model using a novel three-dimensional culture system. *European Journal of Dermatology*, *11*, 112-116.
- Acevedo-Fani, A., Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., & Martín-Belloso, O. (2015). Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. *Food Hydrocolloids*, *47*, 168-177.
- Agren, M. S. (1993). Zinc oxide increases degradation of collagen in necrotic wound tissue. *British Journal of Dermatology*, *129*, 221-222.
- Aksoy, B., Atakan, N., Aksoy, H. M., Tezel, G. G., Renda, N., Ozkara, A., & Onder, E. (2010). Effectiveness of topical zinc oxide application on hypertrophic scar development in rabbits. *Burns*, *36*, 1027-1035.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell*. (4th ed.). New York: Garland Science
- Aldana, D. S., Andrade-Ochoa, S., Aguilar, C. N., Contreras-Esquivel, C. J., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2015). Antibacterial activity of pectic-based edible films incorporated with Mexican lime essential oil. *Food Control*, *50*, 907-912.
- Alexandre, M., & Dubois, P. (2000). Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and use of new class of materials. *Material Science and Engineering: R: Reports*, *28*, 1-63.
- Ali Arfat, Y. A., Ahmed, J., & Jacob, H. (2017). Preparation and characterization of agar-based nanocomposite films reinforced with bimetallic (Ag-Cu) alloy nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, *155*, 382-390.
- Ali Arfat, Y., Benjakul, S., Prodapran, T., Sumpavapol, P., & Songtipya, P. (2014). Properties and antimicrobial activity of fish protein isolate/fish skin gelatin film containing basil leaf essential oil and zinc oxide nanoparticles, *Food Hydrocolloid*, *41*, 265-273.
- Allen, J. I., Perri, R. T., McClain, C. J., & Kay, N. E. (1983). Alterations in human natural killer cell activity and monocyte cytotoxicity induced by zinc deficiency. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *102*, 577-589.

- Alves, N. M., Leonor, I. B., Azevedo, H. S., Reis, R. L., & Mano, J. F. (2010). Designing biomaterials based on biomineralization of bone. *Journal of Materials Chemistry*, *20*, 2911-2921.
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., & Rosato, A. (2006). Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *Journal of Proteome Research*, *5*, 196-201.
- Ansorena, M. R., Marcovich, N. E., & Roura, S. I. (2011). Impact of edible coatings and mild heat shocks on quality of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea* L.) during refrigerated storage. *Postharvest Biology and Technology*, *59*, 53-63.
- Apperrot, G., Lipovsky, A., Dror, R., Perkas, N., Nitzan, Y., Lubart, R., & Gedanken, A. (2009). Enhanced antibacterial activity of nanocrystalline ZnO due to increased ROS mediated cell injury. *Advanced Functional Materials*, *19*, 842-852.
- Arslan, K., Karahan, O., Okus, A., Unlu, Y., Eryilmaz, M. A., Ay, S., & Sevinc, B. (2012). Comparison of topical zinc oxide and silver sulfadiazine in burn wounds: an experimental study. *Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery*, *18*, 376-383.
- Asenath-Smith, E., Li, H., Keene, E. C., Seh, Z. W., & Estroff, L. A. (2012). Crystal growth of calcium carbonate in hydrogels as a model of biomineralization. *Advanced Functional Materials*, *22*, 2891-2914.
- Asgari, S., Jahanshahi, M., & Rahimpour, A. (2014). Cost-effective nanoporous Agar-Agar polymer/Nickel powder composite particle for effective bio-products adsorption by expanded bed chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1361*, 191-202
- Ashby, M. F., Gibson, L. J., Wegst, U., & Olive, R. (1995). The mechanical properties of natural materials. I. Material property charts. *Proceedings: Mathematical and Physical Sciences*, *450*, 123-140.
- Atef, M., Rezaei, M., & Behrooz, R. (2014). Preparation and characterization agar-based nanocomposite film reinforced by nanocrystalline cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, *70*, 537-544.
- Bahadoran, M. (2012). Role of the transcription factor zinc finger protein 521 on Runx2 acetylation. Doctoral dissertation, Harvard School of Dental Medicine.
- Bajpai, S. K., & Sharma, S. (2004). Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca²⁺ and Ba²⁺ ions. *Reactive & Functional Polymers*, *59*, 129-140.

- Basmanav, F. B., Kose, G. T., & Hasirci, V. (2008). Sequential growth factor delivery from complexed microspheres for bone tissue engineering. *Biomaterials*, *29*, 4195-4204.
- Bassett, D. C., Madzovska, I., Beckwith, K. S., Melo, T. B., Obradovic, B., & Sikorski, P. (2015). Dissolution of copper mineral phases in biological fluids and the controlled release of copper ions from mineralized alginate hydrogels. *Biomedical Materials (Bristol)*, *10*(1). <http://doi.org/10.1088/1748-6041/10/1/015006>
- Bertasa, M., Botteon, A., Brambilla, L., Riedo, C., Chiantore, O., Poli, T., Sansonetti, A., & Scalarone, D. (2017). Cleaning materials: A compositional multi-analytical characterization of commercial agar powders. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, Coorrected proff, <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2017.03.011>
- Bhowmick, A., Mitra, T., Gnanamani, A., Das, M., & Kundu, P. P. (2016). Development of biomimetic nanocomposites as bone extracellular matrix for human osteoblastic cells. *Carbohydrate Polymers*, *141*, 82-91.
- Boateng J., Matthews K., Stevens H., & Eccleston, G. (2008). Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *Journal of pharmaceutical sciences*, *8*, 2892-2923.
- Boontheekul, T., Kong, H. J., & Mooney, D. J. (2005). Controlling alginate gel degradation utilizing partial oxidation and bimodal molecular weight distribution. *Biomaterials*, *26*, 2455-2465.
- Bouhadir, K. H., Alsberg, E., & Mooney, D. J. (2001). Hydrogels for combination delivery of antineoplastic agents. *Biomaterials*, *22*, 2625-2633.
- Brayner, R., Ferrari-Iliou, R., Brivois, N., Djediat, S., Benedetti, M. F. & Fievet, F. (2006). Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Letters*, *6*, 866-870.
- Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosale, R., & Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology*, *13*, 620-630.
- Bugarski, B., Li, Q., Goosen, F. A. M., Poncelet, D., Neufeld, J. R., & Vunjak, G. (1994). Electrostatic droplet generation: Mechanism of polymer droplet formation. *AIChE Journal*, *40*, 1026-1031.

- Bullard, K. M., Lund, L., Mudgett, J. S., Mellin, T. N., Hunt, T. K., Murphy, B., Ronan, J., Werb, Z., & Banda, M. J. (1999). Impaired wound contraction in stromelysin-1-deficient mice. *Annals of Surgery*, *230*, 260-265.
- Busch, S., Schwarz, U., & Kniep, R. (2001). Morphogenesis and structure of human teeth in relation to biomimetically grown fluorapatite-gelatine composites. *Chemistry of Materials*, *13*, 3260-3271.
- Campos-Vallette, M. M., Chandía, P. N., Clavijo, E., Leal, D., Matsuhiro, B., Osorio-Román, O. I., et al. (2010). Characterization of sodium alginate and its block fractions by surface enhanced Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, *41*, 758-763.
- Cesaro, A., Delben, F., & Paoletti, S. (1988b). Interaction of divalent cations with polyuronates. *Journal of Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*, *84*, 2573-2584.
- Cesaro, A., Delben, F., Flaibani, A., & Paoletti, S. (1988a). The interaction of lead (II) with glycuronans: U.V. absorption and circular dichroism spectra. *Carbohydrate Research*, *181*, 13-21.
- Chan, A. W, & Neufeld, R. J. (2010). Tuneable semi-synthetic network alginate for absorptive encapsulation and controlled release of protein therapeutics. *Biomaterials*, *31*, 9040-9047.
- Coles, R., McDowell, D., & Kirwan, M. J. (2003). *Food packaging technology*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd..
- Commision regulation EU. Explanatory views on Regulation (EU) No. 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. Dostupno na: http://www.plasticseurope.org/documents/document/20111208094327-foodcontact_pim_explanatory_document_7_december_2011.pdf
- Cummings, J. E., & Kovacic, J. P. (2009). The ubiquitous role of zinc in health and disease, *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* *19*, 215-240.
- Daniel da Silva, A. L., Lopes, A. B., Gil, A. M., & Correia, R. N. (2007). Synthesis and characterization of porous k-carrageenan/calcium phosphate nanocomposite scaffolds. *Journal of Materials Science*, *42*, 8581-8591.
- Dashtdar, H., Rothan, H.A., Tay, T., Ahmad, R. E., Ali, R., Tay, L. X., Chong, P. P., & Kamarul, T. (2011). A preliminary study comparing the use of allogenic chondrogenic pre-

differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells for the repair of full thickness articular cartilage defects in rabbits. *Journal of Orthopaedic Research*, 29, 1336-1342

Degala, S., Zipfel, W. R., & Bonassar, L. J. (2011). Chondrocyte calcium signaling in response to fluid flow is regulated by matrix adhesion in 3-D alginate scaffolds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 505, 112-117.

Deng, Y., Wang, H., Zhang, L., Li, Y., & Wei, S. (2013). *In situ* synthesis and *in vitro* biocompatibility of needle-like nano-hydroxyapatite in agar–gelatin co-hydrogel. *Materials Letters*, 104, 8-12.

Domenech, J., & Prieto, A. (1986). Stability of zinc oxide particles in aqueous suspensions under UV illumination. *Journal of Physical Chemistry*, 90, 1123-1126.

Donati, I. & Paoletti, S. (2009). Material properties of alginates. U B. H. A. Rehm (Ed), *Alginates: Biology and Applications* (pp. 1-53). Berlin: Springer

Donati, I., Morch, Y. A., Strand, B. L., Skjak-Braek, G. & Paoletti, S. Effect of elongation of alternating sequences on swelling behavior and large deformation properties of natural alginate gels. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113, 12916–12922.

Doyle, J., Roth, T., Smith, R., Li, Y. Q., & Dunn, R. (1997). Effect of calcium alginate on cellular wound healing processes modeled *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 32, 561-568.

Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry* 114, 1173-1182.

Eberle, J., Schmidmayer, S., Erben, R. G., Stangassinger M., & Roth, H. P. (1999). Skeletal effects of zinc deficiency in growing rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 13, 21-26.

Emiroğlu, Z. K., Yemiş, G. P., Coşkun, B. K., & Candoğan, K. (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science*, 86, 283-288.

Emri, E., Miko, B., Boros, G., Nagy, G., Rosza, D., Juhasy, T., Hegedus, C., Horkay, I., Remenyik, E., & Emri, G. (2015). Effects of non-toxic zinc exposure on human epidermal keratinocytes. *Metallomics*, 3, 499-507.

EUR-Lex, Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. Dostupno na: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32011R0010>

European Standard EN 13130-1:2004. Materials and articles in contact with foodstuffs. Plastics substances subject to limitations-Part 1: Guide to test methods for the specific migration of substances from plastics to foods and food simulants and the determination of substances in plastics and the selection of conditions of exposure to food simulants.

Falgayrac, G., Sobanska, S., & Brémard, C. (2014). Raman diagnostic of the reactivity between ZnSO₄ and CaCO₃ particles in humid air relevant to heterogeneous zinc chemistry in atmosphere. *Atmospheric Environment*, 85, 83–91.

Falini, G., Fermani, S., Gazzano, M., & Ripamonti, A. (1997). Biomimetic crystallization of calcium carbonate polymorphs by means of collagenous matrices. *Chemistry a European Journal*, 3, 1807-1814.

Farbod, K., Nejadnik, M. R., Jansen, J. A., & Leeuwenburgh, S. C. G. (2014). Interactions between inorganic and organic phases in bone tissue as a source of inspiration for design of novel nanocomposites. *Tissue Engineering: Part B*, 20, 173-188.

Fasim, F., Ahmed, N., Parsons, R., & Gadd, G. M. (2002). Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from the air environment of a tannery. *FEMS Microbiology Letters*, 213, 1-6.

Favier, A. E. (1992). Hormonal effects of zinc on growth in children. *Biological Trace Element Research*, 32, 383-398.

FDA (Food additive status list. US Food & Drug Administration). Dostupno na: <https://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm091048.htm#ftnC>

Formigari, A., Irato, P., & Santon, A. (2007). Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 146, 443-459.

Fraker, P., & King, L. (1998). Changes in regulation of lymphopoiesis and mielopoiesis in the zinc-deficient mouse. *Nutrition Reviews*, 56, 65s-69s.

- Frederickson, C. J., Suh, S. W., Silva, D., Frederickson, C. J., & Thompson, R. B. (2000). Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *Journal of Nutrition*, *130*, 1471S-1483S.
- Freile-Pelegrín, Y., Madera-Santana, T., Robledo, D., Veleza, L., Quintana, P., & Azamar, J. A. (2007). Degradation of agar films in a humid tropical climate: Thermal, mechanical, morphological and structural changes. *Polymer Degradation and Stability*, *92*, 244-252.
- George, M., & Abraham, T.,E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs. *Journal of Controlled Release*, *114*, 1-14.
- Gilchrist, T., Martin, A., M. (1983). Wound treatment with Sorbsan – an alginate fibre dressing. *Biomaterials*, *4*, 317-320.
- Gillard, J. A., Reed, M. W., Buttle, D., Cross, S. S., & Brown, N. J. (2004). Matrix metalloproteinase activity and immunohistochemical profile of matrix metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 during human dermal wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, *12*, 295-304.
- Gimenez, B., Lopez de Lacey, A., Perez-Santín, E., Lopez-Caballero, M. E., & Montero, P. (2013). Release of active compounds from agar and agar-gelatin films with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, *30*, 264-271
- Gopi, D., Nithiya, S., Shinyjoy, E., & Kavitha, L. (2012). Spectroscopic investigation on formation and growth of mineralized nanohydroxyapatite for bone tissue engineering applications, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *92*, 194-200.
- Graddon, D. P., & Munday, L. (1961). Some properties of copper(II) -amino-acidchelates: A study of solubilities, visible region and infra-red spectra in relation to crystal structure. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, *23*, 231-244.
- 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*, 195-198.
- Habibovic, P., & Barralet, J. E. (2011). Bioinorganics and biomaterials: Bone repair. *Acta Biomaterialia*, *7*, 3013-3026.
- Hadley, K. B., Newman, S. M., & Hunt, J. R. (2010). Dietary zinc reduces osteoclast resorption activities and increases markers of osteoblast differentiation, matrix maturation,

and mineralization in the long bones of growing rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *21*, 297-303.

Hales, C. M., & Frost, L. R. (2007). Synthesis and vibrational spectroscopic characterization of synthetic hydrozincite and smithsonite. *Polyhedron*, *26*, 4955-4962.

Han, J. H., & Floros, J. D. (1997). Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. *Journal of Plastic Film & Sheeting*, *13*, 287-298.

Haq, U. I., & Azad, M. A. (2012). Experimental artifacts for morphological chemical sensor materials: Studies on ZnO. *Sensors*, *6*, 8259-8277.

Haraguchi, H. (2004). Metallomics as integrated biometal science. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *19*, 5-14.

Hashizume, M., & Yamaguchi, M. (1993). Stimulatory effect of b-alanyl-histidinato zinc on cell proliferation is dependent on protein synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *122*, 59-64.

Hashizume, M., & Yamaguchi, M. (1994). Effect of b-alanyl-L-histidinato zinc on differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells: Increases in alkaline phosphatase activity and protein concentration. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *131*, 19-24.

Haug, A., & Smidsrød, O. (1970). Selectivity of some anionic polymers for divalent metal ions. *Acta Chemica Scandinavica*, *24*, 843-854.

Haug, A., Larsen, B., & Smidsrod, O. (1967). Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid. *Acta Chemica Scandinavica*, *21*, 691-704.

Hensch, H. K. (1988). *Crystals in Gels and Liesegang Rings*. (1st ed.) Cambridge: Cambridge University Press

Hoppe, A., Güldal, N. S., & Boccaccini, A. R. (2011). A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*, *32*, 2757-2774.

Horga, R., Di Renzo, F., & Quignard, F. (2007). Ionotropic alginate aerogels as precursors of dispersed oxide phases. *Applied Catalysis A*, *325*, 251-255.

Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., & Farahmandghavi, F. (2015). Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. *Industrial Crops and Products*, *67*, 403-413.

- Hsiong, S. X., Carampin, P., Kong, H. J., Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2008). Differentiation stage alters matrix control of stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 85, 145-156.
- Hu, J., Zhu, Y., Tong, H., Shen, X., Chen, L., & Ran, J. (2016). A detailed study of homogeneous agarose/hydroxyapatite nanocomposites for load-bearing bone tissue. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 134-143.
- Huang, R.Y.M., Pal, R., & Moon, G.Y. (1999). Characteristics of sodium alginate membranes for the pervaporation dehydration of ethanol-water and isopropanol-water mixtures. *Journal of Membrane Science*, 160, 101-113.
- Igarashi, T., Iwasaki, N., Kasahara, Y., & Minami, A. (2010). A cellular implantation system using an injectable ultra-purified alginate gel for repair of osteochondral defects in a rabbit model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 94, 844-855.
- Iwata, M., Takebayashi, T., Ohta, H., Alcalde, R. E., Itano, Y., & Matsumura, T. (1999). Zinc accumulation and metallothionein gene expression in the proliferating epidermis during wound healing in mouse skin. *Histochemistry and Cell Biology*, 112, 283-290.
- Iwatsubo, T., Sumaru, K., Kanamori, T., Shinbo, T & Yamaguchi, T. (2006). Construction of a new artificial biomineralization system. *Biomacromolecules*, 7, 95-100.
- Jang, S. A., Lim, G. O., & Song, K. B. (2010). Use of nano-clay (Cloisite Na+) improves tensile strength and vapour permeability in agar rich red algae (*Gelidium corneum*)-gelatin composite films. *International Journal of Food Science & Technology*, 45, 1883-1885.
- Jay, S. M., & Saltzman, W. M. (2009). Controlled delivery of VEGF via modulation of alginate microparticle ionic cross-linking. *Journal of Controlled Release*, 134, 26-34.
- Jhon, M. S, & Andrade, J. D. (1973). Water and hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, 7, 509-522.
- JRC scientific and technical reports, Guidelines on testing conditions for articles in contact with food stuffs, 2009. Dostupno na: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC51601/guidelines%20test%20conditions_final_ed2009.pdf
- Jung, H. S., Oh, E., Shim, D., Park, H. D., Cho, S., Lee, R. B., Jeong, U. Y., Lee, H. K., & Jeong, H. S. (2009). Sonochemical synthesis of amorphous zinc phosphate nanospheres. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 10, 2280-2282.

- Kanmani, P., & Rhim, J. W. (2014a). Properties and characterization of bionanocomposite films prepared with various biopolymers and ZnO nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, *106*, 190-199
- Kanmani, P., & Rhim, J. W. (2014b). Antimicrobial and physical-mechanical properties of agar-based films incorporated with grapefruit seed extract. *Carbohydrate Polymers*, *102*, 708-716.
- Kehrer, J. P. (2000). The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, *149*, 43-50.
- Kishi, S., & Yamaguchi, M. (1994). Inhibitory effect of zinc compounds on osteoclast-like cell formation in mouse marrow cultures. *Biochemical Pharmacology*, *48*, 1225-1230.
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., & Možina, S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, *81*, 124-126.
- Kolambkar, Y. M., Dupont, K. M., Boerckel, J. D., Huebsch, N., Mooney, D. J., Hutmacher, D. W., & Guldberg, R. E. (2011). An alginate-based hybrid system for growth factor delivery in the functional repair of large bone defects. *Biomaterials*, *32*, 65-74.
- Kostić, T. I., Isailović, D. B., Đorđević, B. V., Lević, M. S., Nedović, A. V., & Bugarski, M.B. (2012). Elektrostatička ekstruzija kao disperziona tehnika za inkapsulaciju ćelija i biološki aktivnih supstanci. *Hemijska industrija*, *66*, 505-517.
- Kouisni, L., Azzi, M., Zertoubi, M., Dalard, F., & Maximovitch, S. (2004). Phosphate coatings on magnesium alloy AM60 part 1: Study of the formation and the growth of zinc phosphate films. *Surface & Coatings Technology*, *185*, 58–67.
- Krampert, M., Bloch, W., Sasaki, T., Bugnon, P., Rulicke, T., Wolf, E., Aumailley, M., Parks, W. E., & Werner, S. (2004). Activities of the matrix metalloproteinase stromelysin-2 (MMP-10) in matrix degradation and keratinocyte organization in wounded skin. *Molecular Biology of the Cell*, *15*, 5242-5254.
- Lam, P. L., Lee, K. K. H., Kok, S. H. L., Cheng, G. Y. M., Tao, X. M., Hau, D. K. P., Yuen, M. C. W., Lam, K. H., Gambari, R., Chui, C. H. & Wong, R. S. M. (2012). Development of formaldehyde-free agar/gelatin microcapsules containing berberine HCl and gallic acid and their topical and oral applications. *Soft Matter*, *8*, 5027-5037.

- Lansdown, A. B. G., Mirastschijski, U., Stubbs, N., Scanlon, E., Agren, M. S. (2007). Zinc in wound healing: Theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair and Regeneration*, 15, 2-16.
- Lansdown, A. B. G., Sampson, B., & Rowe, A. (1999). Sequential changes in trace metal, metallothionein and calmodulin concentrations in healing skin wounds. *Journal of Anatomy*, 195, 375-386.
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37, 106-126.
- Lee, K. Y., Rowley, J. A., Eiselt, P., Moy, E. M., Bouhadir, K. H., & Mooney, D. J. (2000). Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by cross-linker type and cross-linking density. *Macromolecules*, 33, 4291-4294.
- Lee, S. Y., Lee, S. J., Choi, D. S., & Hur, S. J. (2015). Current topics in active and intelligent food packaging for preservation of fresh foods. *Journal of the Science of Food and agriculture*, 95, 2799-2810.
- Lemire, J. A., Harrison, J. J., & Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 371–384.
- Leontijevic, V. (2016). Sinteza filmova pektina i karboksimetilceluloze za pakovanje hrane. Završni master rad, Univerzitet u Beogradu, TMF
- Lević, S. (2014). Inkapsulacija aroma u karnauba vosku, alginatu i polivinil-alkoholu, Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, univerzitet u Beogradu
- Lević, S., Obradović, N., Pavlović, V., Isailović, B., Kostić, I., Mitrić, M., Bugarski, B., & Nedović, V. (2014). Thermal, morphological, and mechanical properties of ethyl vanillin immobilized in polyvinyl alcohol by electrospinning process. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 118, 661-668.
- Lloyd, L. L., Kennedy, J. F., Methacanon, P., Paterson, M., & Knill, C. J. (1998). Carbohydrate polymers as wound management aids. *Carbohydrate Polymers*, 37, 315-322.
- Lu, J. W., Zhu, Y. L., Guo, Z. X., Hu, P., & Yu, J. (2006). Electrospinning of sodium alginate with poly(ethylene oxide). *Polymer* 47, 8026-8031.

- Ma, H. L., Hung, S. C., Lin, S. Y., Chen, Y. L., & Lo, W. H. (2003). Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *64*, 273-281.
- Ma, Y., & Feng, Q. (2011). Alginate hydrogel-mediated crystallization of calcium carbonate. *Journal of Solid State Chemistry*, *184*, 1008-1015.
- MacDonald, R. S. (2000). The role of zinc in growth and cell proliferation. *Journal of Nutrition*, *130*, 1500S-1508S.
- Madzovska-Malagurski, I., Vukasinovic-Sekulic, M., Kostic, D., & Levic, S. (2016). Towards antimicrobial yet bioactive Cu-alginate hydrogels. *Biomedical Materials*, *11*(3), 35015. <http://doi.org/10.1088/1748-6041/11/3/035015>
- Maiti, S., Singha, K., Ray, S., Dey, P., & Sa, B. (2009). Adipic acid dihydrazide treated partially oxidized alginate beads for sustained oral delivery of flurbiprofen. *Pharmaceutical Development and Technology*, *14*, 461-470.
- Malagurski, I., Levic, S., Pantic, M., Matijasevic, D., Mitric, M., Pavlovic, V., & Dimitrijevic-Brankovic, S. (2017). Synthesis and antimicrobial properties of Zn-mineralized alginate nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, *165*, 313-321.
- Mann, S. (2001). *Biom mineralization: Principles and concepts in bioinorganic materials chemistry* (1st ed.). Oxford: Oxford University Press.
- Marelli, B., Brenckle, M. A., Kaplan, D. L., & Omenetto, F. G. (2016). Silk fibroin as edible coating for perishable food preservation. *Nature Scientific Reports*, *6*, 25263.
- Marra, A., Silvestre, C., Duraccio, D., & Cimmino, S. (2016). Polylactic/zinc oxide biocomposite films for food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, *88*, 254-262.
- Marsh, K., & Bugusu, B. (2007). Food packaging – roles, materials, and environmental issues. *Journal of Food Science*, *72*, R39-R55.
- Mata, A., Geng, Y., Henrikson, K. J., Aparcio, C., Stock, S. R., Satcher, R. L., Stupp, S. I. (2010). Bone regeneration mediated by biomimetic mineralization of a nanofiber matrix. *Biomaterials*, *23*, 6004-6012.
- Matsakidou, A., Biliaderis, C. G., & Kiosseoglou, V. (2013). Preparation and characterization of composite sodium caseinate edible films incorporating naturally emulsified oil bodies. *Food Hydrocolloids*, *30*, 232-240.

- McCall, K. A., Huang, C., & Fierke, C. A. (2000). Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *Journal of Nutrition*, *130*, 1437S-1446S.
- McCance, R. A. & Widdowson, E. M. (1942). The absorption and excretion of zinc. *Biochemical Journal*, *36*, 692-696.
- Meyer, U., Meyer, T., Handschel, J., & Wiesmann, H. P. (2009). *Fundamentals of tissue engineering and regenerative medicine* (1st ed.). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag
- Morch, Y. A., Donati, I., Strand, B. L., & Skjak-Braek, G. (2006). Effect of Ca^{2+} , Ba^{2+} , and Sr^{2+} on alginate microbeads, *Biomacromolecules*, *7*, 1471-1480.
- Morris, E. R., Rees, D. A., Thom, D., & Boyd, J. (1978). Chiroptical and stoichiometric evidence of a specific primary dimerisation process in alginate gelation. *Carbohydrate Research*, *66*, 145-154.
- Mounicou, S., & Szpunar, J. (2009). Metallomics: the concept and methodology. *Chemical Society Reviews*, *38*, 1119-1138.
- Moussa, S. H., Tayel, A. A., Alsohim, A. S., & Abdallah, R. R. (2013). Botryticidal activity of nanosized silver-chitosan composite and its application for the control of gray mold in strawberry. *Journal of Food Science*, *78*, M1589-M1594.
- Murakami, K. i sar. (2010). Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings. *Biomaterials*, *31*, 81-90.
- Nafchi, A. M., Nassiri, R., Sheibani, S., Ariffin, F., & Karim, A. A. (2013). Preparation and characterization of bionanocomposite films filled with nanorod-rich zinc oxide, *Carbohydrate Polymers*, *96*, 233–239.
- Nešić, A., Onjia, A, Davidović, S., Dimitrijević-Branković, S., Errico, M. E., Santagata, G., & Malinconico, M. (2017). Design of pectin-sodium alginate based films for potential healthcare application: Study of chemico-physical interactions between the components of films and assessment of their antimicrobial activity, *Carbohydrate Polymers*, *157*, 981-990.
- Niranjan, R., Koushik, C., Saravanan, S., Moorthi, A., Vairamani, M., & Selvamurugan, N. (2013). A novel injectable temperature-sensitive zinc doped chitosan/ β -glycerophosphate hydrogel for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, *54*, 24-29.

Nwomeh, B. C., Liang, H. X., Diegelmann, R. F., Cohen, I. K., & Yager, D. R. (1998). Dynamics of the matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-8 in acute open human dermal wounds. *Wound Repair and Regeneration*, *6*, 127-134.

O'Dell, B. L. (2000). Role of zinc in plasma membrane function. *Journal of Nutrition*, *130*, 1432S-1436S.

Oaki, Y., & Imai, H. (2003). Experimental demonstration for the morphological evolution of crystals grown in gel media. *Crystal Growth & Design*, *3*, 711-716.

Olderøy, M., Xie, M., Strand, B. L., Draget, K. I., Sikorski, P., & Andreassen, J. P. (2011). Polymorph switching in the calcium carbonate system by well-defined alginate oligomers. *Crystal Growth and Design*, *11*, 520-529.

Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2008). Using polysaccharide-based edible coatings to enhance quality and antioxidant properties of fresh-cut melon. *LWT - Food Science and Technology*, *41*, 1862-1870.

Orsuwan, A., Shankar, S., Wang, L. F., Sothornvit, R., & Rhim, J. W. (2016). Preparation of antimicrobial agar/banana powder blend films reinforced with silver nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, *60*, 476-485.

Ovesen, J., Moller-Madsen, B., Thomsen, J. S., Danscher, G., & Mosekilde, L. (2009). The positive effects of zinc on skeletal strength in growing rats. *Bone*, *29*, 565-570.

Padmavathy, N., & Vijayaraghavan, R. (2008). Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles: An antimicrobial study. *Science and Technology of Advanced Materials*, *9*, 035004

Paula, G. A., Benevides, N. M. B., Cunha, A. P., De Oliveira, A. V., Pinto, A. M. B., Morais, J. P. S., & Azeredo, H. M. C. (2015). Development and characterization of edible films from mixtures of κ -carrageenan, ι -carrageenan, and alginate. *Food Hydrocolloids*, *47*, 140-145.

Pawar, S. N., & Edgar, K. J. (2012). Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*, *33*, 3279-3305.

Pereda, M., Ponce, A. G., Marcovich, N. E., Ruseckaite, R. A., & Martucci, J. F. (2011). Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids* *25*, 1372-1381.

- Pereira, L., Sousa, A., Coelho, H., Amado, A. M., & Ribeiro-Claro, P. J. A. (2003). Use of FTIR, FT-Raman and ^{13}C -NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. *Biomolecular Engineering*, 20, 223-228.
- Perez Espitia, P. J., Ferreira Soares, N. F., Dos Reis Coimbra, J. S., De Andrade, N. J., Souza Cruz, R., & Alves Madeiros, E. A. (2012). Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 1447-1464.
- Peters, M. C., Polverini, P. J., & Mooney, D. J. (2002). Engineering vascular networks in porous polymer matrices. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 60, 668-678.
- Pilcher, B. K., Dumin, J. A., Sudbeck, B. D., Krane, S. M., Welgus, H. G., & Parks, W. C. (1997). The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *Journal of Cell Biology*, 137, 1445-1457.
- Place, E. S., Rojo, L., Gentleman, E., Sardinha, J. P., & Stevens, M. M. (2011). Strontium- and zinc-alginate hydrogels for bone tissue engineering. *Tissue Engineering Part A*, 17, 2713-2722.
- Poncelet, D., Babak, V., Neufeld, R. J., Goosen, M., & Bugarski, B. (1999): Theory of electrostatic dispersion of polymer solution in the production of microgel beds containing biocatalyst. *Advances in Colloid Interface Science*, 79, 213-228.
- Prasad, A. S. (1984). Discovery and importance of zinc in human nutrition. *Federation Proceedings*, 43, 2829-2834.
- Prasad, A. S. (1991). Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 403-412.
- Qiao, Y., Zhang, W., Tian, P., Meng, F., Zhu, H., Jiang, X., Liu, X., & Chu, P. K. (2014). Stimulation of bone growth following zinc incorporation into biomaterials, *Biomaterials*, 35, 6882-6897.
- Qin, Y. (2008). Alginate fibers: An overview of the production processes and applications in wound management. *Polymer International*, 57, 171-180.
- Queen, D., Orsted, H., Sanada, H., & Sussman, G. (2004). A dressing history. *International Wound Journal*, 1, 59-77.

- Raghupathi, K. R., Koodali, R. T., & Manna, A. C. (2011). Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir*, 27, 4020-4028.
- Raphael, E., Avellaneda, C. O., Manzolli, B., & Pawlicka, A. (2010). Agar-based films for application as polymer electrolytes. *Electrochimica Acta*, 55, 1455-59.
- Ravanti, L., & Kahari, V. M. (2000). Matrix metalloproteinases in wound repair (review). *International Journal of Molecular Medicine*, 6, 391-407.
- Reddy, J. P., & Rhim, J. W. (2014). Characterization of bionanocomposite films prepared with agar and paper-mulberry pulp nanocellulose. *Carbohydrate Polymers*, 110, 480-488.
- Rhim, J. W. (2011). Effect of clay contents on mechanical and water vapor barrier properties of agar-based nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, 86, 691-699.
- Rhim, J. W. (2012). Physical-mechanical properties of agar/k-carrageenan blend film and derived clay nanocomposite film. *Journal of Food Science*, 77, N66-73.
- Rhim, R. W., & Ng, P. K. W. (2007). Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 411-433.
- Ribeiro, C. C., Barrias, C. C., & Barbosa, M. A. (2004). Calcium phosphate-alginate microspheres as enzyme delivery matrices. *Biomaterials*, 25, 4363-4373.
- Rink, L., & Gabriel, P. (2000). Zinc and the immune system. *Proceeding of the Nutrition Society*, 59, 541-552.
- Rojas-Graü, M. A., Tapia, M. S., Rodríguez, F. J., Carmona, A. J., & Martin-Belloso, O. (2007). Alginate and gellan-based edible coatings as carriers of antibrowning agents applied on fresh-cut Fuji apples. *Food Hydrocolloids*, 21, 118-127.
- Russell, A. D. (2003). Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 750-763.
- Said, A. A., & Hassan, R. M. (1993). Thermal decomposition of some divalent metalalginate gel compounds. *Polymer Degradation and Stability*, 39, 393-397.
- Salarbashi, D., Mortazavi, S. A., Noghabi, M. S., Bazzaz, B. S. F., Sedaghat, N., Ramezani, M., & Shahabi-Ghahfarrokhi, I. (2016). Development of new active packaging film made from a soluble soybean polysaccharide incorporating ZnO nanoparticles, *Carbohydrate polymers*, 140, 220-227.

- Santos, M. H., Dias Heneine, L. G., & Mansur, H. S. (2008). Synthesis and characterization of calcium phosphate/collagen biocomposites doped with Zn²⁺. *Materials Science and Engineering C*, 28, 563-571.
- Saxena, A., Tahir, A., Kaloti, M., Ali, J., & Bohidar, H. B. (2011). Effect of agar-gelatin compositions on the release of salbutamol tablets. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 1, 93-98.
- Shakir, M., Jolly, R., Khan, M. S., Rauf, A., & Kazmi, S. (2016). Nano-hydroxyapatite/ β -CD/chitosan nanocomposite for potential applications in bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 276-289.
- Shalomun, K. T., Anulekha, K. H., Nair, S. V., Nair, S. V., Chennazhi, K. P., & Jayakumar, R. (2004). Sodium alginate/poly(vinyl alcohol)/nano ZnO composite nanofibers for antibacterial wound dressings. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 247-254.
- Shankar, S., & Rhim, J. W. (2015). Preparation of nanocellulose from micro-crystalline cellulose: The effect on the performance and properties of agar-based composite films. *Carbohydrate Polymers* 135, 18-26.
- Shankar, S., Teng, X., & Rhim, J. W. (2014). Properties and characterization of agar/CuNP bionanocomposite films prepared with different copper salts and reducing agents. *Carbohydrate Polymers*, 114, 484-492.
- Shi, H. N., Scott, M. E., Stevenson, M. M., & Koski, K. G. (1998). Energy restriction and zinc deficiency impair the functions of murine T cells and antigen-presenting cells during gastrointestinal nematode infection. *Journal of Nutrition*, 128, 20-27.
- Shi, J., Liu, L., Sun, X., Cao, S., & Mano, J. F. (2008). Biomineralized polysaccharide beads for dual-stimuli-responsive drug delivery. *Macromolecular Bioscience*, 8, 260-267.
- Shi, J., Zhang, Z., Qi, W., & Cao, S. (2012). Hydrophobically modified biomineralized polysaccharide alginate membrane for sustained smart drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 747-753.
- Siddique, S., Hussain Shah, Z., Shahid, S., & Yasmin, F. (2013). Preparation, characterization and antibacterial activity of ZnO nanoparticles on broad spectrum of microorganisms. *Acta Chimica Slovenica*, 60, 660-665.

Sikorski, P., Mo, F., Skjåk-Bræk, G., & , B. T. (2007). Evidence for egg-box-compatible interactions in calcium-alginate gels from fiber X-ray diffraction. *Biomacromolecules*, 8, 2098-2103.

Silva, C. M., Ribeiro, A. J., Ferreira, D., & Veiga, F. (2006). Insulin encapsulation in reinforced alginate microspheres prepared by internal gelation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29, 148-159.

Silvestre, C., Duraccio, D., Cimmino, S. (2011). Food packaging based on polymer nanomaterials. *Progress in Polymer Science*, 36, 1766-1782.

Singh, B., Sharma, D.K., & Gupta, A. (2009). A study towards release dynamics of thiram fungicide from starch-alginate beads to control environmental and health hazards. *Journal of Hazardous Materials*, 161, 208-216.

Singh, P. V., & Rath, C. (2015). Passivation of native defects of ZnO by doping Mg detected through various spectroscopic techniques. *RSC Advances*, 5,44390-44397.

Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., & Dalla Rosa, M. (2008). Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & technology*, 19, 634-643.

Smidsrod, O, & Skjak-Bræk, G. (1990). Alginate as imobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, 8, 71-78.

Smidsrød, O. (1974). Molecular basis of some physical properties of alginates in the gel state. *Faraday Discussions Chemical Society*, 57, 263 -274.

Soderberg, T., Agren, M., Tengrup, I., Hallmans, G., & Banck, G. (1989). The effects of an occlusive zinc medicated dressing on the bacterial flora in excised wounds in the rat. *Infection*, 17, 81-85.

Song, Y., Liu, L., Shen, H., You, J., & Luo, Y. (2011). Effect of sodium alginate-based edible coating containing different anti-oxidants on quality and shelf life of refrigerated bream (*Megalobrama amblycephala*). *Food Control*, 22, 608-615.

Sonohara, R., Muramatsu, N., Ohshima, H., & Kondo, T. (1995). Difference in surface properties between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as revealed by electrophoretic mobility measurements. *Biophysical Chemistry*, 55, 273-277.

Steginsky, C. A., Beale, J. M., Floss, H. G., & Mayer, R. M. (1992). Structural determination of alginic acid and the effects of calcium binding as determined by high-field NMR. *Carbohydrate Research*, 225, 11-26.

- Straccia, M. C., D'Ayala, G. G., Romano, I., & Laurienzo, P. (2015). Novel zinc alginate hydrogels prepared by internal setting method with intrinsic antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*, *125*, 103–112.
- Sun, Q. H., Silva, E. A., Wang, A. X., Fritton, J. C., Mooney, D. J., Schaffler, M. B., Grossman, P. M., & Rajagopalan, S. (2010). Sustained release of multiple growth factors from injectable polymeric system as a novel therapeutic approach towards angiogenesis. *Pharmaceutical Research*, *27*, 264-271.
- Tapiero, H., & Tew, K. D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *57*, 399-411.
- Thomas, A., Harding, K. G., & Moore, K. (2000). Alginates from wound dressings activate human macrophages to secrete tumour necrosis factor- α . *Biomaterials*, *21*, 1797-1802.
- Tommasi, G., Perni, S., & Prokopovich, P. (2016). An injectable hydrogel as bone graft material with added antimicrobial properties. *Tissue Engineering Part A*, *22*, 862-872.
- Trandafilovic, L. V., Bozanic, D. K., Dimitrijevic-Brankovic, S., Luyt, A. S., & Djokovic, V. (2012). Fabrication and antibacterial properties of ZnO?alginate nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, *88*, 263-269.
- Trevisan, R., Flesch, S., Mattos, J. J., Milani, M. R., Dias bainya, A. C., & Dafre, A. L. (2014). Zinc causes acute impairment of glutathione metabolism followed by coordinated antioxidant defenses amplification in gills of brown mussels *Perna perna*. [*Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*](#), *159*, 22-30.
- Tripathi, A., Seravanan, S., Pattnaik, S., Moorthi, A., Partridge, N. C., & Selvamurugan, N. (2012). Bio-composite scaffolds containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-copper-zinc for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, *50*, 294- 299.
- Truong-Tram, A. Q., Carter, J., Ruffin, R. E., & Zalewski, P. E. (2001). The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. *BioMetals*, *14*, 315-330.
- Tubek, S., Grzanka, P., & Tubek, I. (2008). Role of zinc in hemostasis: a review. *Biological Trace Element Research*, *121*, 1-8.
- Valente, J. F. A., Valente, T. A. M., Alves, P., Ferreira, P., Silva, A., & Correia, I. J. (2012). Alginate based scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, *32*, 2596-2603.

- Vallee, B. L., & Falchuk, K. H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Reviews*, 73, 79-118.
- Van Wart, H. E., & Birkedal-Hansen, H. (1990). The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87, 5578-5582.
- Vasile, B. S., Oprea, O., Voicu, G., Andronescu, E., Teodorescu, A., & Holban, A. (2014). Synthesis and characterization of a novel controlled release zinc oxide/gentamicin-chitosan composite with potential applications in wounds. *International Journal of Pharmaceutics* 463, 161–169.
- Verma, R. P., & Hansch, C. (2007). Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical-biological functions and (Q)SARs, *Bioinorganic and Medicinal Chemistry*, 15, 2223-2268.
- Verma, V., Verma, P., Kar, S., Ray, P., & Ray, A. R. (2007). Fabrication of agar-gelatin hybrid scaffolds using a novel entrapment method for in vitro tissue engineering applications. *Biotechnology and Bioengineering*, 96, 392-400.
- Wang, L. F., & Rhim, J. W. (2015). Preparation and application of agar/alginate/collagen ternary blend functional food packaging films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 460-468.
- Wang, L., Shelton, R. M., Cooper, P. R., Lawson, M., Triffitt, J. T., & Barralet, J. E. (2003). Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering. *Biomaterials*, 24, 3475-3481.
- Wang, X., Li, X., Ito, A., & Sogo, Y. (2011). Synthesis and characterization of hierarchically macroporous and mesoporous CaO-MO-SiO₂-P₂O₅ (M = Mg, Zn, Sr) bioactive glass scaffolds, *Acta Biomaterialia*, 7, 3638-3644.
- Wells, L. A., & Sheardown, H. (2007). Extended release of high pI proteins from alginate microspheres via a novel encapsulation technique. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65, 329-335.
- Williams, D.F. (2009). On the nature of biomaterials. *Biomaterials*, 30, 5897-5909.
- Xie, M., Olderøy, M., Andreassen, J. P., Selbach, S. M., Strand, B. L., & Sikorski, P. (2010). Alginate-controlled formation of nanoscale calcium carbonate and hydroxyapatite mineral phase within hydrogel networks. *Acta Biomaterialia*, 6, 3665-3675.

- Xie, M., Olderoy, M., Zhang, Z., Andreassen, J. P., Strand, B. L., & Sikorski, P. (2012). Biocomposites prepared by alkaline phosphatase mediated mineralization of alginate microbeads. *RSC Advances*, 2, 1457-1465.
- Xu, F. F. & Imlay, J. A. (2012). Silver(I), mercury(II), cadmium(II), and zinc(II) target exposed enzymic iron-sulfur clusters when they toxify *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 3614-3621.
- Xu, L.P., Han, D., Wu, X., Zhang, Q., Zhang, X., & Wang, S. (2016). A green route for substrate-independent oil-repellent coatings. *Scientific Reports*, 6, 38016.
- Yamaguchi, M. (1998). Role of zinc in bone formation and bone resorption. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 11, 119-135.
- Yamaguchi, M., Oishi, H., & Suketa, Y. (1988). Zinc stimulation of bone protein synthesis in tissue culture. Activation of aminoacyl-tRNA synthetase. *Biochemical Pharmacology*, 37, 4075-4080.
- Yang, H., Gao, P. F., Wu, W. B., Yang, X. X., Zeng, Q. L., Li, C., & Huang, C. Z. (2014). Antibacterials loaded electrospun composite nanofibers: release profile and sustained antibacterial efficacy. *Polymer Chemistry*, 5, 1965-1975.
- Yang, L., Shi, J., Zhou, X., & Cao, S. (2015). Hierarchically organization of biom mineralized alginate beads for dualstimuli-responsive drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 73, 1-8.
- Zafar, R., Zia, K. M., Tabasum, S., Jabeen, F., Noreen, A., & Zuber, M. (2016). Polysaccharide based bionanocomposites, properties and applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 1012-1024.
- Zreiqat, H., Ramaswamy, Y., Wu, C., Paschalidis, A., Lu, Z. F., James, B. Birke, O., McDonald, M., Little, D., & Dunstan, C. R. (2010). The incorporation of strontium and zinc into a calcium-silicon ceramic for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 31, 3175-3184.

BIOGRAFIJA

Ivana Malagurski je rođena 13.09.1982. u Sarajevu, Bosna i Hercegovina. Diplomirala je Molekularnu biologiju i fizologiju na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Doktorske akademske studije je upisala 2010. godine na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija.

Autor je i koautor tri naučna rada objavljena u uglednim međunarodnim časopisima i jednog rada u domaćem naučnom časopisu.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ивана Малагурски

број индекса 4037/10

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Добијање и карактеризација неминерализованих и минерализованих биоматеријала
на бази природних полисахарида морских алги и есенцијалног метала цинка“

- 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, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора __Ивана Малагурски_____

Број индекса _____

Студијски програм __Биохемијско инжињерство и биотехнологија_____

Наслов рада „Добијање и карактеризација неминерализованих и минерализованих биоматеријала на бази природних полисахарида морских алги и есенцијалног метала цинка“ _____

Ментор _проф. Др Сузана Димитријевић-Бранковић_____

Потписани/а _____Ивана Малагурски_____

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, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Добијање и карактеризација неминерализованих и минерализованих биоматеријала на бази природних полисахарида морских алги и есенцијалног метала цинка“

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, _____
