

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Rade D. Surudžić

**ELEKTROHEMIJSKA SINTEZA I
KARAKTERIZACIJA NANOKOMPOZITA
POLIVINIL-ALKOHOLA, GRAFENA I
NANOČESTICA SREBRA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Rade D. Surudžić

**ELECTROCHEMICAL SYNTHESIS AND
CHARACTERIZATION OF POLY(VINYL
ALCOHOL)/GRAPHENE
NANOCOMPOSITES WITH SILVER
NANOPARTICLES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

Mentor:

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

Članovi komisije:

Dr Aleksandra Perić-Grujić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Maja Vukašinović-Sekulić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Ana Janković, naučni saradnik,
Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu d.o.o.

Datum odbrane: _____ 2018. godine

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za fizičku hemiju i elektrohemiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Deo eksperimentalnih tehnika urađen je na Katedri za hemijsko inženjerstvo, Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije i Kjung Hi Univerzitetu u Jonginu u Republici Koreji.

Želim da se zahvalim mentoru prof. dr Vesni Mišković-Stanković na ukazanom poverenju, vođenju i razumevanju kroz rad na doktorskoj disertaciji. Prof. dr Aleksandri Perić-Grujić se zahvaljujem na usrdnoj pomoći i savetima. Prof. dr Maji Vukašinović-Sekulić želim da se zahvalim na iskrenoj podršci i saradnji tokom rada na disertaciji. Dr Ani Janković dugujem iskrenu zahvalnost za podršku i nesebičnu pomoć tokom rada.

Zahvaljujem se koleginicama, dr Željki Đurđević, dr Sanji Eraković, dr Ivani Jevremović, Katarini Nešović i Mileni Stevanović na pomoći i podršci tokom zajedničkog rada.

Bez porodice nijedan uspeh ne bi imao smisao i zato želim da se zahvalim ocu Danetu, majci Radmili, supruzi Danici i sinu Marku na bezgraničnoj podršci, strpljenju i ljubavi.

Elektrohemijska sinteza i karakterizacija nanokompozita polivinil-alkohola, grafena i nanočestica srebra

REZIME:

Cilj ove doktorske disertacije je dobijanje srebro/polivinil-alkohol (Ag/PVA) i srebro/polivinil-alkohol/grafen (Ag/PVA/Gr) nanokompozita elektrohemijskom sintezom nanočestica srebra u PVA rastvoru, odnosno PVA/Gr koloidnoj disperziji. Elektrohemijska reakcija izvodi se pri galvanostatskim uslovima, pri čemu je količinu, oblik i veličinu nanočestica srebra (AgNPs) moguće kontrolisati izborom vrednosti gustine struje i vremena sinteze, te je međusobna zavisnost ovih parametara detaljno ispitana u ovom radu. Svojstva nanokompozita dobijenih u vidu koloidnih disperzija, filmova i hidrogelova ispitane su u cilju potencijalne biomedicinske primene.

Za karakterizaciju sintetisanih srebro/polivinil-alkohol i srebro/polivinil-alkohol/grafen koloidnih disperzija korišćena je ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija (UV-Vis) za dokazivanje prisustva, prinosa i praćenja stabilizacije nanočestica srebra u koloidnim disperzijama dobijenim pri različitim parametrima sinteze, transmisiona elektronska mikroskopija (TEM) za određivanje veličine i morfologije nanočestica srebra i ciklična voltometrija (CV) za utvrđivanje vrste interakcija između nanočestica srebra, grafena i polivinil-alkohola. Utvrđeno je da su optimalni parametri sinteze za dobijanje nanočestica srebra u 10 mas. % PVA rastvoru pri gustini struje od 40 mA cm^{-2} i vremenu sinteze od 30 min. Takođe, utvrđeno je da Ag/PVA/Gr koloidna disperzija ima nanočestice srebra manjih dimenzija u odnosu na Ag/PVA koloidnu disperziju što pokazuje da listovi grafena smešteni između polimernog lanca sprečavaju rast, agregaciju i aglomeraciju nanočestica srebra.

Analiza filmova Ag/PVA i Ag/PVA/Gr dobijenih izlivanjem koloidnih disperzija u tankom sloju i sušenjem na temperaturi od $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ vršena je metodom difrakcije X-zraka (XRD) za određivanje tipa kristalne rešetke i veličine kristalita nanočestica srebra, infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR) za određivanje vrste veze između nanočestica srebra, grafena i polimera, Ramanska spektroskopija za dokazivanje prisustva i strukture grafena, skenirajuća elektronska

mikroskopija (FE-SEM) za određivanje mikrostrukture i morfologije filmova, fotoelektronska spektroskopija X-zracima (XPS) za indentifikaciju sastava površine filmova, test istezanja za određivanje mehaničkih svojstava filmova i termogravimetrijska analiza (TGA) za određivanje termičke stabilnosti filmova. Potvrđeno je prisustvo srebra u kristalnom obliku, semikristalni oblik PVA kao i da prisustvo nanočestica srebra i listova grafena ne narušava semikristalnu strukturu PVA. Potvrđeno je da postoje interakcije između PVA polimernih lanaca i nanočestica srebra u slučaju Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova, kao i interakcija listova grafena smeštenih između polimernih lanaca kod PVA/Gr i Ag/PVA/Gr filmova. Nanočestice srebra u Ag/PVA/Gr filmu u odnosu na Ag/PVA su manjih dimenzija i/ili imaju manju agregaciju usled prisustva listova grafena smeštenih između polimernih lanaca. Pokazano je poboljšanje mehaničkih svojstava prisustvom grafena i nanočestica srebra u polimernoj matrici PVA, gde je značajno povećanje zatezne čvrstoće od 56 % za PVA/Gr, 23,8 % za Ag/PVA/Gr i 6,3 % za Ag/PVA u odnosu na PVA polimerni film. Zatezna čvrstoća je takođe povećana ~20 % kod PVA/Gr i Ag/PVA/Gr filmova u odnosu na PVA film. Termogravimetrijska analiza je pokazala poboljšanje termičke stabilnosti u prisustvu grafena kod PVA/Gr i Ag/PVA/Gr filmova.

Hidrogelovi PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr dobijeni su metodom uzastopnog zamrzavanja na -18°C i odmrzavanja na 4°C odgovarajućih koloidnih disperzija. Kao metode karakterizacije dobijenih hidrogelova korišćena je atomska apsorpciona spektroskopija (AAS) za praćenje kinetike otpuštanja srebra, MTT test citotoksičnosti za određivanje stepena citotoksičnosti i agar difuzioni test i test u bakterijskoj suspenziji za određivanje antibakterijskih svojstava hidrogelova. Kinetika otpuštanja srebra iz Ag/PVA i Ag/PVA/Gr nanokompozitnih hidrogelova u rastvoru SBF-a na 37°C pokazala je naglo otpuštanje srebra tokom prvih 3 dana tj. 16 mas % kod Ag/PVA i 19 mas % srebra kod Ag/PVA/Gr hidrogela. Nakon 28 dana, oba hidrogela Ag/PVA i Ag/PVA/Gr zadržala su ~75 % početne koncentracije srebra što je posledica stabilnosti nanočestica srebra u visokoumreženom PVA hidrogelu i pokazuje da zaostala količina srebra može da sačuva sterilnost uzorka tokom vremena. Dokazana su antibakterijska svojstva Ag/PVA i Ag/PVA/Gr hidrogelova prema sojevima *Escherichia coli* (ATCC–25922) i *Staphylococcus aureus* TL, kao i za PVA/Gr hidrogel prema soju *E. coli* (ATCC–25922). MTT test citotoksičnosti je pokazao da se PVA i

PVA/Gr filmovi mogu klasifikovati kao blago citotoksični, takođe i PVA/Gr hidrogel, dok se PVA hidrogel može klasifikovati kao netoksičan prema zdravim imunokompetentnim mononuklearnim ćelijama periferne krvi (PBMC) i prema PBMC ćelijama stimulisanih na proliferaciju mitogenom (PBMC+PHA).

Eksperimenti su obavljani na Katedri za fizičku hemiju i elektrohemiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, dok su antibakterijska ispitivanja vršena u laboratoriji za mikrobiologiju na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju. Testovi citotoksičnosti su rađeni na Institutu za onkologiju i radiologiju, Beograd, Srbija.

Ključne reči: elektrohemijska sinteza, nanokompoziti, nanočestice srebra, polivinil-alkohol, grafen

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Hemijsko inženjerstvo

UDK broj:

ELECTROCHEMICAL SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF POLY(VINYL ALCOHOL)/GRAPHENE NANOCOMPOSITES WITH SILVER NANOPARTICLES

SUMMARY

The goal of this doctoral dissertation is to obtain silver/poly(vinyl alcohol) (Ag/PVA) and silver/poly(vinyl alcohol)/graphene (Ag/PVA/Gr) nanocomposites by electrochemical synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) in the PVA solution, or PVA/Gr colloidal dispersion. The electrochemical reaction is performed under galvanostatic conditions, whereby the quantity, shape and size of the silver nanoparticles can be controlled by selecting the value of the current density and the time of the synthesis, and the relation between these parameters is thoroughly examined in this paper. The properties of the nanocomposites obtained in the form of colloidal dispersions, films and hydrogels were examined for potential biomedical application.

For the characterization of synthesized silver/poly(vinyl alcohol) and silver/poly(vinyl alcohol)/graphene colloidal dispersions, ultraviolet and visible spectroscopy (UV-Vis) was used to verify the presence, yield and monitoring of the silver particle stabilization in colloidal dispersions obtained under different synthesis conditions, transmission electron microscopy (TEM) for determining the size and morphology of silver nanoparticles and cyclic voltammetry (CV) for determining the type of interactions between nanoparticulate silver, graphene and poly(vinyl alcohol). It was determined that the optimal parameters for the silver nanoparticles synthesis were in 10 wt. % PVA solution at a current density of 40 mA cm^{-2} and a synthesis time of 30 min. It was also found that the Ag/PVA/Gr colloidal dispersion had smaller dimensions AgNPs than those in Ag/PVA colloidal dispersion due to the presence of graphene sheets placed in-between the polymer-PVA chains that inhibited the growth, aggregation and agglomeration of silver nanoparticles.

The Ag/PVA and Ag/PVA/Gr films obtained by pouring colloidal dispersions in a thin layer and drying at a temperature of 60°C were analyzed by X-ray diffraction method (XRD) for determining the type of crystal lattice and silver crystal size, Fourier

transform infrared spectroscopy (FTIR) to determine the type of bond between silver nanoparticles, graphene and polymers, Raman spectroscopy to demonstrate the presence and structure of graphene, field-emission scanning electron microscopy (FE-SEM) for determining the microstructure and morphology of films, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) for identification of film surface composition, tensile test for determining mechanical properties of films and thermogravimetric analysis (TGA) for determining the thermal stability of films. The presence of silver in the crystalline form, as well as, the semicrystalline form of PVA were confirmed, nevertheless presence of silver nanoparticles and graphene sheets does not impair the semicrystalline structure of the PVA. Interactions between PVA polymer chains and silver nanoparticles in the case of Ag/PVA and Ag/PVA/Gr films were proved and also the interactions of Gr sheets situated between polymer chains in PVA/Gr and Ag/PVA/Gr films. The silver nanoparticles in the Ag/PVA/Gr film relative to the Ag/PVA are of smaller dimensions and/or are less aggregated due to the presence of Gr sheets placed between the polymer chains. An improvement of the mechanical properties by the presence of graphene and silver nanoparticles in a polymer matrix of PVA was demonstrated, where a significant increase in the tensile strength of 56 % for PVA/Gr, 23.8 % for Ag/PVA/Gr and 6.3% for Ag/PVA in comparison to a PVA polymer film were achieved. Tensile strength was also increased approx. for 20 % in PVA/Gr and Ag/PVA/Gr films in respect to PVA film. Thermogravimetric analysis showed an improvement in thermal stability in the presence of graphene in PVA/Gr and Ag/PVA/Gr films.

Hydrogel PVA, PVA/Gr, Ag/PVA and Ag/PVA/Gr were obtained by sequential freezing at -18 °C and thawing at 4 °C of the corresponding colloidal dispersions. Various methods of characterization of the obtained hydrogels were employed, atomic absorption spectroscopy (AAS) was used to monitor the release of silver, the MTT cytotoxicity test for determining the degree of cytotoxicity and the agar diffusion test and test in suspension to determine the antibacterial properties of the hydrogels. Silver release kinetics from Ag/PVA and Ag/PVA/Gr nanocomposite hydrogels in SBF solution at 37 °C showed rapid release of silver during the first 3 days, i.e. 16 wt. % for Ag/PVA and 19 wt. % of silver in Ag/PVA/Gr hydrogel. After 28 days, both Ag/PVA and Ag/PVA/Gr hydrogels retained 76 % of the initial silver concentration as a result of the silver nanoparticles stability in the PVA matrix and

indicates that the residual amount of silver can preserve the sample sterility over time. The antibacterial properties of Ag/PVA and Ag/PVA/Gr hydrogels against bacterial strains *Escherichia coli* (ATCC-25922) and *Staphylococcus aureus* TL, as well as PVA/Gr hydrogel effect against *E. coli* (ATCC-25922), have been demonstrated. The MTT test of cytotoxicity showed that PVA and PVA/Gr films can be classified as mildly cytotoxic, which was also shown for PVA/Gr hydrogel, while the PVA hydrogel can be classified as non-toxic when tested against healthy immunocompetent mononuclear peripheral blood cells (PBMCs) and also when PBMC cells were stimulated for proliferation by mitogen (PBMC + PHA).

The experiments were performed at the Department of Physical chemistry and Electrochemistry, Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, while the antibacterial activity experiments were performed in the microbiology laboratory at the Department of Biochemical Engineering and Biotechnology. Cytotoxicity tests were performed in the Institute of Oncology and Radiology, Belgrade, Serbia.

Keywords: electrochemical synthesis, nanocomposites, silver nanoparticles, poly(vinyl alcohol), graphene

Scientific area: Technological Engineering

Scientific sub-area: Chemical Engineering

UDC number:

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DEO.....	3
2.1. POLIVINIL-ALKOHOL.....	3
2.1.1. POLIVINIL-ALKOHOL HIDROGELOVI.....	5
2.2. SREBRO I NANOČESTICE SREBRA.....	15
2.2.1. ELEKTROHEMIJSKA SINTEZA NANOČESTICA SREBRA.....	16
2.2.2. KOMPOZITI POLIMERA I NANOČESTICA SREBRA.....	19
2.2.3. MEHANIZAM ANTIMIKROBNOG DEJSTVA I CITOTOKSIČNOST SREBRA.....	22
2.3. GRAFEN I OBLICI GAFENA.....	26
2.3.1. ANTIBAKTERIJSKA SVOJSTVA GRAFENA.....	29
3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	32
4. EKSPERIMENTALNI DEO.....	34
4.1. MATERIJALI.....	34
4.2. PRIPREMA UZORAKA.....	35
4.2.1. ELEKTROHEMIJSKA SINTEZA Ag/PVA I Ag/PVA/Gr KOLOIDNIH DISPERZIJA.....	35
4.2.2. PRIPREMA FILMOVA.....	36
4.2.3. PRIPREMA HIDROGELOVA.....	36
4.3. METODE KARAKTERIZACIJE.....	37
4.3.1. UV-VIDLJIVA SPEKTROSKOPIJA.....	37
4.3.2. TRANSMISIONA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA.....	37
4.3.3. CIKLIČNA VOLTAMetriJA.....	37
4.3.4. INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA SA FURIJEVOM TRANSFORMACIJOM.....	37
4.3.5. DIFRAKCIJA X-ZRAKA.....	38
4.3.6. RAMANSKA SPEKTROSKOPIJA.....	38
4.3.7. SKENIRAJUĆA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA.....	38
4.3.8. FOTOELEKTRONSKA SPEKTROSKOPIJA X-ZRACIMA.....	38
4.3.9. MEHANIČKA SVOJSTVA (TEST ISTEZANJA).....	39
4.3.10. TERMOGRAVIMETRIJSKA ANALIZA.....	39
4.3.11. ATOMSKA APSORPCIONA SPEKTROSKOPIJA.....	39
4.3.12. MTT TEST CITOTOKSIČNOSTI.....	39
4.3.13. ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST.....	40

5. REZULTATI I DISKUSIJA.....	42
5.1. Ag/PVA i Ag/PVA/Gr NANOKOMPOZITNE KOLOIDNE DISPERZIJE.....	42
5.1.1. UTICAJ KONCENTRACIJE PVA U Ag/PVA KOLOIDNOJ DISPERZIJI NA SINTEZU NANOČESTICA SREBRA.....	42
5.1.2. UTICAJ GUSTINE STRUJE I VREMENA NA SINTEZU NANOČESTICA SREBRA U Ag/PVA KOLOIDNOJ DISPERZIJI.....	45
5.1.3. UTICAJ GRAFENA NA SINTEZU NANOČESTICA SREBRA U Ag/PVA/Gr KOLOIDNOJ DISPERZIJI.....	47
5.1.4. CIKLIČNA VOLTAMetriJA.....	52
5.2. NANOKOMPOZITNI FILMOVI.....	56
5.2.1. INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA SA FURIJEOVOM TRANSFORMACIJOM.....	57
5.2.2. DIFRAKCIJA X-ZRAKA.....	60
5.2.3. RAMANSKA SPEKTROSKOPIJA.....	62
5.2.4. FOTOELEKTRONSKA SPEKTROSKOPIJA X-ZRACIMA.....	64
5.2.5. MEHANIČKA SVOJSTVA.....	66
5.2.6. TERMIČKA STABILNOST.....	69
5.2.7. MTT TEST CITOTOKSIČNOSTI.....	72
5.3. NANOKOMPOZITNI HIDROGELOVI.....	74
5.3.1. OTPUŠTANJE SREBRA.....	74
5.3.2. MTT TEST CITOTOKSIČNOSTI.....	76
5.3.3. ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST.....	79
6. ZAKLJUČCI.....	82
7. LITERATURA.....	84

1. UVOD

Materijali, prirodnog ili sintetičkog porekla, koji se koriste za interakciju sa biološkim sistemima nazivaju se biomaterijali [1–3]. Biomaterijali za lečenje bolesti i povreda kod ljudi koriste još od starog veka, ipak rapidna upotrebu biomaterijala počinje sredinom XIX veka kada se koriste prvi metalni dodaci kod fraktura kostiju. 1938. godine izvedena je prva zamena kuka, dok se 50-tih i 60-tih godina XX veka polimeri prvi put koriste kao zamena kod krvnih sudova i rožnjače [4].

Pod dele biomaterijala su brojne i raznovrsne po različitim kriterijumima. Ipak, najčešća je podela biomaterijala na metalne, keramičke, polimerne i kompozitne [2,5–7]. Zajedničko svojstvo svih biomaterijala bez obzira na njihove različitosti je biokompatibilnost, što znači da je potrebno da se izbegne svaki negativan imunološki odgovor organizma [4,8,9]. Pri sintezi i dizajnu biomaterijala potrebno je da budu zadovoljena odgovarajuća mehanička svojstva slična svojstvima zamenjenih tkiva, biološka inertnost i biokompatibilnost [10,11].

Polimerni hidrogelovi spadaju u grupu materijala koja se brzo razvija sa širokom primenom u mnogim oblastima posebno u farmaceutskoj industriji i medicini [12–14]. Biokompatibilni polimeri predstavljaju veliku grupu jedinjenja, stoga postoji više klasifikacija. Najčešća je podela makromolekula prema njihovom poreklu na prirodne ili sintetičke, načinu razgradnje na biodegradibilne ili nebiodegradibilne, prema fizičko-hemijskim svojstvima i oblasti primene [13,15–17]. Brojne su oblasti medicine u kojima se koriste hidrogelovi, u oftamologiji kao kontaktna sočiva, veštačke rožnjače, u hirurgiji kao šavovi koji se absorbuju, pri povredama na koži kao obloge za rane, kao i u mnogim drugim područjima kliničke prakse. Takođe, koriste se u veoma naprednim aplikacijama, inženjerstvu mekih tkiva i u regenerativnoj medicini kao zamena za zglobnu hrskavicu, međjupršljenske diskove, ligamente, tetive, kožu. Mogu se koristiti u prevenciji tromboze, kao sistemi za otpuštanje lekova, za oblaganje biosenzora i za transplantaciju ćelija [13,15,18–22].

Sinteza nanočestica metala kao što su zlato, srebro, bakar i cink privlačna je širokom istraživačkom polju zbog mogućnosti praktične primene u mnogim oblastima kao što je mikroelektronika, optika, medicina i farmacija. U oblasti medicine i farmacije naročito su nanočestice srebra predmet istraživanja zbog svojih antibakterijskih, antivirusnih i antifungicidnih svojstva. Upravo je ovaj fenomen privukao pažnju istraživača zbog povećane rezistencije na antibiotike koja je pruzrokovana njihovim prekomernim korišćenjem, gde korišćenje nanočestica srebra za razliku od antibiotika ne stvara rezistentnost prema mikroorganizmima [23–26]. Pri upotrebi nanočestica srebra veoma je važno kontrolisati tj. stabilizovati njihovu veličinu i oblik. Jedan od načina stabilizacije je uvođenje nanočestica u polimernu matricu [27]. Izbor polimerne matrice je veoma važan, posebno kod primene u oblasti medicine. Polivinil-alkohol (PVA) je jedan od često korišćenih polimera zbog svoje biokompatibilnosti i dobrih hemijskih i fizičkih svojstava. PVA je rastvorljiv u vodi, poseduje dobru termostabilnost, sposobnost da formira hidrogelove, nisku citotoksičnost, lako se obrađuje i poseduje visoku propustljivost prilikom formiranja filmova [28,29]. Inkorporacija nanočestica srebra u PVA polimernoj matrici može pružiti antibakterijsku aktivnost što je poželjno prilikom korišćenja u oblastima medicine i farmacije [30].

Grafen je izolovana dvodimenzionalna kristalna struktura sačinjena od atomski pojedinačnih slojeva grafita, gde su sp^2 hibridizovani atomi ugljenika raspoređeni kao ravan pčelinjeg saća [31,32]. Zbog svog specifičnog prostornog rasporeda, grafen poseduje jedinstvena svojstva kao što su, izuzetna toplotna provodljivost, visok Jungov moduo elastičnosti, velika specifična površina i visoka električna provodljivost [31,33,34]. Kompoziti polimer/grafen poslednjih godina privlače veliku pažnju jer se dodatak grafena u malim koncentracijama od 1, čak i 0,1 % značajno, čak i višestruko poboljšavaju termička, električna i mehanička svojstva polimera [31,34,35]. Grafen se zbog svoje biokompatibilnosti koristi u biomedicini kao biosenzor u dijagnostici, kao deo nosača lekova, u fotothermalnoj terapiji. Takođe novija istraživanja pokazuju antibakterijsku aktivnost grafena što ga čini veoma poželjnim za upotrebu u biomedicinskim primenama [36–40].

2. TEORIJSKI DEO

2.1. POLIVINIL-ALKOHOL

Polimeri kao velika grupa jedinjenja zbog svojih raznovrsnih svojstava su veoma pogodni za primenu u biomedicini. U zavisnosti od izbora, polimeri mogu biti fleksibilni ili kruti, mogu imati visoku ili nisku čvrstoću, mogu biti otporni na vezivanje proteina, a takođe mogu i podsticati vezivanje proteina. Različitim metodama moguće ih je oblikovati u veoma složene oblike. Takođe, jedno od veoma bitnih svojstava je da mogu biti nebiodegradibilni (biostabilni, nerazgradivi) ili biodegradibilni (biorazgradivi) [4,18,41–43]. Stoga, česta je podela polimernih biomaterija, pored podele na prirodne i sintetičke, na nedegradibilne i biodegradibilne.

Termin nedegradibilni se koristi da bi sugerisao da su polimeri otporni na degradaciju hidrolitičkim, enzimskim i drugim hemijskim mehanizmima u biološkom okruženju [44,45]. Polietilen ultra visoke molekulske mase (UHMWPE) i polietilen visoke gustine (HDPE) se najčešće primenjuju u medicinskoj praksi. UHMWPE se primenjuje kod implanta kuka i kolena kao i veštačkog zgloba [46,47].

Biodegradacija, uže definisana za oblast biomedicine predstavlja proces, koji se odvija kroz enzimске reakcije i/ili hemijsko razlaganje, i koji je povezan sa živim organizmima ili njihovim produktima lučenja [48,49]. Biodegradibilni polimeri po osnovu porekla mogu biti prirodnog porekla kao što su škrob, derivati celuloze, hitozan, alginat, kolagen, želatin, kazein i sintetički kao što su glikol, polilaktidi, polilaktoni, polivinil-alkohol, polikarbonati, aromatični poliestri [48,50–52].

Polivinil-alkohol (PVA) sintetički, biokompatibilni i biodegradibilni polimer ima relativno jednostavnu hemijsku strukturu ($-\text{[CH}_2\text{-CH-OH]}_n-$). Vinil alkohol ($\text{CH}_2=\text{CH-OH}$), kao monomer, ne može se izolovati ili dobiti u visokim koncentracijama tj. ne postoji u stabilnom već u svom tautomernom obliku acetaldehidu ($\text{CH}_3\text{-CH=O}$) [53]. U praksi PVA se najčešće dobija hidrolizom polivinil-acetata

(PVAc). Reakcija hidrolize PVAc nikada nije potpuna već uvek postoji određeni ostatak acetatnih grupa u polimeru PVA. Stoga, može se reći da je PVA kopolimer PVA i PVAc. Stepenu hidrolize se određuje na osnovu molarnog procenta zamene acetatnih grupa hidroksilnim. Za stepenu hidrolize od 85-90 mol % smatra se da je hidroliza parcijalna, 93-97 mol % srednja i ukoliko je stepenu hidrolize 98-99 mol % može se reći da je hidroliza potpuna [54]. Stepenu polimerizacije (odnos relativne molekulske mase polimera prema masi monomera) kreće se od ispod 300 do preko 4000.

Svojstva PVA polimera zavise od načina dobijanja, molarne mase, stehiometrijskog rasporeda jedinica u polimernom lancu, stepena polimerizacije i stepena hidrolize. Svojstva kao što su viskoznost, otpornost na rastvarače, čvrstoća prijanjanja, zatezna čvrstoća, formiranje filma su veća i poboljšana sa porastom molarne mase i stepena hidrolize. Temperatura ostakljivanja kreće se u rasponu 75-85 °C, dok se temperatura topljenja kreće u rasponu 180-228 °C i primarno zavise od stepena hidrolize i stehiometrijskog rasporeda jedinica u polimernom lancu. Sa porastom stepena hidrolize raste i kristaličnost polimera što je u vezi sa rastom međumolekulskih sila, a takođe dolazi do porasta temperature ostakljivanja i topljenja [53,55,56]. S druge strane, smanjenjem stepena hidrolize i molarne mase raste rastvorljivost PVA u vodi, takođe i adhezija na hidrofobnijim površinama kao i elastičnost [53,54,57]. PVA se osim u vodi može rastvoriti u polarnim i hidrofilnim rastvaračima ili smešama rastvarača, kao što su dimetil sulfoksid (DMSO), etilen glikol, N-metil pirolidon, acetanamid, dimetilformamid. Vodenim rastvorima PVA stajanjem tj. starenjem povećava se viskoznost i pri dovoljno visokim koncentracijama polimera dolazi do formiranja gela. Stepenu geliranja je veći na nižim temperaturama i pri većim koncentracijama polimera kao i kod polimera sa većim stepenom hidrolize [54].

PVA filmovi kao i osušena vlakna poseduju polu-kristalnu strukturu. Voda ima veliki uticaj na kristalna svojstva PVA. PVA filmovi ili osušena vlakna dobijeni iz vodenih rastvora sadrže veoma malo zaostale vode u (100) ravni; zaostala voda nalazi se u hidratisanom obliku i ne može se istisnuti iz rešetke što doprinosi stvaranju više vodoničnih veza između PVA molekula. Dodavanjem vode, vodonične veze se ne mogu raskinuti na sobnoj pa čak i na povišenim temperaturama. PVA kao tipičan polivalentni alkohol podleže karakterističnim reakcijama za alkohole, acilaciji, esterifikaciji, građenju kompleksa sa neorganskim komponentama [55].

Uprava za hranu i lekove SAD (*eng.* Food and Drug Administration FDA ili USFDA) dozvolila je upotrebu PVA u raznim medicinskim i farmaceutskim primenama kao što su transdermalni flasteri, želei za nanošenje na kožu, umrežene mikrosfere za kontrolisano otpuštanje lekova za oralnu upotrebu, kao komponenta veštačkih suza zbog dobre disperzije i prekrivanja [58].

PVA spada u nekoliko vinilnih polimera koji mogu imati veću stopu biorazgradljivosti. Birazgradljivost se može pripisati prisustvu hidroksilnih grupa kao i hidrofilnoj prirodi PVA polimera. Razgradnja gljivama i bakterijama proučavana je u otpadnim vodama, zemljištu, kompostima, pod anaerobnim i aerobnim uslovima [59–63].

2.1.1. POLIVINIL-ALKOHOL HIDROGELOVI

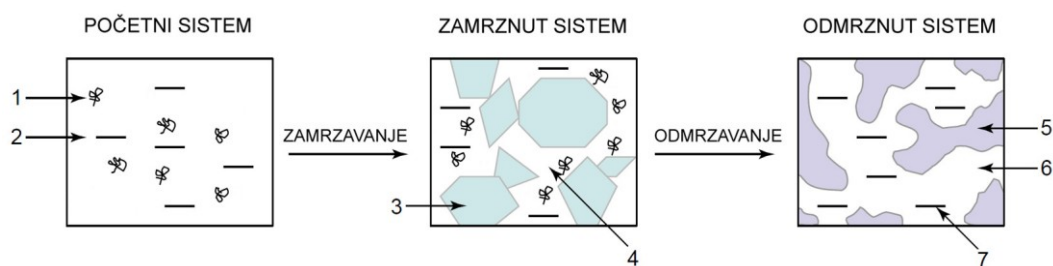
Primena PVA u raznim oblastima, posebno medicine i farmacije često zahteva njegovo umrežavanje, tj. PVA u obliku hidrogela. Hidrogelovi na bazi PVA postali su posebno privlačni na poljima inženjerstva tkiva i regenerativne medicine kao matrica za zamenu i regeneraciju širokog spektra tkiva i organa zbog svoje netoksičnosti, nisu kancerogeni i imaju bioadhezivne karakteristike [64,65].

Dobijanje hidrogelova na bazi PVA može se postići hemijskim umrežavanjem pri čemu se koriste najčešće glutraldehid, glioksal, borati, kao i radijaciono-hemijskim metodama γ -zračenjem [64,66–69]. Međutim ove metode, naročito hemijsko umrežavanje mogu dovesti do neželjenih efekta pri krajnjoj upotrebi, naročito u medicinske i farmaceutske svrhe zbog zaostatka hemijskih supstanci koje su korišćene prilikom umrežavanja i uglavnom su toksične. Iz tog razloga dosta često se koristi fizička metoda koja podrazumeva ciklično ponavljanje zamrzavanja i odmrzavanja (*eng.* freezing-thawing) polimernog rastvora [70–73], koja podrazumeva ciklično zamrzavanje PVA rastvora na temperaturama ispod 0 °C i odmrzavanje na temperaturama iznad 0 °C. Gel sintetisan na ovaj način naziva se kriogel (*grčki* κριος - krios – sa značenjem mraz ili led) [74–76].

Struktura hidrogela (kriogela) PVA dobijena metodom zamrzavanja/odmrzavanja sastoji se iz tri faze: vodena faza (sa niskom koncentracijom PVA),

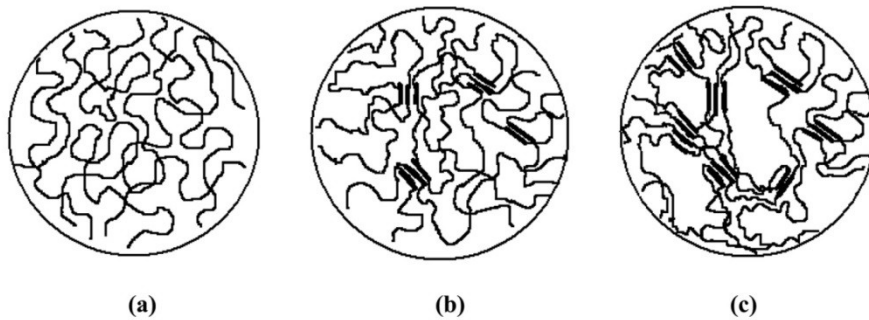
amorfna faza i kristalna faza koja delimično ograničava kretanje amorfni PVA lanaca [70].

Dobijanje PVA hidrogelova (kriogelova) počinje zamrzavanjem rastvora PVA na temperaturama ispod temperature mržnjenja rastvarača (u slučaju vodenog rastvora ispod 0 °C) kada dolazi do zamrzavanja rastvarača tj. stvaranja kristala leda. Kristali rastu tokom zamrzavanja i spajaju se okolnim kristalima. Nakon postepenog odmrzavanja na mestima odmrznutih kristala nastaju makropore u hidrogelu i polja obogaćena polimerom tzv. mikrofaze. Prilikom postepenog zamrzavanja i stvaranja kristala rastvarača dolazi do potiskivanja tj. grupisanja polimernih lanca koji međusobno reaguju stvaranjem intermolekulskih vodoničnih veza između bočnih –OH grupa polimernog lanca stvarajući umrežena polja (tačke) u hidrogelu (slika 2.1) [75,77–79]. Broj umreženih polja raste sa povećanjem brojem ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja, a samim tim i stepen umreženosti hidrogela (slika 2.2) [80–82]. Osim broja ciklusa, stepen umreženosti hidrogela zavisi i od koncentracije PVA u rastvoru, gde je stepen umrežavanja veći ukoliko je i koncentracija rastvora veća. Takođe, stepen umreženosti zavisi i od dužine polimernog PVA lanca, kao i od stepena hidrolize samog PVA molekula, gde ukoliko je veći stepen hidrolize veći je i stepen umrežavanja [53,73].



Slika 2.1 Šematski prikaz procesa zamrzavanja/odmrzavanja PVA hidrogela.

1: makromolekuli u rastvoru; 2: rastvarač; 3: kristali zamrznutog rastvarača; 4: nezamrznuta tečna mikrofaza; 5: polimerna mreža; 6: makropore; 7: rastvarač [74].



Slika 2.2 Šematski prikaz PVA lanca pre i posle ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja: a) PVA rastvor pre prvog ciklusa , b) PVA hidrogel nakon prvog ciklusa i c) nakon n ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja [79].

Karakteristike koje je potrebno da PVA hidrogel poseduje zavise od mesta krajnje upotrebe. U medicini i farmaciji ukoliko je potrebno da PVA hidrogel poseduje dobra mehanička svojstva (npr. veštačka hrskavica) biće podvrgnut većem broju ciklusa prilikom sinteze. Ukoliko se PVA hidrogel koristi kao nosač lekova ili ćelija gde je adhezivnost od većeg značaja u odnosu na mehanička svojstva biće podvrgnut manjem broju ciklusa prilikom sinteze jer je pokazano da se najbolja adhezivnost postiže posle 2 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja [53,73,76].

PVA hidrogelovi poseduju elastičnost i sposobnost bubrenja u vodi ili biološkom fluidu [83]. Stoga, PVA može da simulira prirodno tkivo koje se lako prihvata u telu. PVA hidrogelovi su pokazali da imaju potencijal za zamenu mekih tkiva, veštačku hrskavicu, veštačku kožu, katetere, veštački pankreas i membrane za hemodijalizu [65,83–85].

Obimna su istraživanja primene hidrogelova na bazi PVA kao zamene zglobne hrskavice zbog sposobnosti da oponaša ljudsko tkivo. Da bi se poboljšala mehanička svojstva kao i druge karakteristike često se PVA kombinuje sa drugim biomaterijalima. Holloway i saradnici [86] su dodavanjem polietilena ultra visoke molekulske mase (UHMWPE) i vlakna polipropilena (PP) prilikom sinteze hidrogelova znatno poboljšali mehanička svojstva hidrogelova PVA. Modul elastičnosti 20 mas. % PVA iznosio je $0,23 \pm 0,02$ MPa, dodavanjem 10 vol. % PP modul se povećao do $8,3 \pm 0,6$ MPa, dok je dodatkom 29 vol. % UHMWPE modul elastičnosti povećan do $258 \pm 40,1$ MPa. Modul elastičnosti ljudske hrskavice se kreće 2-295 MPa. Poboljšanje implanta veštačke zglobne hrskavice može se postići i dodavanjem hidroksiapatita (HA) čime se značajno

poboljšavaju mehanička svojstva, tj. bolja raspodela sila deformacije i prigušenje opterećenja što je naročito bitno pri opterećenju hrskavice na okolno tkivo tokom kretanja. Osim mehaničkih svojstva, nanočestice HA inkorporisane u PVA polimernu matricu podstiču bolje vezivanje za kost i diferencijaciju mezenhimskih matičnih ćelija do osteoblasta [10,29,87,88].

Huang i saradnici [89] su dodatkom od 2 mas. % PVP polimera i 1 mas. % višeslojnih ugljeničnih nanocevi (MWCNT) dobili poboljšanje od 133 % zatezne čvrstoće MWCNT–PVP/PVA hidrogela tj. 4.20 ± 0.13 MPa u odnosu na čist PVA hidrogel 1.80 ± 0.05 MPa, kao i smanjeni koeficijent trenja koji se pripisuje uticaju PVP polimera. Istraživanja su takođe pokazala moguću primenu PVA hidrogela u kombinaciji sa PVP kao zamenu za jezgro fibroznog prstena kičme koje usled poremećaja (hernijacije) može izazvati velike bolove u leđima usled pritiska na nerv. Mehanička ispitivanja su pokazala da hidrogel PVA/PVP (10 mas. %/1-5 mas.%) poseduje mehanička svojstva humanog jezgra i da je dobar kandidat za zamenu jezgra zdravog fibroznog prstena [90]. Bichara i saradnici [91] su uspešno konstruisali veštačku hrskavicu u vidu skafolda pomoću fleksibilnog PVA/Alginat hidrogela koji bi se koristio kao zamena facijalne hrskavice (nosa i ušiju). Izolovali su humane ćelije hondrocita nosne pregrade, ekspandirali i pomešali sa 2% hidrogelom alginata koju su ubrzgali u porozni PVA hidrogel. Ponašanje implanta je praćeno u bioreaktoru i *in vivo* kod miševa. Histološka analiza je pokazala sulfatni glikozaminoglikan i deponovanje kolagena tipa II kod obe grupe koje su praćene, kao i rast sadržaja DNK i hidroksiprolina što pokazuje da je ova vrsta hidrogela dobar kandidat za zamenu hrskavice. Na slici 2.3 vidi se primer veštačkog uva dobijenog od PVA hidrogela u kome je moguće zasejati ćelije hondrocita u porama hidrogela.



Slika 2.3. Veštačko uvo dobijeno oblikovanjem poroznog, fleksibilnog PVA hidrogela [91].

Transplantacija Langerhansovih ostrvca (područja pankreasa koja sadrže endokrine ćelije) uspostavljaju normalan metabolizam glukoze kod dijabetičara. Međutim, usled imunog odgovora dolazi do oboljevanja i smrti transplantiranih ćelija. Veštački pankreas nastoji da zaštiti transplantirana ostrvca od imunog odgovora što se postiže enkapsulacijom ćelija. PVA hidrogel je uspešno korišćen u tu svrhu jer upravo pore hidrogela omogućavaju dobru enkapsulaciju ćelija ostrvca pankreasa, što je i dokazano studijama na pacovima gde se tokom vremena nivo glukoze održavao na normalnom nivou u odnosu na kontrolnu grupu [85,92,93].

PVA hidrogelovi zbog svojih mehaničkih svojstava mogu se koristiti za meka kontaktna sočiva. Kombinacijom broja ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja i izborom PVA određenog stepena hidrolize mogu se postići dobra optička kao i mehanička svojstva kontaktnih sočiva. Kod određenih vrsta kontaktnih sočiva koja sadrže PVA, tokom nošenja se sam PVA postepeno oslobađa i tako obezbeđuje neophodnu vlažnost zbog svoje hidrofilitnosti simulirajući veštačke suze čime se obezbeđuje udobnost nošenja sočiva tokom dana i eliminišu deformacije samog sočiva [73,94].

Imobilizacija enzima kao bioloških katalizatora za odvajanje i prečišćavanje proizvoda iz reakcionog medijuma je ključna jer ukoliko je enzim direktno hemijski

umrežen može doći do nerastvaranja enzima, takođe je teško kontrolisati njegovo vezivanje i često dolazi do denaturacije samog enzima [33]. Imobilizacija enzima u polimernoj matrici kao što je PVA ili PVA u kombinaciji sa nekim kopolimerom (alginat, celuloza) daje dobre rezultate u pogledu poboljšanja stabilnosti i smanjenju denaturacije u širokom opsegu pH vrednosti, temperature i raznim organskim rastvaračima. U zavisnosti od načina formiranja polimerne matrice i metoda koje se tom prilikom koriste (hemijsko umrežavanje, ekstruzija) mogu se dobiti vlakna ili mikročestice sa inkapsuliranim enzimima koje nalaze primenu u širokoj oblasti enzimske tehnologije [95–97].

PVA/kopolimer hidrogelovi – istraživanje primene kod obloga za rane

Zaceljenje rana predstavlja kompleksan niz procesa koji traju od trenutka povrede do isceljenja, a koji mogu trajati mesecima, pa i godinama. Rane uglavnom proizvode eksudat koji se sastoji od tečnosti, ćelija ili drugih supstanci koje se postepeno luče ili ispuštaju iz ćelije ili krvnih sudova preko malih pora ili oštećenja na ćelijskim membranama. Suve rane obično imaju veće stope infekcija u odnosu na vlažne koje stvaraju okruženje koje stimuliše lečenje iz razloga što sastav eksudata sadrži lizosomalne enzime, bela krvna zrnca, limfokine i faktore rasta. Idealna obloga za rane je obloga koja održava vlažnim okruženje rane, absorbuje višak eksudata, eliminiše šupljine u ranama, ne šteti rani, daje toplotnu izolaciju i obezbeđuje barijeru protiv bakterija. Hidrogelovi na bazi PVA su odlični materijali i poseduju sva svojstva u pogledu zahteva obloga za rane. Poseduju sposobnost da absorbuju kontaminirane eksudate i bezbedno ih zadrže u strukturi gela, koja obezbeđuje mikroklimu koja stimuliše i reguliše sve ćelijske aktivnosti i nutricionne procese kroz faze izlečenja rane. Hidrogelovi na bazi PVA lako se uklanjaju sa rane bez bola i rizika od iritacije rane [12,30,69].

Da bi se poboljšala različita svojstva i zahtevi prilikom procesa izlečenja rana, često se PVA hidrogelu dodaje kopolimer, bilo prirodnog ili sintetičkog porekla. Hitozan (CS) je polimer prirodnog porekla koji se često kombinuje sa PVA prilikom izrade obloga za rane [98–100]. Sung i saradnici [99] su sintetisali hidrogel koji je

sadržao 5 % PVA, 0,75 % hitozana i 0.25 % minociklina. Iako je dodatak hitozana s jedne strane uticao na smanjenje mehaničkih i termičkih svojstava, s druge strane povećao je sposobnost bubrenja hidrogela, bolji protok vodene pare, elastičnost i poroznost hidrogela, kao i otpuštanje leka i adsorpciju proteina što su bitni faktori kod obloga za rane. Inkorporacija minociklina nije imala uticaja na promenu svojstva hidrogela, dok je proces izlečenja rana kod ispitivanja na pacovima bio ubrzan njegovom upotrebom. Osim hitozana, od prirodnih polimera često se koriste alginat, skrob, dekstran, želatin, hijaluronska kiselina [101–105]. Pregled uticaja kopolimera koji se koriste prilikom sinteze hidrogela na bazi PVA za obloge rana dat je u Tabeli 1.

Tabela 2.1. Pregled uticaja kopolimera na svojstva PVA/kopolimer hidrogela

Kopolimer	Uticaj kopolimera na svojstva hidrogela
hitozan [99,106]	Smanjena mehaničkih i termičkih svojstava, poboljšanje bubrenja gela, elastičnosti, poroznost, protok vodene pare
želatin [106]	Smanjena mehanička svojstva, poboljšani koagulacijski efekat
glina [105]	Poboljšava mehanička svojstva, stepen umrežavanja hidrogela. Smanjen stepen bubrenja hidrogela
glukan [107]	Smanjena mehanička svojstva (osim većeg istezanja), ubrava zarastanje rana
alginat [108,109]	Smanjena mehanička svojstva (osim većeg istezanja), veći stepen bubrenja hidrogela
PVP [69,110]	Veći stepen bubrenja, istezanje i adhezivnost

Fan i saradnici [106] su sintetisali hitozan/želatin/polivinil-alkohol (CS/Gel/PVA) hidrogel metodom γ -zračenja sa ciljem upotrebe kao obloge za rane, gde su rastvori CS/Gel različitih masenih odnosa (1:3, 1:2, 1:1, 2:1 i 3:1) pomešani sa 5 mas. % rastvorom PVA. Istraživanja mehaničkih svojstava i stepena bubrenja dobijenih hidrogelova pokazuju da hidrogelovi sa manjim sadržajem želatina i većim sadržajem hitozana imaju bolja mehanička svojstva (zatezna čvrstoća 0,9-2,2 MPa) i stepen bubrenja (20-40 %). Takođe, ispitivanjem indeksa koagulacije krvi (*eng.* blood clotting

index BCI) pokazan je dobar koagulacioni efekat kod svih hidrogelova, dok je najniži kod CS/Gel 1:1 hidrogela što pokazuje da ima najbolji koagulacioni efekat koji je poželjan prilikom procesa izlečenja rana. Pomenuta svojstva čine CS/Gel/PVA dobrim kandidatom za primenu obloga za rane.

Kokabi i saradnici [105] da bi poboljšali svojstva PVA hidrogela dodali su monmorionitsku glinu. PVA/glina hidrogel dobijen je metodom zamrzavanja/odmrzavanja (3 ciklusa 24 h na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 24 h na $23\text{ }^{\circ}\text{C}$). Koristili su 15 mas. % ratvor PVA u koji su dodavali glinu (2, 5, 7 i 10 mas. % u odnosu na masu PVA). Uočeno je da sa većim sadržajem gline linerano raste i udeo gela tj. veći je stepen umrežavanja što se pripisuje interakcijama funkcionalnih grupa gline i polimernog lanca PVA. S druge strane uočen je linerni pad stepena bubrenja i sadržaja vode što je posledica većeg udela gela, tj. većeg stepena umrežavanja. Uticaj gline se ogleda i u poboljšanju mehaničkih karakteristika gela gde je utvrđeno da dodatak od 10 mas. % gline 3,2 puta povećava istezanje dok je Jungov modul povećan za 27%. Poboljšanje mehaničkih karakteristika je povoljno kod rana koje su izložene mehaničkim naprezanjima.

Da bi se ubrzao proces izlečenja rane, bidegradibilni β -glukan je još jedan od polimera koji je ispitivan sa ciljem dobijanja što bolje obloge za rane. Huang i Yang [107] su iz PVA/glukan vodenih rastvora izlivali polimerne filmove i sušili na $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ bez prethodnog hemijskog umrežavanja. Sadržaj glukana u polimeru filmu je varirao od 7-50 mas. %. Proces izlečenja rana praćen je na pacovima. Pokazano je brže zarastanje rana prilikom primene PVA/glukan filmova, tj. zarastanje rana kod PVA/glukan filmova 11. dana je isto kao 21. dana prilikom upotrebe pamučne gaze što je pokazuje 48 % veću efikasnost. Brže zarastanje rana može se pripisati lakom otpuštanju glukana usled slabih veza sa PVA polimerom lancem. S druge strane povećano otpuštanje glukana u početnim fazama izlečenja može usporiti zarastanje rane. PVA/glukan filmovi pokazuju slabije mehaničke karakteristike u odnosu na PVA film, sa povećanjem sadržaja glukana smanjuje se zatezna čvrstoća filma i Jungov modul, dok s druge strane istezanje je veće sa većim sadržajem glukana. Može se zaključiti da pogodnim izborom koncentracije glukana, PVA/glukan film može biti potencijalno dobra obloga za rane, naročito kod rana koje nisu izložene mehaničkim opterećenjima.

Xie i saradnici [108] su sintetisali PVA/natrijum-alginat hidrogel mešajući 5 mas. % PVA i 5 mas. % natrijum alginat rastvora u odnosima 75/25, 50/50 i 25/75. Gelove su dobili umrežavanjem PVA metodom zamrzavanja/odmrzavanja 22 h na -18°C i 2 h na sobnoj temperaturi ispitujući uticaj broja ciklusa (1–6) i naknadnim potapanjem u vodeni rastvor CaCl_2 sa ciljem umrežavanja alginata. Udeo gela u dobijenim uzorcima sa manjim sadržajem alginata (0 i 25 %) više zavise od broja primenjenih ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja dok kod uzoraka hidrogelova koji imaju veći udeo alginata (50 i 75 %) uticaj broja ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja je neznatan na udeo gela u dobijenim uzorcima jer se umrežavanje alginata vrši pod uticajem CaCl_2 . Uticaj alginata na mehanička svojstva je takođe ispitan. Sa porastom koncentracije alginata zatezna čvrstoća opada, za sadržaj alginata od 0, 25, 50 i 75 % iznosi 263, 192, 102 i 50 kPa, redom, dok istezanje najpre raste za 0, 25, 50 %, i iznosi 275, 309, 380 %, redom, i za 75 % opada i iznosi 106%. Jungov moduo prati obrnuti trend u odnosu na istezanje, najpre opada i zatim za sadržaj alginata od 75 % ponovo raste. Ispitivanjem uticaja stepena bubrenja u odnosu na udeo alginata pri $\text{pH}=1,2$ i fiziološkim vrednostima $\text{pH}=7,4$ Xie i saradnici su zaključili da pri $\text{pH}=1,2$ udeo alginata ne utiče na stepen bubrenja dok pri $\text{pH}=7,4$ stepen bubrenja raste sa većim sadržajem alginata što je posledica elektrostatičkog odbijanja negativno naelektrisanih $-\text{COO}^-$ grupa alginata čime dolazi do istezanja mreže hidrogela, dok pri $\text{pH}=1,2$ nema elektrostatičkog odbijanja karboksilne $-\text{COOH}$ grupe pošto nije u svom jonskom obliku.

Tarun i Gobi [109] su metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrospininga dobili vlakna polivinil-alkohola i alginata. Za dobijanje vlakna koristili su rastvora PVA 7 mas. % i natrijum-alginata 4 mas. % koje su mešali u odnosima 90:10, 80:20 i 70:30 (PVA/natrijum-alginat). Prilikom procesa izlečenja rana bitan faktor je održavanje vlažne sredine kako bi se izlečenje ubrzalo. Sa porastom sadržaja alginata difuzija vodene pare kroz gel opada čime se vlažna sredina rane može održati kroz duži period. Ispitivanja antibakterijske aktivnosti agar difuzionom metodom prema bakteriji *Staphylococcus aureus* pokazuje da se zona inhibicije povećava kod PVA/alginat vlakna u odnosu na kontrolni uzorak i to najviše kod vlakna koja su dobijena mešanjem u odnosu 70:30. Takođe, ispitivanjem procesa izlečenja rana na pacovima PVA/alginat vlakna pokazuju brži proces izlečenja tj. nakon 5 dana ubrzano zarastanje reza je $\sim 30\%$

dok je nakon 8 dana povećan rast ćelija epitela na površini rane u odnosu na kontrolni uzorak.

Od sintetičkih polimera, polivinil-pirolidon (PVP) je često izučavani polimeri za primenu kod obloga za rane. PVP poboljšava mehanička svojstva kao što su elastičnost i fleksibilnost, doprinosi boljoj stabilnosti nabubrelog hidrogela kao i smanjenju permeabilnosti prema bakterijama [69,111,112].

Singh i Pal [69] sintetisali su strekulia guma (*eng.* strekulia gum - prirodni polisaharid)/PVA/PVP hidrogel. Prilikom izbora optimalnih parametara sadržaj strekulia gume variran je od 0,025 do 0,125 g, PVA od 0,050 do 0,250 g, N-vinil pirolidon (NVP) od 0,94 do 4,69 mmol, doza zračenja γ -zracima od 8,42 do 50,54 kGy i sadržaj vode 10-15 mL. Kao optimalni parametri izabrani su strekulia guma 0,125 g, PVA 0,250 g, NVP 4,69 mmol, doza gama zračenja 25,17 kGy i 13 mL vode. Sa povećanjem koncentracije PVA i PVP polimera u hidrogelu raste i stepen bubrenja s tim što je stepen bubrenja veći sa povećanjem PVP polimera pošto je hidrofilniji u odnosu na PVA. S druge strane, povećanjem doze zračenja bubrenje hidrogela najpre raste, a zatim daljim povećanjem opada, što se povezuje sa dostizanjem optimalne veličine pore hidrogela sposobne da primi veću količinu tečnosti iako povećanje doze zračenja izaziva veće umrežavanje hidrogela.

Razzak i saradnici [110] su sintetisali PVA/PVP hidrogel mešajući vodene rastvore PVA (20 mas. %) i PVP (8 mas. %) u odnosu PVA/PVP 40:60 dobijajući hidrogel γ -zračenjem (varirane doze zračenja 0-60kGy) sa ciljem ispitivanja uticaja na mehanička svojstva. Zatezna čvrstoća i istezanje, u zavisnosti od primenjene doze zračenja najpre rastu, a zatim opadaju. Maksimum dostižu pri dozi zračenja od 20 kGy. Prilikom ispitivanja bubrenja hidrogela, adhezivnosti i difuzije vodene pare u hidrogelu je varirana koncentracija PVP od 2,4 do 7,2 mas. %. Ispitivanja pokazuju da sa porastom koncentracije PVP u hidrogelu raste i stepen bubrenja kao i adhezivnost dok difuzija vodene pare opada tj. kreće se u rasponu 80–200 g/m²/h što je idealan raspon prilikom procesa izlečenja rana, jer veće vrednosti mogu izazvati naglo isušivanje rane dok niže vrednosti mogu izazvati akumulaciju eksudata i potencijalno ubrzati bakterijske infekcije.

Osim polimera, kao deo kompozita obloga za rane mogu se naći oksidi metal, kao što je ZnO koji pokazuje antikaterijska svojstva, kao i AgNO₃, srebro sulfadiazin i srebrne nanočestice sa takođe antimikrobnim svojstvima [30,103].

2.2. SREBRO I NANOČESTICE SREBRA

Iako je upotreba srebra u medicinske svrhe poznata od davnih vremena, najviše za lečenja rana i čireva na koži, u godinama oko II svetskog rata, sve širom upotrebom antibiotika zainteresovanost za srebro u medicinske svrhe prestaje. Upotreba antibiotika je i dalje veoma značajna, međutim, njihova prekomerena upotreba izaziva povećanu rezistentnost bakterija. Stoga, upotreba srebra dobija ponovo na značaju prilikom upotrebe u medicinske svrhe, naročito kod lečenja rana i opekotina na koži.

Poslednjih decenija srebro se intenzivno koristi u obliku nanočestica, strukturama veličine 1-100 nm. Zbog male veličine, nanočestice poseduju veliku specifičnu površinu, tj. veliki odnos površina/zapremina čime se svojstva nanočestica znatno razlikuju od metala većeg volumena i zbog toga imaju širok spektar upotreba [113–116].

Nanočestice se mogu sintetisati iz metalnog oblika gde se fizičkim metodama dobija srebro u obliku nanočestica. Metoda kondenzacije para metala spada u široko korišćenu fizičku metodu, međutim nedostaci su velika potrošnja energije i vremena. Poznata je i upotreba lasera (laserska ablacija) u rastvoru vode u kome se nalazi metalno srebro gde se delovanjem lasera na metal dobija vodeni rastvor koloidnog srebra [117–119]. Tehnika gama-zračenjem u vodenim rastvorima soli srebra takođe je korišćena fizička metoda gde upotreba gama-zraka dovodi do redukcije jona srebra [120].

Sinteza nanočestica srebra može se takođe, izvesti hemijskom [117,118], fotohemijskom [121] i elektrohemijskom redukcijom [122–126] u rastvorima soli srebra.

2.2.1. ELEKTROHEMIJSKA SINTEZA NANOČESTICA SREBRA

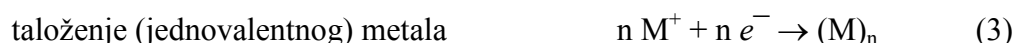
Elektrohemijska sinteza nanočestica srebra podrazumeva elektrohemijsku redukciju jednovalentnih jona srebra pomoću električne struje u rastvoru i može se predstaviti sledećom jednačinom:



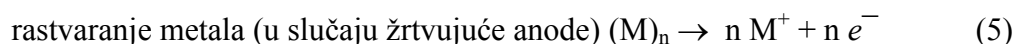
Elektrohemijskim putem nanočestice srebra se mogu dobiti korišćenjem žrtvujuće anode od srebra kao rastvorne elektrode putem elektrolize [127–130] ili elektrohemijskom redukcijom jona srebra koji se nalaze u elektrolitičkom rastvoru [124,131].

Kada se elektrohemijska sinteza nanočestica metala vrši u vodenim rastvorima dolazi do taloženje jona plemenitih metala na katodi. Naime, taloženje metalnog filma na površini katode je termodinamički stabilan proces [130], tokom kog se odigravaju reakcije na elektrodama prikazane jednačinama (2) – (5) [127,132].

Reakcije na katodi:



Reakcija na anodi:



Elektrohemijska redukcija srebra uključuje dva kompetitivna procesa na površini katode. Jedan je formiranje nanočestica srebra i drugi taloženje metalnog filma na katodi. U većini slučajeva, drugi proces dominira u odnosu na prvi, tako da je rezultat elektrohemijske redukcije jona srebra taloženje srebra na površini katode. Dakle, ključni problem prilikom sinteze nanočestica je minimiziranje taloženja srebra na katodi pošto dovodi do smanjenja prinosa nančestica, a ukoliko se površina katode

prekrije slojem metala srebra proces formiranja nanočestica prestaje i dolazi samo do daljeg taloženja srebra na katodi [130,133].

U cilju sprečavanja taloženja metala na katodi, ubrzavanja formiranja i stabilnosti nanočestica uvode se agensi stabilizacije, kao što su tetralkil-amonijumove soli, tioglikolna kiselina, polimeri (PVP, PVA, derivati PEG) [128,131,133–136]. Takođe, upotreba platinske elektrode kao katode umesto srebrne smanjuje tendenciju taloženja srebra i favorizuje formiranje nanočestica usled razlike parametara metalne rešetke ova dva metala [133].

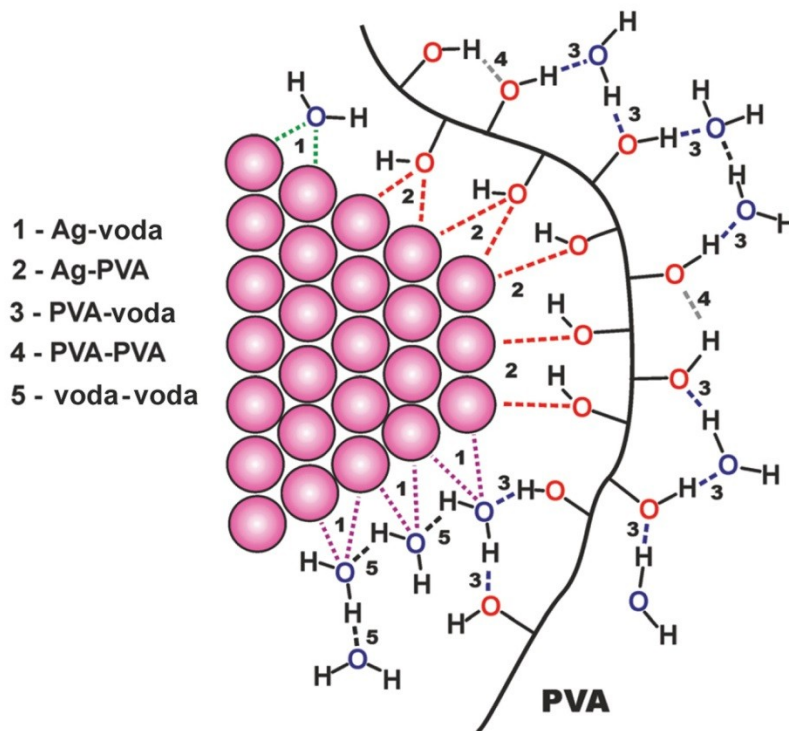
Stabilizacija kompleksa polimer/nanočestica se ostvaruje elektronskom interakcijom između funkcionalnih grupa polimera i nanočestica metala. Prilikom elektrohemisjke sinteze stabilizacija i zaštita nanočestica srebra polimerom zavisi od same strukture polimera. Za polimere koji kao osnovu sadrže polivinilni skelet sa polarnim grupama, kao što su PVP i PVA mogu se pretpostaviti 3 stupnja prilikom elektrohemisjke sinteze [131]:

1. Formiranje koordinativne veze između polimera i srebrnih jona pri čemu se dobija Ag_m^{m+} -polimer kompleks (m-broj jona srebra).

2. Elektrohemisjka redukcija Ag_m^{m+} -polimer kompleksa na katodi pri čemu se dobija Ag_m^0 -polimer kompleks. Ag_m^{m+} -polimer kompleks se lakše redukuje u odnosu na Ag^+ - H_2O kompleks čime se smanjuje mogućnost taloženja srebra na katodi.

3. Sprečavanje agregacije i aglomeracije sintetisanih nanočestica srebra koje se pripisuje sternim efektima dugog polivinilnom lanca koji se nalazi na površini čestice.

Istraživanja su pokazala da stepen zaštite nanočestica od agregacije i aglomeracije u slučaju PVA zavise od dužine polivinilnog lanca. Kiričenko i saradnici [137] su istraživali vrste veza molekula PVA, nanočestica srebra i vode (Slika 2.4), kao i zavisnost stepen pokrivenosti nanočestica srebra PVA molekulima u zavisnosti od dužine polivinilnog lanca. Pokazan je veći stepen pokrivenosti (~90 %) PVA molekula sa 1540 jedinica u lancu u odnosu na molekule sa manje jedinica u lancu (220 jedinica ~40 % pokrivenosti).



Slika 2.4. Šematski prikaz interakcija između molekula PVA, nanočestica srebra i vode [137].

Prednost elektrohemijske sinteze nanočestica srebra u odnosu na hemijske metode je mogućnost dobijanja nanočestica velike čistoće bez hemijskih ostataka redukcionog sredstva kao što je slučaj prilikom hemijske sinteze, što je velika prednost naročito pri upotrebi u medicinske i farmaceutske svrhe. Takođe, prednost elektrohemijske sinteze je mogućnost kontrole veličine sintetisanih nanočestica koja se postiže definisanjem uslova elektrohemijske sinteze, tj. izborom potencijala ili gustine struje sinteze [131].

2.2.2. KOMPOZITI POLIMERA I NANOČESTICA SREBRA

Problem prilikom korišćenja nanočestica srebra je njihova nestabilnost naročito u vodenim rastvorima gde posle kratkog vremena dolazi do aglomeracije. Ovaj problem se prevladava njihovom stabilizacijom, najčešće u polimernim rastvorima i to alginatu, polivinil-alkoholi, polivinil-pirolidinu, hitozanu, čime osim što se spečava agregacija nanočestica, postiže i kontrolisano otpuštanje, citotoksičnost smanjuje, a dejstvo same obloge produžava [138-140].

Swaroop i saradnici [141] su sintetisali nanočestični Ag/PVA hidrogel γ -zračenjem (25kGy) 5 mas. % PVA rastvora i 1 mmol AgNO₃. Prisustvo nanočestica je potvrđeno UV-Vis spektroskopijom (423 nm) i XRD analizom. Ispitivanjem stepena bubrenja i udela gela vršili su poređenje PVA i Ag/PVA hidrogela gde je pokazano da hidrogel koji sadrži nanočestice srebra ima veći stepen bubrenja (850 %) u odnosu na čist PVA hidrogel (530 %) kao i manji udeo gela (72 %) u odnosu na čist PVA hidrogel (84 %). Antibakterijska aktivnost potvrđena je agar difuzionim testom gde je pokazana zona inhibicije prema *E. coli* (21.8 ± 0.83) kao i nešto manju prema *S. aureus* ($16,6 \pm 2,60$).

Abdelgawad i saradnici [142] su sintetisali nanovlakna hitozan/nanočestice srebra/polivinil-alkohol (CS/AgNP/PVA). Rastvor AgNO₃ (0,045-0,72 g) je dodavan u rastvor hitozana (0,5-3 %), da bi se naknadnim dodavanjem glukoze kao redukujeg agensa dobile nanočestice srebra. Rastvor CS/AgNP je mešan u različitim odnosima sa 8 mas. % vodenim PVA rastvorom sa ciljem dobijanja nanovlakna elektrospining metodom. Ispitivanja antibakterijske aktivnosti dobijenih nanovlakna dilucionom metodom pokazuju pad broja kolonija *E. coli* (inicijalne koncentracije $7 \cdot 10^5$ i $7 \cdot 10^7$ CFU ml⁻¹) sa porastom koncentracije hitozana u PVA/CS vlaknima, dok kod vlakna koja su sadržala nanočestice srebra nisu uočene kolonije.

El-Mohdy [143] je sintetisao Ag/polivinil-alkohol/acetat celuloza/želatin (AgNP/ PVA/AC/ŽEL) hidrogel. U prethodno umrežen PVA/AC/ŽEL hidrogel bubrenjem u rastvoru AgNO₃ (varirana koncentracija 5, 10 i 20 mM) i naknadnim γ -zračenjem (varirane doze 15, 20 i 25 kGy) dobijene su nanočestice srebra inkorporirane u hidrogelu. UV-Vis spektroskopijom je potvrđeno prisustvo nanočestica kao i veći prinos nanočestica dobijenih iz koncentrovanijih rastvora AgNO₃. Ispitivanjem uticajem

na mehanička svojstva pokazano je da iz koncentrovanijih rastvora AgNO_3 , kao i pri većim dozama zračenja prilikom sinteze nanočestica raste i zatezna čvrstoća (maksimalna 34 MPa pri 20 mM AgNO_3 i 25 kGy) što je posledica bolje umreženosti hidrogela kao i interakcija nanočestica u mreži hidrogela pri većim dozama zračenja. Ispitivana su antimikrobna svojstva agar-difuzionom metodom prema Gram-pozitivnim *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis*, kao i Gram-negativnim *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* bakterijskim ćelijama. Pokazano je da zona inhibicije raste sa koncentracijom nanočestica srebra i približava se zonama inhibicije antibiotika *Penicilin G* i *Streptomycin* koji su korišćeni kao referentni. Takođe, ispitivana je antifungalna aktivnost prema *Aspergillus fumigatus*, *Geotrichum candidum*, *Candida albicans* i *Syncephalastrum racemosum* gde takođe širina zone inhibicije raste sa porastom koncentracije nanočestica srebra i približava se širini zone inhibicije *Klotrimazola* i *Itrakonazola* koji su korišćeni kao referentni antifungicidi.

Narayanan i Han [144] sintetisali su nanokompozit PVA/alginat/AgNP. U vodeni rastvor 5 mas. % PVA/Alg različitih masenih odnosa polimera (90:10, 70:30, 50:50, 30:70 i 10:90) dodat je AgNO_3 (5 mM). Sa ciljem umrežavanja alginata dodat je CaCl_2 , dok je sinteza nanočestica vršena hemijski uz pomoć borata (NaBH_4). Dalje je u svrhu umrežavanja polimernih lanaca PVA vršeno višeciklično zamrzavanje i odmrzavanje. UV-Vis analizom je potvrđeno prisustvo nanočestica (~400 nm) kao i kristalna struktura XRD analizom. Termogravimetrijska analiza je pokazala bolju termičku stabilnost u prisustvu nanočestica u odnosu na kompozit hidrogelova bez nanočestica. Antibakterijska aktivnost prema vrsti bakterije *E. coli* određena je dilucionom metodom nakon inkubacije od 6, 12 i 24 h i pokazano je da je neznatno smanjena vijabilnost ćelija nakon 6 h, dok je nakon 12 i 24 h vijabilnost ćelija bila značajno smanjena, s tim što je uočeno da sa povećanjem koncentracije alginata u nanokompozitu raste i antibakterijska aktivnost, što se pripisuje boljoj imobilizaciji nanočestica u polimernoj mreži.

PVA/Alg/Ag kompozitne filmove uspešno su sintetisali Eghbalifam i saradnici [145]. Različite koncentracije AgNO_3 su dodavane u PVA vodeni rastvor koji je naknadno izložen različitim dozama γ -zračenja (5, 10 i 15 kGy) sa ciljem umrežavanja PVA i sintetisanja nanočestica. U tako dobijeni rastvor dodat je alginat sa krajnjim masenim odnosom PVA:Alg od 90:10. Maseni udeo srebra iznosio je 0,45, 0,89 i 1,33

mas. %. Pokazano je da sa povećanjem početne koncentracije AgNO_3 kao i povećanjem doze zračenja raste i prinos nanočestica srebra. Sa povećanjem koncentracije nanočestica srebra poboljšavaju se mehaničke karakteristike, tj. raste zatezna čvrstoća i Jungov moduo, dok istezanje opada. Agar difuzionom metodom ispitivana je antibakterijska efikasnost kompozitnih filmova prema vrstama bakterijama *E. coli* i *S. aureus* gde je pokazano da sa porastom početne koncentracije AgNO_3 i pri većim dozama zračenja raste i širina zone inhibicije prema bakterijama, u slučaju *E. coli* (1,5-3,2 mm) dok je u slučaju *S. aureus* (1-2,1 mm).

Nanočestice srebra su uspešno sintetisane elektrohemijском metodom u matrici PVP hidrogela [125] i alginatu [124]. U prethodno umreženom γ -zračenjem 10 mas. % rastvoru PVP koji je podvrgnut bubrenju u rastvoru AgNO_3 (3,9 mM) izvedena je sinteza nanočestica srebra postavljanjem hidrogela između katode i anode. Tako postavljen podvrgnut je konstantnom naponu (variran 15-300 V). UV-Vis analiza je potvrdila prisustvo nanočestica srebra (~416 nm). Takođe, antibakterijska svojstva su potvrđena agar difuzionom metodom prema bakteriji *S. aureus* gde je pokazana zona inhibicije od 1 mm [125]. Elektrohemijska sinteza nanočestica srebra uspešno je izvršena i u rastvoru alginata (2 mas. %) koji je sadržao AgNO_3 (variran 0,5-3,9 mM) pri konstantnoj gustini struje (varirana 5-50 $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$). Vreme sinteze je varirano (0,5-10 min). Prisustvo nanočestica je potvrđeno UV-Vis analizom gde je prinos nanočestica rastao sa porastom gustine struje i vremenom sinteze. Antibakterijska ispitivanja Ag/alginat mikročestica dobijenih elektrostatičkom ekstruzijom pokazuju baktericidni efekat prema vrsti bakterije *S. aureus*. Od inicijalne koncentracije bakterija od $5,0\cdot 10^5$ $\text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$, 24 h nakon inkubacije koncentracija bakterija u prisustvu Ag/alginat mikročestica je iznosila $1,33\cdot 10^6$ u odnosu na kontrolni uzorak gde je koncentracija bakterija iznosila $9,9\cdot 10^8$ $\text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$, što pokazuje inhibitorno dejstvo Ag/alginat mikročestica [124].

Prikazani rezultati [124,141-145] pokazuju da se nanočestice srebra uspešno mogu sintetisati redukcijom jona srebra hemijskim i elektrohemijskim putem kao i γ -zračenjem u polimernoj mreži hidrogela. Nanočestice srebra mogu doprineti poboljšanju mehaničkih kao i termičkih svojstava. Takođe, pokazuju dobro antibakterijsko i antifungalno dejstvo protiv različitih sojeva mikroba. Navedena svojstva su veoma

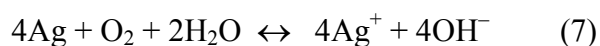
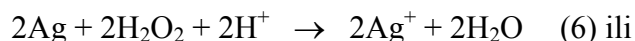
poželjna prilikom upotrebe obloga za rane što nanočestice srebra čine dobrim kandidatom prilikom dizajna obloga na bazi polimernih hidrogelova.

2.2.3. MEHANIZAM ANTIMIKROBNOG DEJSTVA I CITOTOKSIČNOST SREBRA

Može se slobodno reći da je antimikrobno dejstvo srebra poznato više milenijuma, ali sam mehanizam delovanja nije u potpunosti i danas poznat. Ipak, poslednje decenije, načinjen je veliki pomak u objašnjenju mehanizma delovanja srebra u jonskom ili nanočestičnom obliku na ćelije mikroorganizama. Glavni fokus proučavanja uključuje otpuštanje srebrnih nanočestica i jona, oštećenje citoplazmatične membrane, interakcije sa DNK, generisanje reaktivnih oblika kiseonika, otpornost bakterija i odnos otpornosti prema jonima srebra u odnosu na nanočestice srebra [146–148].

Marambio-Džons i Houk [147] na osnovu proučavanja literature predložili su tri moguća mehanizma antibakterijske aktivnosti nanočestica srebra (slika 2.5):

1) **nanočestice srebra otpuštaju Ag^+ jone**, po sledećim pretpostavljenim mehanizmima *in vivo*:

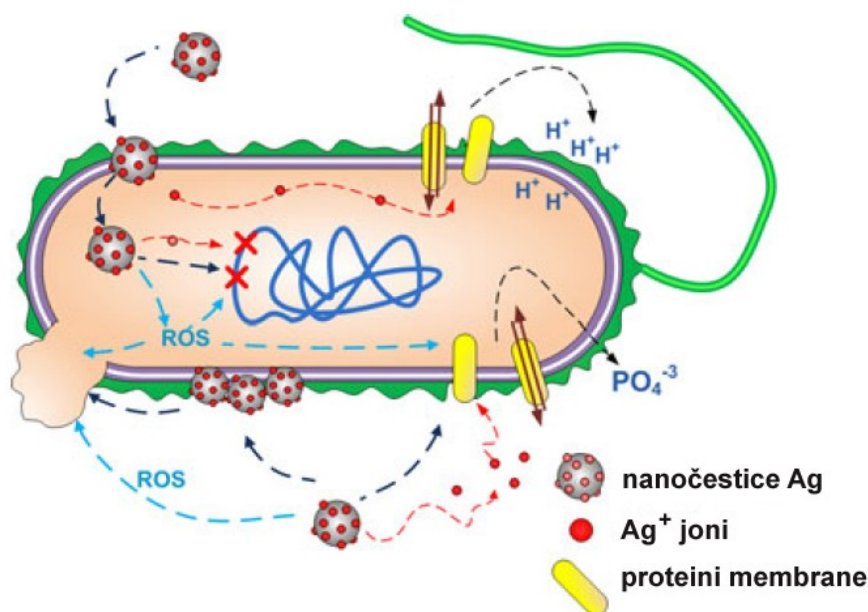


Joni srebra stupaju u interakciju sa enzimima respiratornog lanca kao što je nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) dehidrogenaza onemogućavajući njeno učestvovanje u lancu disanja i sintezi adenzin-trifosfata (ATP). Takođe, joni srebra se mogu vezati za transportne proteine, što rezultira “curenjem” protona i dolazi do prekida procesa hemiosmoze. Joni srebra mogu inhibirati resorpciju fosfata i time izazvati otpuštanje intracelularnih fosfata iz ćelije. Uzrok ove interakcije sa respiratornim kao i transportnim proteinima može se objasniti velikim afinitetom jona srebra prema tiolnim grupama bočnog lanca cisteina [147,149]. Uočeno je da joni srebra mogu povećati i učestalost mutacija u procesu replikacije DNK lanca [140,150].

2) **generisanje reaktivnih oblika kiseonika** (*eng.* Reactive Oxygen Species) tj. slobodnih radikala, koji su u malim količinama prisutni u ćeliji kao produkti metabolizma i koji se kontrolišu antioksidansima u ćeliji. Dodatno generisanje

slobodnih radikala može uzrokovati njihovo vezivanje za lipide membrane i dovesti do oštećenja same membrane, mitohondrijalnih funkcija kao i oštećenja DNK. Nanočestice srebra imaju ulogu katalizatora u prisustvu rastvorenog kiseonika čime pospešuju stvaranje viška radikala [147,151].

3) **direktno oštećenje citoplazmatične membrane** – nanočestice srebra mogu da reaguju sa ćelijskim zidom i takođe da prodru unutar ćelije. Detaljni mehanizam nije sasvim potvrđen i objašnjen, ali postoji hipoteza da je interakcija nanočestica srebra i ćelijskog zida posledica elektrostatičkog privlačenja između negativno naelektrisane površine ćelije bakterije i pozitivno naelektrisane nanočestice srebra. Druga hipoteza, pretpostavlja da je ključna interakcija nanočestica srebra sa proteinima koji sadrže sumpor u citoplazmatičnoj mebrani čime se ometa njihova normalna funkcija, dolazi do stvaranja nepravilnih oblika i pukotina na samoj membrani, smanjuje se njena permeabilnost i ubrzava odvajanje lipopolisaharida i proteina membrane [147].



Slika 2.5. Šematski prikaz delovanja nanočestica srebra na bakterijsku ćeliju [147].

Poređenjem antibakterijske efikasnosti nanočestica srebra u odnosu na jone srebra pokazana je veća efikasnost nanočestica srebra tj. minimalna inhibitorna koncentracija je manja ukoliko se srebro koristi u obliku nanočestica. Iako se smatra da je princip delovanja na ćelijski zid isti, vezivanje nanočestica srebra za ćelijski zid je efikasnije, samim tim olakšan je prodor u ćeliju čime se ubrzava njena smrt [146,148].

Pokazano je da veličina čestica srebra ima uticaja na antibakterijska svojstva, kako veličina čestice raste tako specifična površina opada. Zapaženo je da pri istim koncentracijama srebra, manje nanočestice srebra generišu veći stepen stvaranja slobodnih radikala (koji ubrzavaju smrt ćelije) u odnosu na veće nanočestice [152].

Iako retko, otpornost vrsta bakterija prema srebru je uočena kako kod sojeva bakterija u kliničkoj praksi koje su tretirane rastvorom srebro-nitrata, tako i kod sojeva bakterija koje se nalaze u prirodnom okruženju koje je bogato jonima srebra. Ipak, zaključeno je da je otpornost veoma mala prema nanočesticama srebra, gotovo nepostojeća ukoliko su nanočestice srebra izolovane na nekom nosaču (staklenom, polimernom) jer je mogućnost agregacije i aglomeracije u tom slučaju značajno manja i delovanje nanočestica efikasnije [146].

Citotoksičnost srebra

Citotoksičnost srebra, slično kao i kod antibakterijskog dejstva, objašnjava se putem nekoliko mehanizama. Citotoksičnost nanočestica srebra povezuje se sa oslobađanjem jona srebra čija meta mogu biti mitohondrije i narušavanje njenih normalnih funkcija. Takođe, joni srebra se mogu vezati za DNK ili RNK komplekse čime sprečavaju njihovu replikaciju i transkripciju i na taj način utiču na ćelijski ciklus izazivajući genotoksičnost. Izloženost nanočesticama srebra uzrokuje generisanje reaktivnih oblika kiseonika (ROS) i ukoliko se nivo u ćelijama poveća dolazi do oksidativnog stresa ćelija [140].

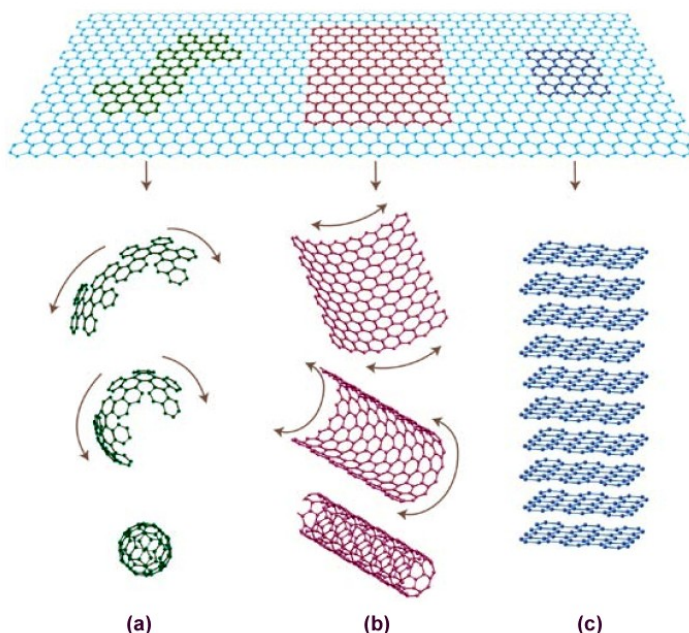
Nanočestice srebra mogu dospeti u ljudsko telo udisanjem, gastrointestinalno, kroz kožu, preko implanata u telu koji sadrže srebro [118,148]. Eksperimentalna i klinička istraživanja ukazuju da je teško ukloniti srebro u potpunosti nakon deponovanja u telu. Argirija je šire poznata pojava koja se manifestuje plavo-sivim obojenjem kože izazvanim taloženjem srebra u tkivu kože i javlja se nakon dugoročne izloženosti organizma velikim koncentracijama srebra. Argirija ne predstavlja opasnost po život čoveka, ali je svakako kozmetički problem [151,153,154].

Studijom koja je obuhvatala 30 pacijenata sa relativno malom površinom opekotina koje zahtevaju presađivanje kože vršeno je ispitivanje sadržaja srebra u krvnom serumu pre, tokom i nakon upotrebe ActicoatTM obloga za rane. Takođe, dodatno, 3 i 6 meseci nakon završetka tretmana (terapije) ispitivan je sadržaj srebra u

krvnom serumu. Maksimalan sadržaj srebra u krvnom serumu 56,8 $\mu\text{g/l}$ izmeren je 9 dana nakon upotrebe obloge kada je i završen tretman. Sadržaj srebra je rastao sa vremenom upotrebe obloge tj. tretmanom. Međutim, 6 meseci nakon tretmana iznosio je 0,8 $\mu\text{g/l}$. Povećan sadržaj srebra u krvnom serumu nije bio povezan sa kliničkim, biohemijskim ili hematološkim znacima toksičnosti, što pokazuje da nužno ne dovodi do taloženja srebra u tkivima i može se bezbedno koristiti prilikom tretmana povreda i opekotina na koži [154].

2.3. GRAFEN I OBLICI GRAFENA

Grafen (slika 2.6) predstavlja monosloj sp^2 hibridizovanih atoma ugljenika raspoređenih u dvodimenzionalnu kristalnu rešetku. Prostorni raspored grafena privukao je veliku pažnju i pokrenuo mnoga istraživanja zbog svojih jedinstvenih svojstva, kao što su dobra mehanička svojstva (npr. zatezna čvrstoća ~ 130 GPa i Jungov modul elastičnosti $0,5-1$ TPa), termička provodljivost ($5000 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$), električna provodljivost, velika mobilnost kao nosioca naelektrisanja jer u svojoj strukturi ne sadrži defekte što je karakteristika dobrih provodnika, veoma velika specifična površina (do $2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) i zavidni fenomeni transporta kao što je kvantni Holov efekat. Ova posebna svojstva daju veliki potencijal za primenu na mnogim poljima, kao što su solarne ćelije, senzori, baterije, superkondenzatori, senzori, nanokompoziti [31,32,34,155].



Slika 2.6. Struktura grafena i različiti oblici grafena a) fuleren, b) nanocevi i c) nanolistovi [155].

Grafen, kao i oblici grafena (grafen-oksidi, redukovani grafen-oksidi i nanocevi) na poljima biotehnologije i medicine se intenzivno proučavaju i može se reći da pripadaju sledećoj generaciji biomaterijala sa rastućom biomedicinskom primenljivošću [156]. Grafen-oksidi se u početnim istraživanjima na poljima biomedicine izučavao kao nosač lekova koji selektivno ubija ćelije raka. Grafen poseduje veliku tanku površinu, dobru mehaničku čvrstoću i električnu provodljivost što ga čini dobrom osnovom za novu DNK tehnologiju sekvencioniranja, biosenzora za glukozu, hemoglobin i nivo holesterola. Više istraživanja je vršeno sa ciljem da se grafen i njegovi oblici koriste kao nosači za isporuku lekova.

Visoka elastičnost, fleksibilnost i prilagodljivost grafena ravnim i nepravilnim površinama pogoduju strukturnim ojačanjima biokompatibilnih filmova, hidrogelova, skafolda i drugih materijala u inženjerstvu tkiva [157]. Svojstva i uticaj grafena se ispituju na poljima koštanog tkiva i aplikacijama implanata koštanog tkiva. Grafen-oksidi ima blagotvorno dejstvo na proliferaciju i diferencijaciju ćelija. Ispitivanja na 3D grafen skafoldima od pene koji su sadržali mezenhimalne matične ćelije iz koštane srži pokazala su povoljan uticaj na zarastanje rana na koži [158,159].

Kompozitni hidrogelovi sintetičkih polimera kao što su PMMA i PVA koriste se u inženjerstvu tkiva kao zamena hrskavice, tetiva, meniskusa. Međutim, čest problem prilikom dizajna ovih aplikacija je niska elastičnost i mehanička čvrstoća.

Dodatak grafena i grafen-oksida značajno može poboljšati mehanička svojstva čak i u malim koncentracijama. Liang i saradnici [160] su sintetisali PVA/grafen film izlivanjem rastvora koji je sadržao 10 mas. % PVA i 0,7 mas. % grafen-oksida sušenjem na 60 °C. Ispitivanja termičkih svojstava pokazuju na temperaturnom piknu DTG krive pri maksimalnom gubitku mase povećanje temperature od 5,5 °C PVA/grafen filma (316,5 °C) u odnosu na čist PVA film (311 °C). Rezultati ispitivanja mehaničkih svojstava pokazuju povećanje od 76 % zatezne čvrstoće, sa 49,9 MPa čistog PVA filma na 87,6 MPa za PVA/grafen film i povećanje od 62 % modula elastičnosti tj. od 2,13 GPa za PVA film na 87,6 MPa za PVA/grafen film što je značajno poboljšanje mehaničkih svojstava.

Pandele i saradnici [161] su sintetisali hitozan/polivinil-alkohol/grafen-oksidi (CS-PVA/GO) nanokompozitne filmove mešanjem rastvora 1 mas. % PVA i 1 mas. %

hitozana u odnosu 1:1 u koji je dodat grafen-oksidi različitih koncentracija do postizanja krajnje koncentracije od 0,5, 1,0, 2,5 i 6 mas. %. CS-PVA/GO rastvori izliveni u Petri šoljama i sušeni na sobnoj, a zatim i na povišenoj temperaturi sa ciljem dobijanja filmova. Ispitivanja termičke stabilnosti filmova pri gubitku mase od 3 % pokazuju na termogravimetrijskoj (TGA) krivoj najpre rast temperature za koncentracije 0,5 mas. % GO (115 °C), 1 mas. % GO (110 °C), 2,5 mas. % GO (104 °C) i pad za 6 mas. % GO (101 °C) u odnosu na CS-PVA film (103 °C). Veća stabilnost polimernih filmova koji sadrže manju koncentraciju GO pripisuje se dobrim interakcijama tj. vodoničnim vezama sa CS-PVA polimernim lancima, dok kod filmova sa većom koncentracijom GO dolazi do slabije interakcije GO sa CS-PVA polimernim lancima usled agregacije GO. Ispitivanja mehaničkih svojstava, Jungovog modula, pokazuju da sa povećanjem koncentracije GO raste Jungov moduo, pri koncentraciji GO od 6 mas. % u CS-PVA/GO filmu za 200 % u odnosu na čist CS-PVA film što se pripisuje većoj kristaličnosti filma usled prisustva GO. Istraživanja Qian-a i saradnika [162] pokazuju da dodatak od 0,1 mas. % redukovanog GO (rGO) u polidimetilsiloksan (PDMS) polimernu matricu povećava zateznu čvrstoću sa 1,50 MPa za čist PDMS na 2,03 MPa za rGO-PDMS što je ~35 % više. Takođe, dolazi do povećanja Jungovog modula sa 0,32 MPa za PDMS na 0,43 MPa za rGO-PDMS, što je povećanje od ~34 %.

Grafen-oksidi kao deo kompozita pored poboljšanja mehaničkih svojstava skafolda i hidrogelova, može da poveća vreme degradacije kompozitnih materijala, zadrži stabilan oblik pri fiziološkim i ekstremnim pH vrednostima, poboljša ćelijsku adheziju, proliferaciju i diferencijaciju što ga čini dobrim kandidatom prilikom dizajna aplikacija u inženjerstvu tkiva [157,163].

2.3.1. ANTIBAKTERIJSKA SVOJSTVA GRAFENA

Novija istraživanja grafena i njegovih modifikacija (grafen-oksidi, redukovani grafen-oksidi i nanocevi grafena) kao antimikrobnog agensa daju obećavajuće rezultate.

Antibakterijska aktivnost PVA/CS i PVA/CS/GO vlakna pokazana je prema vrsti bakterije *E. coli* agar difuzionom metodom praćenjem širine zone inhibicije nakon 24 h inkubacije. Sadržaj GO u PVA/CS/GO nanokompozitnim vlaknima je variran u koncentracijama 0,05; 0,2; 0,4 i 0,6 mas. %. Najveću širinu zone inhibicije od 8,6 mm pokazuje PVA/CS/GO nanokompozit koji sadrži 0,4 mas. %, tj. za 33 % veću od PVA/CS gde je širina zone inhibicije 6,5 mm [164].

Inkorporacijom redukovano grafen-oksida u matricu polidimetilsiloksana rGO-PDMS u koncentracijama od 0,1; 0,2 i 0,5 mas. % istraživana je antibakterijska aktivnost prema vrstama *S. aureus* i *E. coli* praćenjem vijabilnosti ćelija bakterija. Sa porastom koncentracije rGO veći je gubitak vijabilnosti ćelija bakterija i dostiže za rGO-PDMS (0,5 mas. % rGO) 63.44 ± 1.72 % za *S. aureus* i 58.41 ± 1.86 % za *E. coli* u odnosu na kontrolni uzorak (uzorak bakterija zasejan na hranljivoj podlozi) [162].

Liu i saradnici [165] su istraživali antibakterijska svojstva GO na polimernom supstratu (silikonu) prema vrstama bakterija *S. aureus* i *E. coli* praćenjem vijabilnosti ćelija bakterija. Metodom brojanja preživelih ćelija bakterija, u odnosu na kontrolni uzorak (uzorak bakterija zasejan na hranljivoj podlozi) GO prevlaka na silikonu pokazuje značajan gubitak vijabilnosti i to 85.8 % za *E. coli* i 72.4 % za *S. aureus*, pa se može zaključiti da GO pokazuje intenzivnu inhibiciju rasta ćelija bakterija 24 h nakon inkubacije.

Antibakterijska aktivnost nanokompozitnih vlakna GO/PVA dobijenih metodom elektrospininga, koncentracije PVA od 14 mas. % i variranim koncentracijama GO od 0,3, 0,5, 1 i 2 mas. % ispitivana su dilucionom metodom prema vrstama bakterija *S. aureus* i *E. coli*. Inhibicija bakterijskog rasta je efikasnija sa porastom koncentracije GO i dostiže za *S. aureus* i *E. coli* 90 % i 84 %, redom, u odnosu na kontrolni uzorak koji je sadržao čista PVA vlakna [166].

Istraživanja pokazuju da su antimikrobna svojstva uzrokovana hemijskim i fizičkim interakcijama nakon direktnog kontakta listova grafena sa ćelijskim zidom bakterija. Pretpostavljena su tri osnovna mehanizama kojima grafen i njegove modifikacije deluje na bakterijsku ćeliju [167,168]:

1. Pritisak na citoplazmatičnu membranu – oštrim ivicama listovi grafena mogu fizički da oštete citoplazmatičnu membranu što dovodi do inaktivacije ćelije bakterije. SEM snimci pokazuju prekide u citoplazmatičnoj membrani listovima grafena, gde se kroz prekide (otvore) mogu osloboditi razni enzimi i elektroliti što dovodi do smrti ćelije. Bitan faktor antibakterijske aktivnosti listova grafena je broj listova koje mogu oštetiti ćelijski zid. Takođe, istraživanja pokazuju da listovi grafena na tri načina deluju na ćelijski zid, isecanjem, ubacivanjem i destruktivnom ekstrakcijom lipidnih molekula što sve zajedno doprinosi uništavanju bakterijske ćelije [167].

2. Oksidativni stres – može oštetiti bakterijsku ćeliju generisanjem reaktivnih oblika kiseonika koji mogu oštetiti ćelijske komponente kao što su lipidi, protein i DNK.

3. Izolovanje ćelije prekrivanjem – kada se nađe u blizini ćelije, grafen može prekriti ćeliju tj. „upakuje“ ćeliju čime sprečava kontakt ćelije sa okolinom tj. nutritivnim tvarima što dovodi do smrti ćelije. Mikroskopija atomskih sila (*eng.* Atomic force microscopy - AFM) je pokazala da listovi grafen-oksida mogu da stvore interakciju sa bakterijskom ćelijom i prekriju njenu površinu, gde veći listovi grafen-oksida lakše mogu prekriti bakterijsku ćeliju u potpunosti, dok manji listovi takođe pokazuju adheziju ali i manji stepen pokrivenosti samim tim i slabiju antibakterijsku aktivnost.

U prva dva navedena slučaja, pritiska na citoplazmatičnu membranu i oksidativnog stresa, dolazi do smrti ćelije, dok u trećem slučaju izolovanja ćelija prekrivanjem dolazi do inaktivacije ćelije. Prilikom praćenja potrošnje glukoze, utvrđeno je da bakterije prekrivene listovima grafena ne pokazuju biološku aktivnost, dok nakon uklanjanja listova grafena pomoću ultrazvuka ćelije bakterija se reaktiviraju [169].

Ograničena znanja i različita tumačenja antibakterijskih svojstva grafena mogu se pripisati varijacijama fizičko-hemijskih svojstava grafena i njegovih modifikacija kao što su debljina nanolistova, disperzibilnost i oksidacioni kapacitet koji zavise od metoda

pripreme (oksidacija, eksfolijacija). Stoga, potrebna je precizna procena antibakterijskih aktivnosti u odnosu na različite oblike materijala baziranih na grafenu (grafen-oksidi, redukovani grafen-oksidi, nanocevi grafena) [167].

Iako su grafen i njegovi oblici relativno bezbedni u pogledu elementarnog sastava po ljudski organizam, potvrda *in vivo* kao i *in vitro* prema pojedinačnim ćelijama je svakako važna. Studije često pokazuju blago smanjenje preživljavanja ćelija sisara koje su izložene materijalima baziranim na grafenu jer izazivaju oksidativni stres i apoptozu. Pokazano je da su hidrofilnije forme grafena (grafen-oksidi i redukovani grafen-oksidi) iako lakše mogu penetrirati kroz citoplazmatičnu membranu, manje toksične u odnosu na hidrofobnije oblike (grafen, fuleren, nanocevi grafena) koji se mogu akumulirati na površini membrane. Za upotrebu u biomedicinske svrhe potrebno je jasno definisati uticaje različitih oblika grafena, metode njihovog dobijanja, ponašanje u *in vivo* uslovima čime će se povećati bezbednost upotrebe [156].

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada je elektrohemijsko dobijanje srebra/polivinil-alkohol (Ag/PVA) i srebra/polivinil-alkohol/grafen (Ag/PVA/Gr) nanokompozita elektrohemijskom sintezom nanočestica srebra u PVA rastvoru odnosno PVA/Gr koloidnoj suspenziji. Svojstva nanokompozita dobijenih u vidu koloidnih disperzija, filmova i hidrogelova biće ispitani u cilju potencijalne biomedicinske primene.

Metode karakterizacije koje će biti primenjene na dobijenim materijalima su:

- UV-VIDLJIVA SPEKTROSKOPIJA (UV-Vis) za dokazivanje prisustva, praćenje prinosa i stabilizacije nanočestica srebra u koloidnim disperzijama dobijenim pri različitim parametrima sinteze,
- TRANSMISIONA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (TEM) za određivanje veličine i morfologije nanočestica srebra,
- CIKLIČNA VOLTAMetriJA (CV) za dokazivanje međusobnog uticaja nanočestica srebra, grafena i PVA,
- INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA SA FURIJEVOM TRANSFORMACIJOM (FTIR) za određivanje vrste veze između nanočestica srebra, grafena i PVA,
- DIFRAKCIJA X-ZRAKA (XRD) za određivanje tipa kristalne rešetke i veličine kristalita nanočestica srebra,
- RAMANSKA SPEKTROSKOPIJA za dokazivanje prisustva i strukture grafena,
- SKENIRAJUĆA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (FE-SEM) za određivanje mikrostrukture i morfologije
- FOTOELEKTRONSKA SPEKTROSKOPIJA X-ZRACIMA (XPS) za indentifikaciju prisutnih elemenata,
- MEHANIČKA SVOJSTVA (TEST ISTEZANJA) za određivanje mehaničkih svojstava PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova,

- TERMOGRAVIMETRIJSKA ANALIZA (TGA) za određivanje termičke stabilnosti PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova,
- ATOMSKA APSORPCIONA SPEKTROSKOPIJA (AAS) za praćenje kinetike otpuštanja srebra iz Ag/PVA i Ag/PVA/Gr hidrogelova,
- MTT TEST CITOTOKSIČNOSTI za određivanje stepena citotoksičnosti PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova i hidrogelova,
- AGAR DIFUZIONI TEST I TEST U SUSPENZIJI za određivanje antibakterijskih svojstava PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr hidrogelova.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

4.1. MATERIJALI

Za elektrohemijsku sintezu Ag/PVA i Ag/PVA/Gr koloidnih disperzija korišćeni su: PVA ($M_w = 70\ 000 - 100\ 000$, Sigma, St. Louis, MO, SAD), $AgNO_3$ (M.P. Hemija d.o.o., Beograd, Srbija), KNO_3 (Centrohem, Stara Pazova, Srbija), prah grafena (Graphene Supermarket, Calverton, NY, USA) i azot visokog stepena čistoće (99,5 %, Messer Tehnogas a.d., Beograd, Srbija).

Za pripremu rastvora za određivanje koncentracije otpuštenog srebra korišćeni su K_2HPO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvatska) i KH_2PO_4 (Centrohem, Stara Pazova, Srbija).

Za ispitivanje antibakterijske aktivnosti nanokompozitnih hidrogelova korišćeni su: Gram-pozitivni *Staphylococcus aureus* TL (TMF – Beograd) i Gram-negativni *Escherichia coli* ATCC 25922 (*eng.* ATCC - American Type Culture Collection) bakterijski sojevi.

Za *in vitro* ispitivanje citotoksičnosti PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova i hidrogelova korišćene su sledeće supstance: hranljivi medijum RPMI 1640, L-glutamin, HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina), MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) reagens (Sigma, St. Louis, MO, SAD), goveđi serum (PAA Laboratories, Pasching, Austrija), streptomycin (Galenika, Beograd, Srbija), i penicilin (Panfarma, Beograd, Srbija). Mononuklearne ćelije periferne krvi (*eng.* Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC)) su dobijene izolacijom iz heparinizovane periferne krvi zdravih dobrovoljaca (Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd, Srbija).

U svim eksperimentima je korišćena demineralizovana voda iz Milli-Q sistema (Millipore, Billerica, MA, SAD).

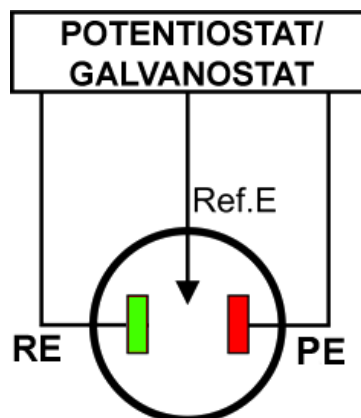
4.2. PRIPREMA UZORAKA

4.2.1. ELEKTROHEMIJSKA SINTEZA Ag/PVA I Ag/PVA/Gr KOLOIDNIH DISPERZIJA

Za sintezu Ag/PVA koloidne disperzije, najpre je PVA prah rastvoren u vodi na povišenoj temperaturi (~ 90 °C) uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici. Nakon hlađenja rastvora do sobne temperature dodati su KNO_3 i AgNO_3 , do postizanja konačnih koncentracija od 10 mas. % PVA, 0,1 M KNO_3 i $3,9 \cdot 10^{-3}$ mM AgNO_3 .

Za sintezu Ag/PVA/Gr koloidne disperzije, u 10 mas. % vodeni rastvor PVA (~ 60 °C) dodat je grafen uz mešanje na magnetnoj mešalici. Nakon hlađenja rastvora do sobne temperature dodati su KNO_3 i AgNO_3 , do postizanja konačnih koncentracija od 10 mas. % PVA, 0,01 mas. % grafena, 0,1 M KNO_3 i $3,9 \cdot 10^{-3}$ mM AgNO_3 .

Elektrohemijska redukcija jona srebra izvedena je galvanostatski korišćenjem uređaja Reference 600 Potentiostat/Galvanostat/ZRA (Gamry Instruments, Warminster, PA, SAD) u elektrohemijskoj ćeliji, koja se sastojala od tri elektrode: dve Pt pločice (9 mm x 9 mm) kao radne i kontra elektrode dok je zasićena kalomelove elektrode (ZKE) korišćena kao referentna elektroda (Slika 4.1). Gustina struje, j , je varirana između 10 i 40 mA cm⁻², pri vremenu sinteze koje je takođe varirano između 10 i 75 min. Pre sinteze iz rastvora je uklonjen kiseonik prodivavanjem azota tokom 20 min koje je nastavljeno i tokom sinteze. Sinteza je izvođena uz kontinualno mešanje rastvora.



Slika 4.1. Shema elektrohemijske ćelije korišćene za sintezu Ag/PVA i Ag/PVA/Gr koloidnih disperzija (RE-radna elektroda, PE-pomoćna elektroda, Ref.E-referentna elektroda).

4.2.2. PRIPREMA FILMOVA

Priprema PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova vršena je izlivanjem rastvora PVA i PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr koloidnih disperzija u teflonskim posudama. Izliveni rastvori su zatim sušeni na sobnoj temperaturi 3 dana, a nakon toga 2 dana na temperaturi od 60° C. Prosečna debljina filmova iznosila je 70 µm.

4.2.3. PRIPREMA HIDROGELOVA

Priprema PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr hidrogelova vršena je izlivanjem rastvora PVA i koloidnih disperzija PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr u Petri šolje (prečnika ~90 mm i visine 5 mm) koje su podvrgnute ciklusima zamrzavanja i odmrzavanja. Ukupno je izvedeno pet sukcesivnih ciklusa. Ciklus se sastojao od zamrzavanja 16 h na -18° C i odmrzavanja 8 h na 4° C.

U slučaju Ag/PVA i Ag/PVA/Gr koloidnih disperzija, najpre su rastvori nakon sinteze 8 dana stajali na sobnoj temperaturi zaštićeni od svetlosti i nakon toga razblaženi 10 mas. % rastvorom PVA da bi se koncentracija srebra smanjila sa 3,9 mM na 1 mM.

Svi dobijeni hidrogelovi isecani su na male diskove prečnika 10 mm i visine 5 mm.

4.3. METODE KARAKTERIZACIJE

4.3.1. UV-VIDLJIVA SPEKTROSKOPIJA

Za snimanje UV vidljivog (*eng.* UV-Vis) spektra PVA rastvora i PVA/Gr koloidne disperzije, kao i za detekciju nanočestica srebra u Ag/PVA i Ag/PVA/Gr koloidnim disperzijama, korišćen je UV-3100 spektrofotometar (*Shanghai Mapada Instruments, Shanghai, Kina*) u opsegu talasnih dužina između 200 nm i 1000 nm.

4.3.2. TRANSMISIONA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM) Ag/PVA i Ag/PVA/Gr koloidnih disperzija vršena je na elektronskom mikroskopu 100 CX Electron Microscope (*JEOL Ltd., Tokyo, Japan*). Uzorci za TEM analizu razblaženi su destilovanom vodom (1:4) i postavljeni na bakarnu mrežicu prekrivenu ugljenikom (*SPI Supplies/Structure Probe Inc., West Chester, PA, SAD*).

4.3.3. CIKLIČNA VOLTAMETRIJA

Ciklična voltometrija (CV) Pt elektrode u 10 mas. % rastvoru PVA, koloidnim disperzijama Ag/PVA i Ag/PVA/Gr izvedena je korišćenjem dve Pt elektrode (9 mm × 10 mm) kao radne i pomoćne elektrode, i zasićene kalomelove elektrode (ZKE) kao referentne. Ciklična voltometrija je izvedena na instrumentu Reference 600 potentiostat/galvanostat/ZRA (*Gamry Instruments, Warminster, PA, SAD*). Snimljena merenja vršena su u opsegu potencijala između -1 i 1 V vs. ZKE, brzinom skeniranja od 50 mV s⁻¹, počevši od potencijala otvorenog kola, E_{pok} . Prikazani potencijali su u odnosu na ZKE.

4.3.4. INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA SA FURIJEVOM TRANSFORMACIJOM

Infracrveni (*eng.* IR) spektri PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova dobijenih uparavanjem rastvarača iz odgovarajućih koloidnih disperzija, snimljeni su

spektrofotometrom Spectrum One (*Perkin Elmer, Shelton, CT, SAD*), u opsegu vrednosti talasnog broja od 4000 cm^{-1} do 450 cm^{-1} sa spektralnom rezolucijom od $0,5\text{ cm}^{-1}$.

4.3.5. DIFRAKCIJA X-ZRAKA

Philips PW 1051 difraktometar sa Cu K_{α} zračenjem ($\lambda = 1,5418\text{ \AA}$) korišćen je za ispitivanje PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova difrakcijom X-zraka (*eng.* XRD). Stepen difrakcije je meren tehnikom skeniranja u rasponu uglova $2\theta = 8\text{--}80^{\circ}$ uz interval merenja od $0,05^{\circ}$ i vreme snimanja od 50 s za svaku tačku. Fazna analiza je urađena korišćenjem podataka PDF-2 (Powder Diffraction File) komercijalnog kompjuterskog programa *EVA V.9.0*. Srednja vrednost veličine kristalita, D_p , je izračunata pomoću Šererove jednačine (8) za (002) kristalnu ravan koristeći širinu XRD pika na poluvisini, $\beta_{1/2}$:

$$D_p = \frac{K\lambda}{\beta_{1/2} \cos\theta} \quad (8)$$

gde je koeficijent $K = 0,9$, λ talasna dužina X-zraka i θ ugao difrakcije.

4.3.6. RAMANSKA SPEKTROSKOPIJA

HR-Raman analiza PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova izvršena je korišćenjem Reinshaw Invia Raman spektrofotometra sa 514 nm argonskim laserom. Intenzitet je bio 10% od ukupne snage (50mW), u opsegu spektra od 4000 cm^{-1} do 450 cm^{-1} .

4.3.7. SKENIRAJUĆA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

Morfologija površina Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova analizirana je visokorezolucionom skenirajućom elektronskom mikroskopijom (*eng.* FE-SEM) na uređaju LEO SUPRA 55 (*Carl Zeiss, Germany*).

4.3.8. FOTOELEKTRONSKA SPEKTROSKOPIJA X-ZRACIMA

Za merenja fotoelektronske spektroskopije X-zracima (*eng.* XPS) Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova korišćen je spektrometar K-Alpha System (*Thermo Fisher*

Scientific, Waltham, MA, USA) sa monohromatskim Al K_α zračenjem (1486,6 eV) u širokom opsegu 0 – 1100 eV u visokom vakuumu 5·10⁻¹⁰ Torr. Ugao emitovanog snopa fotoelektrona je podešen na 30° u odnosu na normalnu površinu uzorka.

4.3.9. MEHANIČKA SVOJSTVA (TEST ISTEZANJA)

Instron 8871 uređaj korišćen je za test istezanja uzoraka PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova, na osnovu ASTM D638 standarda.

4.3.10. TERMOGRAVIMETRIJSKA ANALIZA

Termička stabilnost PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova ispitana je termogravimetrijskom metodom na uređaju *TGA Q5000 IR/SDT Q600*. Termogravimetrijska merenja su vršena u opsegu od 30 do 600 °C u dinamičnom modu pri brzini zagrevanja od 20 °C min⁻¹ u atmosferi azota.

4.3.11. ATOMSKA APSORPCIONA SPEKTROSKOPIJA

Otpuštanje srebra iz Ag/PVA i Ag/PVA/Gr hidrogelova ispitivano je na temperaturi 37 °C u fosfatnom puferu (pH = 7,4) koji je sadržao 0,39 mM KH₂PO₄ i 0,61 mM K₂HPO₄ i nije sadržao Cl⁻ jone da bi se izbeglo taloženje AgCl. Ag/PVA i Ag/PVA/Gr diskovi hidrogela (prečnika d ≈ 10 mm i debljine h ≈ 5 mm) su potopljeni u 10 cm³ fosfatnog pufera koji je menjan periodično, do 7. dana na svaka 24 h, a zatim 10, 14, 24 i 28 dana. Ukupni sadržaj srebra unutar hidrogelova je određen nakon potapanja hidrogelova u HNO₃ (1:1 v/v), u cilju oksidacije zaostalih nanočestica srebra u Ag⁺ jone. Svi eskperimenti su rađeni u triplikatu.

4.3.12. MTT TEST CITOTOKSIČNOSTI

Izolovane humane mononuklearne ćelije periferne krvi (*eng. PBMC, peripheral blood mononuclear cells*) u prisustvu PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova i hidrogelova korišćene su za ispitivanje preživljavanja humanih ćelija standardnim MTT testom. Boja koja se koristi u testu je MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid) koju mogu metabolisati samo žive ćelije. MTT je žuta tetrazolijumska so koju u živim, biohemijski aktivnim ćelijama redukuju mitohondrijske dehidrogenaze. Metabolisana MTT boja se naziva formazan, kristal

ljubičaste boje, koji ima maksimum apsorpcije na 570 nm. Količina rastvorenog formazana proporcionalna je broju živih ćelija. Za procenu broja prisutnih živih ciljnih ćelija u uzorcima koristi se intenzitet apsorpcije na 570 nm određen pomoću UV-spektrofotometra. Vijabilnost ćelija se računa na osnovu sledeće jednačine:

$$S (\%) = A_u / A_k \times 100 \quad (9)$$

gde je S - vijabilnost ćelija, A_u - apsorpcija uzorka ćelija tretiranih MTT bojom, koje su rasle u prisustvu PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filma ili hidrogela i podloge, A_k - apsorpcija ćelija tretiranih MTT bojom raslih u kontrolnom uzorku – hranljivi medijum.

Tri nezavisna eksperimenta se izvode u duplikatu, tako da se vijabilnost predstavlja kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

4.3.13. ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST

Antibakterijska aktivnost PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr hidrogelova koji su sadržali 1 mM nanočestica srebra ispitana je agar difuzionom metodom. Za određivanje antibakterijske aktivnosti korišćene su dve vrste bakterija, Gram-pozitivni *Staphylococcus aureus* TL (TMF – Beograd) i Gram-negativni *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterijski soj. Prilikom eksperimenta korišćene su dve Petri šolje sa hranljivim agarom (1,8 % agara) kao osnovnom podlogom preko koje je nanet sloj od 15 ml otopljenog hranljivog top agara (0,7 % agara) temperature 55 °C, koji je sadržao 200 μ l ispitivanog soja bakterije (ne starije od 18 sati). Nakon očvršćavanja top agara postavljeni su diskovi PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr hidrogela koji su prethodno tretirani UV zracima (sa svake strane po 20 minuta). Petri šolje su inkubirane na 37° C tokom 24 h.

Takođe, kinetika antibakterijske aktivnosti usitnjenih (kocke stranice ~2 mm) PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr hidrogelova ispitana je u fosfatnom puferu na već pomenute patogene bakterijske sojeve. Pre izvođenja eksperimenta usitnjeni hidrogelovi su tretirani UV zracima u trajanju od 20 minuta. Korišćeni bakterijski sojevi su aktivirani u LB bujonu sledećeg sastava (ekstrakt kvasca 5 $g l^{-1}$, tripton 10 $g l^{-1}$, NaCl 5 $g l^{-1}$) i inkubirani na 37 °C tokom noći (ne duže od 18 h).

Početni broj ćelija bakterija u svakoj suspenziji je podešen da bude između 10^4 - 10^6 CFU ml^{-1} . Uzorci su inkubirani u vodenom kupatilu tokom 24 h na 37 °C, uz

mešanje. Kao kontrolni uzorak korišćen je rastvor fosfatnog pufera bez hidrogelova. Ukupan broj ćelija određivan je na početku eksperimenta i nakon 1, 3 i 24 h inkubacije. U posmatranim vremenskim intervalima, uzorci su uzimani i decimalno razblaživani u fiziološkom rastvoru (0,85 % rastvor NaCl), nakon čega je 100 μ l odgovarajućeg razblaženja uzorka pomešano u Petri šolji sa 20 ml rastopljenog LB agara, temperature 55 °C. Petri šolje su inkubirane 24 h na 37 °C nakon čega su izbrojane formirane kolonije na agarnoj podlozi. Ukupan broj preživelih ćelija bakterija predstavljen je kao CFU ml⁻¹.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

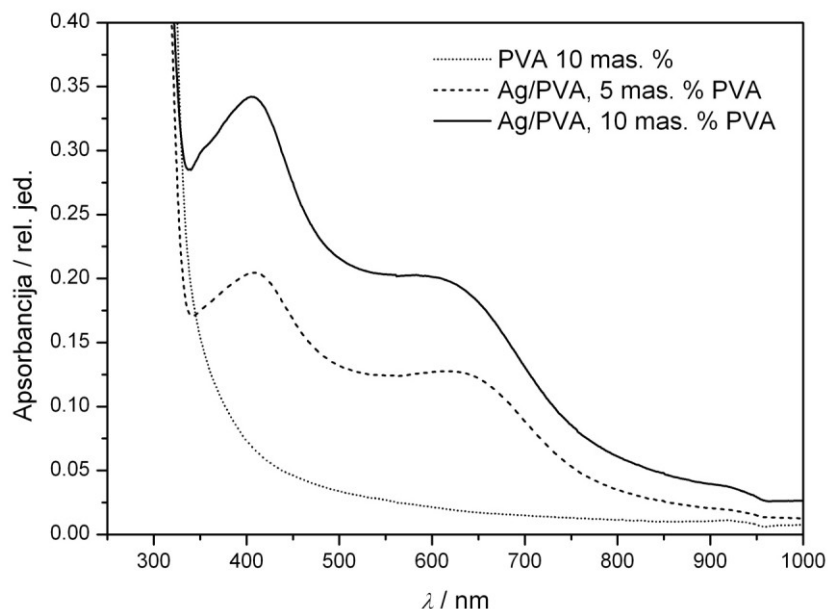
5.1. Ag/PVA i Ag/PVA/Gr NANOKOMPOZITNE KOLOIDNE DISPERZIJE

Prisustvo i stabilnost nanočestica srebra kao i uticaj koncentracije PVA u Ag/PVA i Ag/PVA/Gr koloidnim disperzija praćeni su UV-Vis spektroskopijom. Poznato je da nanočestice srebra apsorbuju elektromagnetno zračenje u uskom intervalu talasnih dužina UV-Vis spektra usled kolektivnog oscilovanja provodnih elektrona kada su pobuđeni odgovarajućim zračenjem. Ovaj fenomen poznat je kao lokalizovana rezonanca površinskog plazmona (*eng. localized surface plasmon resonance - LSPR*) i zavisi od veličine, oblika i drugih svojstava nanočestica [170].

5.1.1. UTICAJ KONCENTRACIJE PVA U Ag/PVA KOLOIDNOJ DISPERZIJI NA SINTEZU NANOČESTICA SREBRA

U cilju utvrđivanja uticaja koncentracije PVA na formiranje, rast i stabilnost nanočestica srebra elektrohemijska sinteza vršena je u PVA rastvorima koncentracije 5 i 10 mas. % PVA. Gustina struje, j , iznosila je 25 mA cm^{-2} pri vremenu sinteze od 10 min. Poznato je da se u opsegu talasnih dužina 405-420 nm može potvrditi prisustvo nanočestica srebra [124,125]. Na slici 5.1 prikazan su apsorpcioni spektri Ag/PVA koloidnih disperzija sa 5 i 10 mas. % PVA, kao i 10 mas. % rastvora PVA (kao referentnog). U prikazanom opsegu talasnih dužina 10 mas. % PVA rastvor ne pokazuje nijedan apsorpcioni pik, dok su kod obe Ag/PVA koloidne disperzije uočljiva dva apsorpciona pika oko 400 nm i 650 nm. Prvi apsorpcioni pik na $\sim 400 \text{ nm}$ potvrđuje da je došlo do formiranja nanočestica srebra, dok drugi apsorpcioni pik na talasnoj dužini

~650 nm pokazuje da je došlo do agregacije i aglomeracije nanočestica srebra prisutnih u koloidnim disperzijama [171,172].

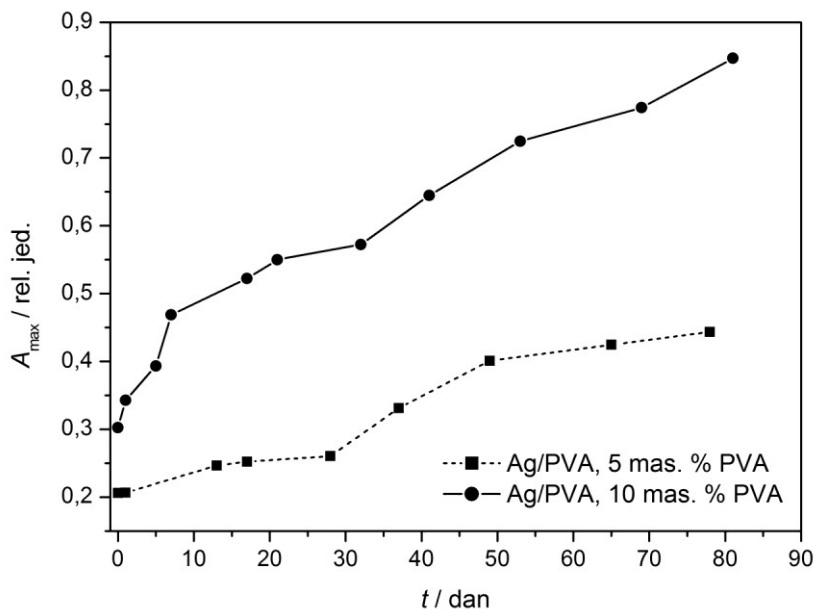


Slika 5.1. Apsorpcioni spektri Ag/PVA koloidnih disperzija sa 5 i 10 mas. % PVA i 10 mas. % PVA rastvora.

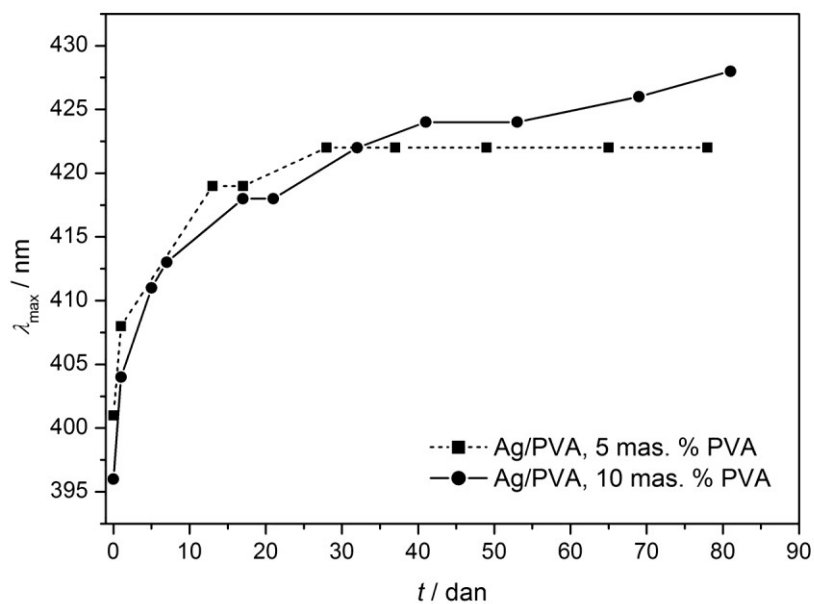
Razlika koja se uočava u apsorpcionim spektrima Ag/PVA koloidnih disperzija sa 5 i 10 mas. % PVA je u intenzitetu apsorpcije, gde je intenzitet apsorpcije veći kod Ag/PVA disperzije sa 10 mas. % PVA što pokazuje veći prinos nanočestica srebra pošto je koncentracija nanočestica srebra proporcionalna intenzitetu apsorpcije [172].

Takođe, praćen je uticaj koncentracije PVA na prinos i veličinu nanočestica kroz vremensku zavisnost apsorpcionog maksimuma, A_{max} , i talasne dužine apsorpcionog maksimuma, λ_{max} , slika 5.2 i slika 5.3, redom. Na slici 5.2 uočava se da se sa povećanjem koncentracije PVA povećava i apsorpcioni maksimum što ukazuje na veći prinos nanočestica srebra u Ag/PVA koloidnoj disperziji sa 10 mas. % PVA. Za obe Ag/PVA koloidne disperzije, apsorpcioni maksimum raste do 20. dana, zatim ostaje konstantan do 30. i dalji rast A_{max} nakon 30 dana koji se uočava je posledica geliranja koloidnih disperzija. Može se zaključiti da se apsorpcioni maksimum dostiže 20. dana nakon sinteze kada rast nanočestica prestaje. Sa slike 5.3 uočava se rast talasne dužine apsorpcionog maksimuma, λ_{max} , do 20. dana koja nadalje ostaje skoro konstantna, što je takođe pokazatelj da rast nanočestica prestaje 20 dana nakon sinteze. Slika 5.3 pokazuje

da koncentracija PVA nema uticaja na veličinu sintetisanih nanočestica srebra, jer je za obe koncentracije PVA talasna dužina maksimuma apsorbance, λ_{\max} , približno ista.



Slika 5.2. Zavisnost apsorpcionog maksimuma, A_{\max} , od vremena starenja Ag/PVA koloidnih disperzija sa 5 i 10 mas. % PVA.



Slika 5.3. Zavisnost talasne dužine apsorpcionog maksimuma, λ_{\max} , od vremena starenja Ag/PVA koloidnih disperzija sa 5 i 10 mas. % PVA.

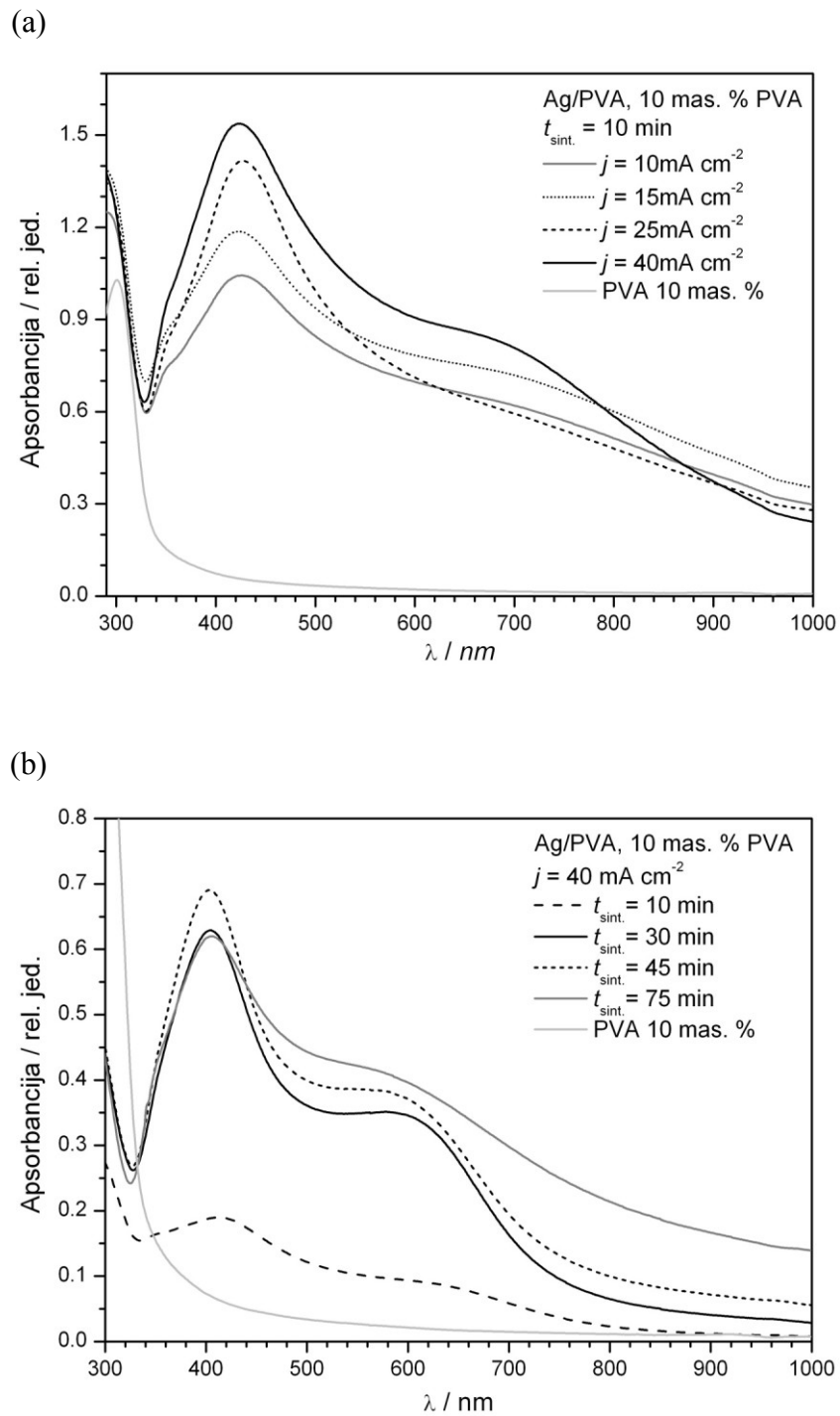
5.1.2. UTICAJ GUSTINE STRUJE I VREMENA NA SINTEZU NANOČESTICA SREBRA U Ag/PVA KOLOIDNOJ DISPERZIJI

U cilju određivanja optimalnih parametara elektrohemijske sinteze nanočestica srebra u PVA rastvoru varirana je gustina struje i vreme sinteze. Gustina struje je varirana između 10 i 40 mA cm⁻², dok je vreme sinteze varirano između 10 i 75 min.

Na slici 5.4a prikazani su spektri 10 mas. % PVA rastvora i Ag/PVA koloidnih disperzija dobijenih pri različitim vrednostima gustine struje od 10, 15, 25, 40 mA cm⁻² i vremenu sinteze od 10 min. Sve Ag/PVA koloidne disperzije pokazuju dva apsorpciona pika oko 400 nm i 650 nm. Apsorpcioni pikovi na 423, 422, 427, 423 nm za 10, 15, 25, 40 mA cm⁻², redom, potvrđuju formiranje nanočestica srebra. Uočava se da sa porastom vrednosti gustine struje raste i intenzitet apsorpcionog pika na ~400 nm što navodi na zaključak da se pri većim vrednostima gustine struje formira više nanočestica srebra pošto je koncentracija nanočestica srebra proporcionalna intenzitetu apsorpcije [172,173].

Slika 5.4b prikazuje spektre 10 mas. % PVA rastvora i Ag/PVA koloidnih disperzija dobijenih pri različitim vremenima sinteze od 10, 30, 45 i 75 min pri gustini struje od 40 mA cm⁻². Produžavanjem vremena sinteze (10, 30, 45 min) raste i maksimum apsorpcionog pika na ~420 nm čime je i prinos nanočestica srebra veći, dok pri vremenu sinteze od 75 min maksimum apsorpcionog pika opada. Takođe, apsorpcioni pik na ~650 nm takođe raste sa dužim vremenima sinteze što navodi na zaključak da je agregacija i aglomeracija nanočestica srebra izraženija pri dužim vremenima sinteze.

Na osnovu prethodne analize može se izvesti zaključak da su optimalni parametri sinteze za dobijanje nanočestica srebra 10 mas. % PVA pri gustini struje od 40 mA cm⁻² i vremenu sinteze od 30 min, jer se pri gustini struje od 40 mA cm⁻² dobija maksimalan prinos nanočestica srebra, dok se pri vremenu sinteze od 30 min dobijaju nanočestice srebra sa manjim udelom agregacije i aglomeracije (najmanji intenzitet apsorpcionog pika na ~650 nm).

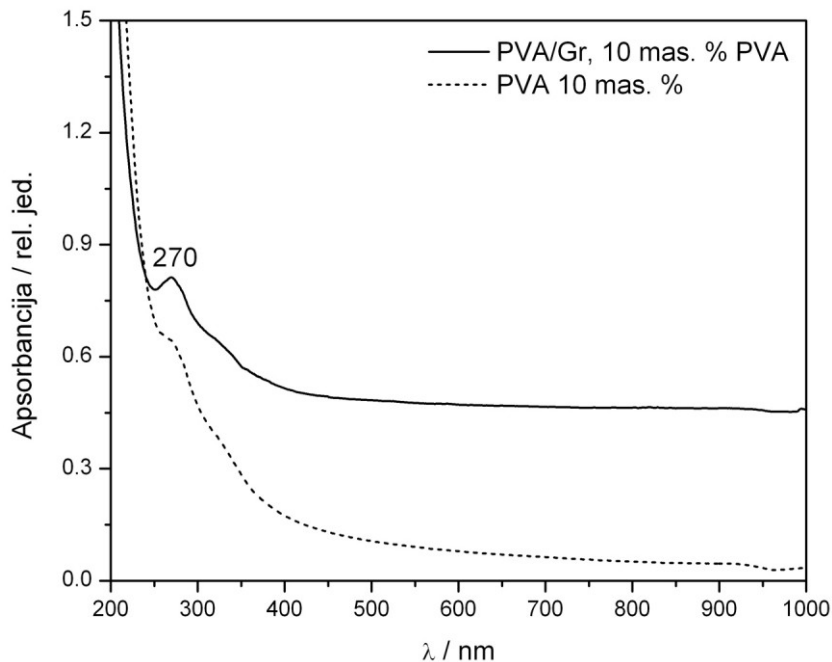


Slika 5.4. UV-Vis spektri PVA rastvora i Ag/PVA koloidnih disperzija sa 10 mas. % PVA pri: a) različitim vrednostima gustine struje i vremenu sunteze od 10 min, b) različitim vremenima sinteze i gustini struje od 40 mA cm^{-2} .

5.1.3. UTICAJ GRAFENA NA SINTEZU NANOČESTICA SREBRA U Ag/PVA/Gr KOLOIDNOJ DISPERZIJI

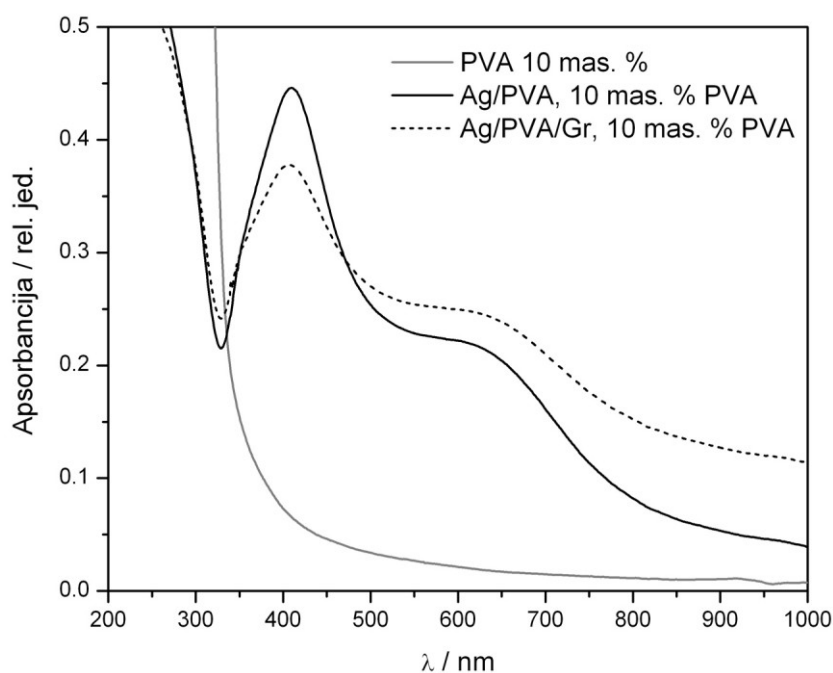
Za sintezu Ag/PVA/Gr koloidne disperzije, u 10 mas. % vodeni rastvor PVA (~60 °C) dodato je 0,01 mas. % grafena uz mešanje na magnetnoj mešalici. Nakon hlađenja rastvora do sobne temperature dodati su 0,1 M KNO₃ i 3,9 mM AgNO₃. Sinteza nanočestica srebra je vršena pri gustini struje, j , od 40 mA cm⁻² i vremenu sinteze od 30 min.

Prisustvo grafena u PVA/Gr koloidnoj disperziji sa 10 mas. % PVA potvrđeno je UV-vidljivom spektroskopijom. Na slici 5.5. prikazani su apsorpcioni spektri PVA/Gr koloidne disperzije i PVA rastvora (kao referentnog). PVA spektar pokazuje rame na talasnoj dužini ~270 nm što je posledica karbonilne funkcionalne grupe [174], dok se na apsorpcionom spektru PVA/Gr koloidne disperzije može se videti pik na ~270 nm kao posledica pobuđivanja π -plazmona grafitne strukture što potvrđuje prisustvo grafena u koloidnoj disperziji [175,176].



Slika 5.5. Apsorpcioni spektri PVA/Gr koloidne disperzije sa 10 mas. % PVA i 10 mas. % PVA rastvora.

Apsorpcioni spektar PVA rastvora, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr koloidnih disperzija sa 10 mas. % PVA prikazan je na slici 5.6. PVA rastvor ne pokazuje pik u prikazanom opsegu, dok apsorpcioni spektri obe Ag/PVA i Ag/PVA/Gr koloidne disperzije pokazuju pikove na ~400 nm i oko 650 nm. Prvi apsorpcioni pik na ~400 nm potvrđuje da su formirane nanočestice srebra, dok drugi apsorpcioni pik blizu 650 nm ukazuje na agregaciju i aglomeraciju nanočestica srebra [171,172].



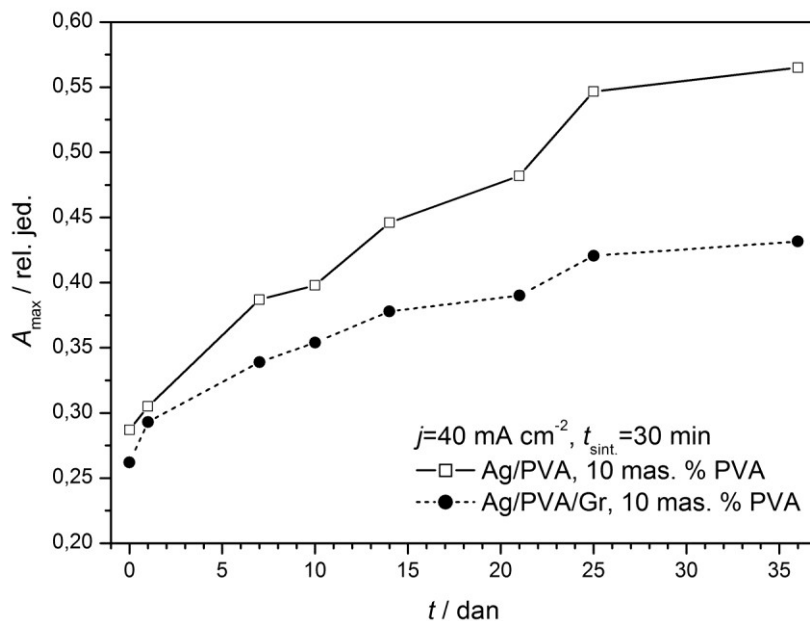
Slika 5.6. Apsorpcioni spektri Ag/PVA i Ag/PVA/Gr koloidnih disperzija sa 10 mas. % PVA i 10 mas. % PVA rastvora, 14. dana nakon sinteze.

Analiza UV-vidljive spektroskopije korišćena je i za utvrđivanje efekta starenja na prinos i veličinu nanočestica srebra. Vremenska zavisnost apsorpcionog maksimuma, A_{\max} , i talasne dužine, λ_{\max} , prikazana je na slici 5.7a i b, redom. U prisustvu grafena manje vrednosti A_{\max} ukazuju na manji prinos nanočestica srebra u Ag/PVA/Gr koloidnoj disperziji (Slika 5.7a). Za obe koloidne disperzije, A_{\max} raste do ~15. dana nakon sinteze. Apsorpcioni maksimum se dakle postiže 15 dana nakon sinteze kada se rast nanočestica zaustavlja.

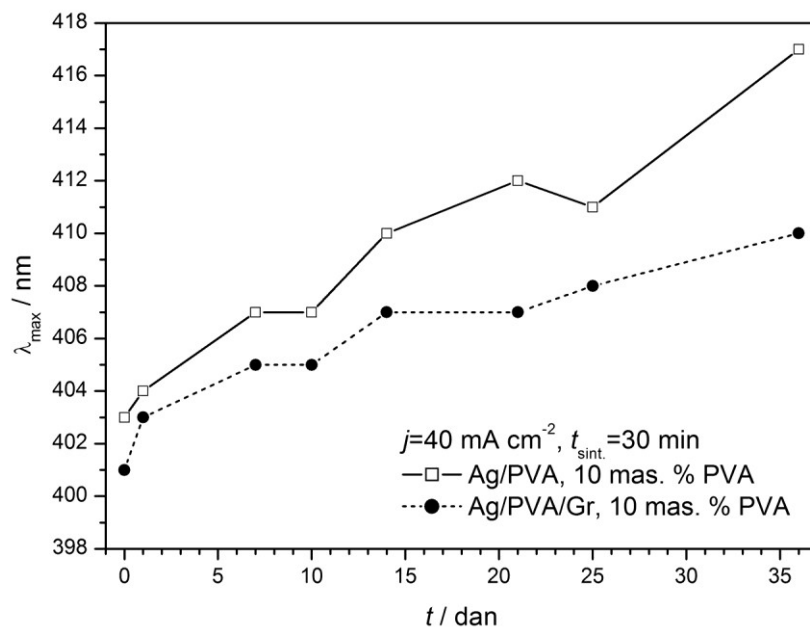
Za obe Ag/PVA i Ag/PVA/Gr koloidne disperzije, λ_{\max} raste sa vremenom (Slika 5.7b), dostižući vrednost od 407 nm za Ag/PVA/Gr i 410 nm za Ag/PVA 15. dana nakon sinteze. Manja vrednost λ_{\max} podrazumeva i manje dimenzije nanočestica

srebra [177], što pokazuje da Ag/PVA/Gr ima nanočestice manjih dimenzija u odnosu na Ag/PVA koloidnu disperziju, navodeći na zaključak da listovi grafena smešteni između polimernog lanca PVA sprečavaju rast, agregaciju i aglomeraciju srebrnih nanočestica srebra.

(a)



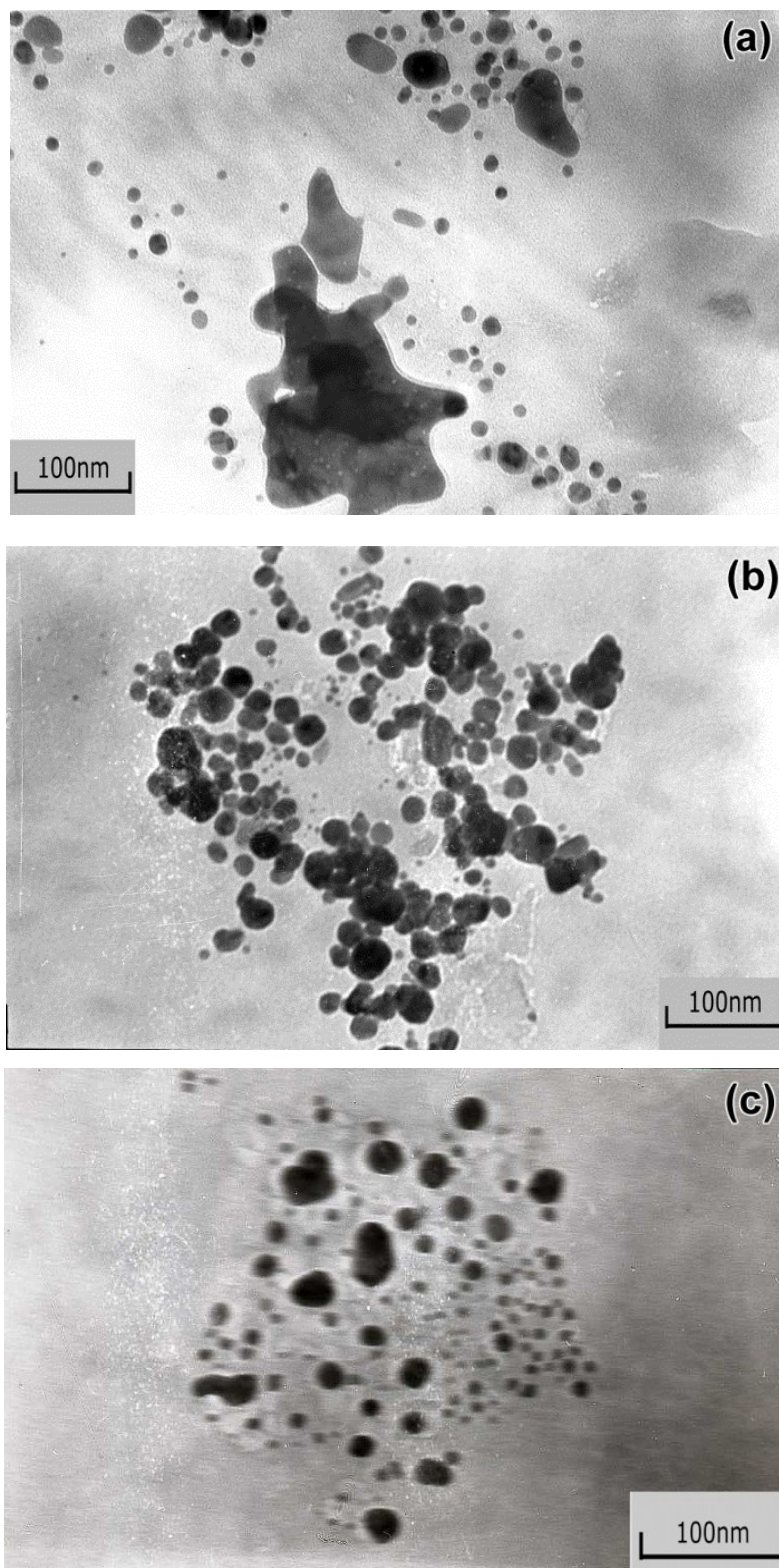
(b)



Slika 5.7. Zavisnost apsorpcionog maksimuma, A_{\max} (a) i talasne dužine apsorpcionog maksimuma, λ_{\max} (b) od vremena starenja Ag/PVA i Ag/PVA/Gr koloidnih disperzija sa 10 mas. % PVA.

Slika 5.8 prikazuje TEM mikrofotografije elektrohemijski dobijenih nanočestica srebra u Ag/PVA koloidnim disperzijama sa 10 mas. % PVA pri parametrima sinteze od $j = 15 \text{ mA cm}^{-2}$, $t = 10 \text{ min}$ (slika 5.8a); $j = 40 \text{ mA cm}^{-2}$, $t = 30 \text{ min}$ (slika 5.8b) i Ag/PVA/Gr koloidnoj disperziji sa 10 mas. % PVA pri parametrima sinteze $j = 40 \text{ mA cm}^{-2}$, $t = 30 \text{ min}$ (slika 5.8c). Sa slike 5.8 može se zaključiti da su dobijene nanočestice srebra u svim koloidnim disperzijama sfernog oblika sa prečnikom 10-40 nm. Međutim, pri manjim vrednostima gustine struje, $j = 15 \text{ mA cm}^{-2}$ (slika 5.8a), nanočestice srebra pokazuju veću tendenciju ka agregaciji i aglomeraciji u odnosu na nanočestice dobijene pri većim vrednostima gustine struje, $j = 40 \text{ mA cm}^{-2}$ (slika 5.8b i c), što potvrđuje da je optimalna vrednost gustine struje 40 mA cm^{-2} .

Takođe, manje dimenzije i manja agregacija nanočestica u Ag/PVA/Gr koloidnoj disperziji sa 10 mas. % PVA (slika 5.8c) može se pripisati listovima grafena smeštenim između polimernih lanaca koje sprečavaju dalji rast, agregaciju ili aglomeraciju nanočestica srebra. Ova tvrdnja je u saglasnosti sa prethodnim rezultatima dobijenim UV-vidljivom spektroskopijom.



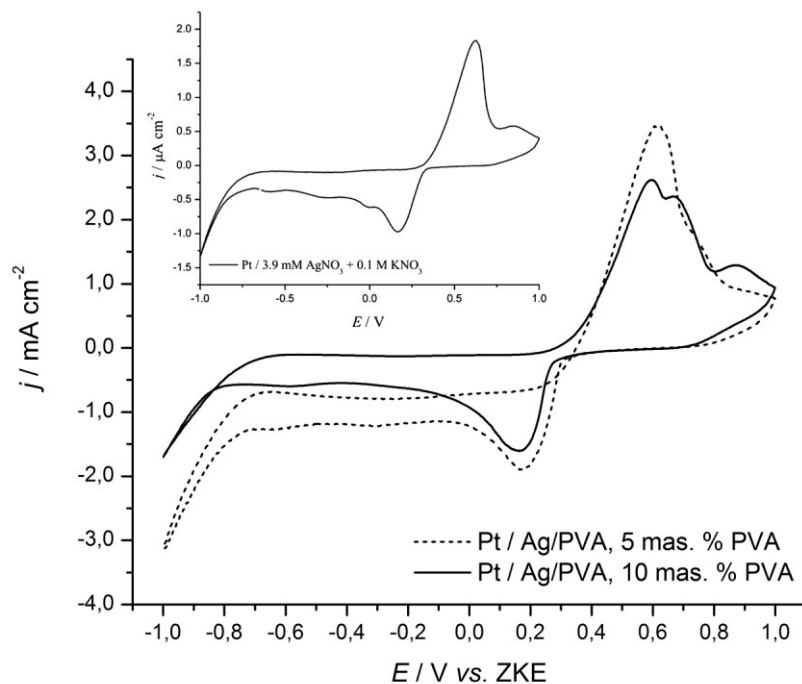
Slika 5.8. TEM mikrografije elektrohemijski sintetisanih nanočestica srebra u Ag/PVA koloidnim disperzijama sa 10 mas. % PVA na (a) $j = 15 \text{ mA cm}^{-2}$, $t = 10 \text{ min}$; (b) $j = 40 \text{ mA cm}^{-2}$, $t = 30 \text{ min}$ i (c) Ag/PVA/Gr koloidnoj disperziji sa 10 mas. % PVA na $j = 40 \text{ mA cm}^{-2}$, $t = 30 \text{ min}$.

5.1.4. CIKLIČNA VOLTAMETRIJA

Pri ispitivanju uticaja koncentracije PVA i elektrohemijskih parametara na sintezu nanočestica kao i uticaja vremena starenja na Ag/PVA i Ag/PVA/Gr koloidne disperzije korišćena je ciklična voltametrijia.

Slika 5.9 prikazuje ciklične voltamograme Pt elektrode u Ag/PVA koloidnim disperzijama sa 5 i 10 mas. % PVA, 24 h nakon sinteze. U cilju boljeg uvida u oksidoredukcione procese poređiće se pomenuti voltamogrami sa voltamogramom za Pt elektrodom u rastvoru koji sadrži 3,9 mM AgNO₃ i 0.1 M KNO₃ kao referentnim (insert na slici 5.9) [125]. Ukratko, u pomenutom rastvoru ciklični voltamogram za Pt elektrodu pokazuje glavni anodni (oksidacioni) pik na ~600 mV usled oksidacije srebra i manji širi pik na ~850 mV koji odgovara oksidaciji platine. Redukcija na Pt elektrodi pokazuje glavni katodni (redukcioni) pik na ~160 mV (odgovara anodnom piku na ~600 mV) koji se javlja kao posledica redukcije srebra, i manji katodni širi pik na -250 mV usled redukcije Pt oksida (odgovara anodnom piku na ~850 mV).

Kod Ag/PVA koloidne disperzije dobijene iz PVA rastvora koji je sadržao 5 mas. % PVA, Pt elektroda pokazuje anodni pik na 611 mV, koji je posledica oksidacije nanočestica srebra, kao i katodni pik na 165 mV, koji je posledica redukcije srebra. Takođe, za Ag/PVA koloidnu disperziju sa 10 mas. % PVA, Pt elektroda pokazuje tri anodna pika na 595, 667 i 871 mV. Na 160 mV može se uočiti jedan katodni pik. Prva dva anodna pika odgovaraju različitim oksidacionim procesima srebra, dok se pik na 871 mV odgovara oksidaciji platine. Dva anodna pika (595 i 667 mV) ukazuju na razlike između nanočestica srebra tj. na one podložnije oksidaciji pojavom pika na 595 mV i one manje podložne oksidaciji pojavom pika na 667 mV. Ova pojava se može objasniti imajući u vidu jače ili slabije koordinativne veze između srebra i hidroksilnih grupa PVA lanca, koje su potvrđene infracrvenom spektroskopijom o čemu će biti više reči u poglavlju 5.2.1.



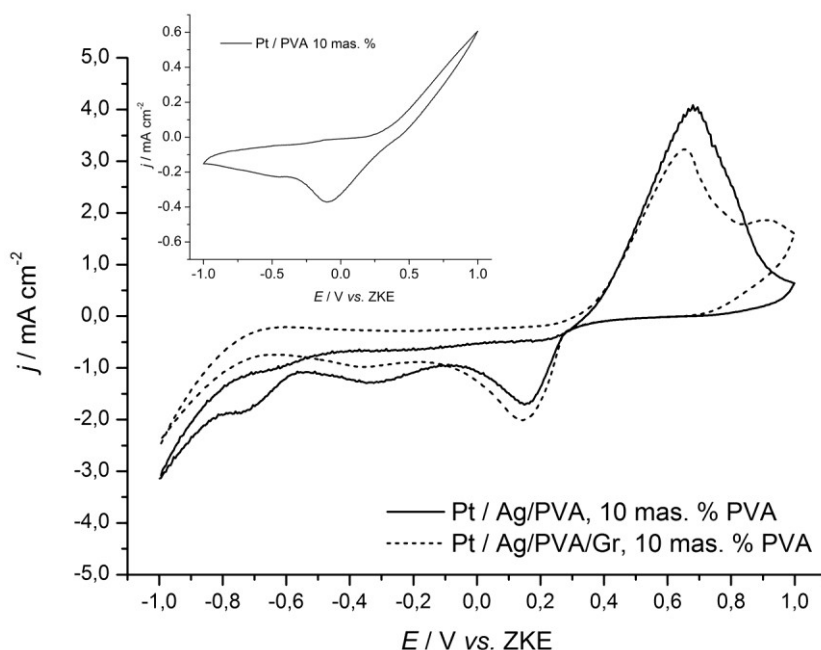
Slika 5.9. Ciklični voltamogrami Pt elektrode u Ag/PVA koloidnim disperzijama sa 5 i 10 mas. % PVA, 24 h nakon sinteze. Insert: Ciklični voltamogram Pt elektrode u 3.9 mM AgNO₃+0.1 M KNO₃ rastvoru [125]

Ciklični voltamogrami su snimljeni i za Pt elektrodu u 10 mas. % rastvora PVA i u Ag/PVA i Ag/PVA/Gr koloidnim disperzijama sa 10 mas. % PVA (slika 5.10) 10 dana nakon sinteze, kao i za Pt elektrodu u 10 mas % PVA rastvoru (insert slika 5.10).

Ciklični voltamogram za Pt elektrodu u 10 mas % PVA rastvoru (insert slika 5.10) pokazuje širok katodni pik na oko -100 mV koji potiče od redukcije Pt oksida formiranog tokom snimanja u anodnom smeru. Anodni kontrapik pomenutog pika je na ~ 850 mV, odgovara formiranju Pt oksida slabo je vidljiv zbog preklapanja oksidacionom strujom na potencijalima većim od 400 mV. Pomeraj katodnog pika sa -250 mV na -100 mV, kao i slabo vidljivog anodnog pika na 850 mV u odnosu na referentni 3,9 mM AgNO₃ + 0.1 M KNO₃ rastvor (insert slika 5.9) pripisuje se prisustvu PVA polimernih lanaca koji ometaju oksido-redukcijske procese na Pt elektrodi.

Ciklični voltamogram za Pt elektrodu u Ag/PVA koloidnoj disperziji sa 10 mas. % PVA (slika 5.10) pokazuje dva anodna pika: glavni pik na ~ 680 mV koji potiče od oksidacije nanočestica srebra, kao i manji, slabije izražen anodni pik na ~ 870 mV

usled oksidacije Pt i formiranja Pt oksida. Njihovi odgovarajući katodni pikovi su: pik na oko 180 mV koji odgovara redukciji nanočestica srebra i pik na -300 mV koji potiče od redukcije Pt oksida. Pomeraj anodnog i katodnog pika na pozitivnije potencijale (680 i 180 mV, redom) u poređenju sa referentnim 3,9 mM AgNO₃ + 0.1 M KNO₃ rastvorom (600 i 160 mV, redom, insert slika 5.9) je posledica prisustva nanočestica srebra u odnosu na jonsko srebro u referentnom rastvoru kao i PVA polimernih lanaca koji ometaju oksido-redukционе procese na Pt elektrodi.



Slika 5.10. Ciklični voltamogrami Pt elektrode u Ag/PVA i Ag/PVA/Gr koloidnim disperzijama sa 10 mas. % PVA, 10 dana nakon sinteze. Insert: Ciklični voltamogram Pt elektrode u 10 mas. % rastvoru PVA

Na cikličnom voltamogramu za Pt elektrodu u Ag/PVA/Gr koloidnoj disperziji sa 10 mas. % PVA (slika 5.10), uočena su dva anodna pika, jedan na ~650 mV usled oksidacije nanočestica srebra i drugi na ~950 mV koji potiče od formiranja Pt oksida. Dva odgovarajuća katodna pika su: pik na ~130 mV, koji odgovara redukciji nanočestica srebra i pik na -370 mV usled redukcije Pt oksida. Pomeranje oksido-redukcionih pikova nanočestica srebra ka negativnijim potencijalima (650 mV i 130 mV, redom) u odnosu na Ag/PVA koloidnu disperziju sa 10 mas. % PVA (680 mV i 180 mV, redom) ukazuje da su nanočestice srebra u Ag/PVA/Gr koloidnoj disperziji sa

10 mas. % PVA manjih dimenzija, sa manjom agregacijom usled prisustva listova grafena smeštenih između polimernih lanaca što dovodi do sprečavanja agregacije i aglomeracije nanočestica srebra. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim UV-vidljivom spektroskopijom (slika 5.7b) i TEM analizom (slika 5.8).

U tabeli 5.1 sumirane su vrednosti anodnih i katodnih pikova cikličnih voltamograma Ag/PVA i Ag/PVA/Gr koloidnih disperzija pri različitim koncentracijama PVA i različitim parametrima elektrohemijske sinteze nanočestica srebra kao i različitim vremenima nakon sinteze tj. starenja koloidnih disperzija.

Tabela 5.1. Parametri sinteze i vrednosti pikova cikličnih voltamograma Ag/PVA i Ag/PVA/Gr koloidnih disperzija sa 10 mas. % PVA.

Koloid	Parametri sinteze	Vreme eksperimenta	Anodni pik E_p / mV	Katodni pik E_p / mV
Ag/PVA (5 mas. % PVA)	$j = 25 \text{ mA cm}^{-2}$, $t = 10 \text{ min}$	24 h nakon sinteze	611; 870	165
Ag/PVA (10 mas. % PVA)	$j = 25 \text{ mA cm}^{-2}$, $t = 10 \text{ min}$	24 h nakon sinteze	595; 667; 871	160
Ag/PVA (10 mas. % PVA)	$j = 40 \text{ mA cm}^{-2}$, $t = 30 \text{ min}$	10 dana nakon sinteze	680; 870	180; -300
Ag/PVA/Gr (10 mas. % PVA)	$j = 40 \text{ mA cm}^{-2}$, $t = 30 \text{ min}$	10 dana nakon sinteze	650; 950	130; -370

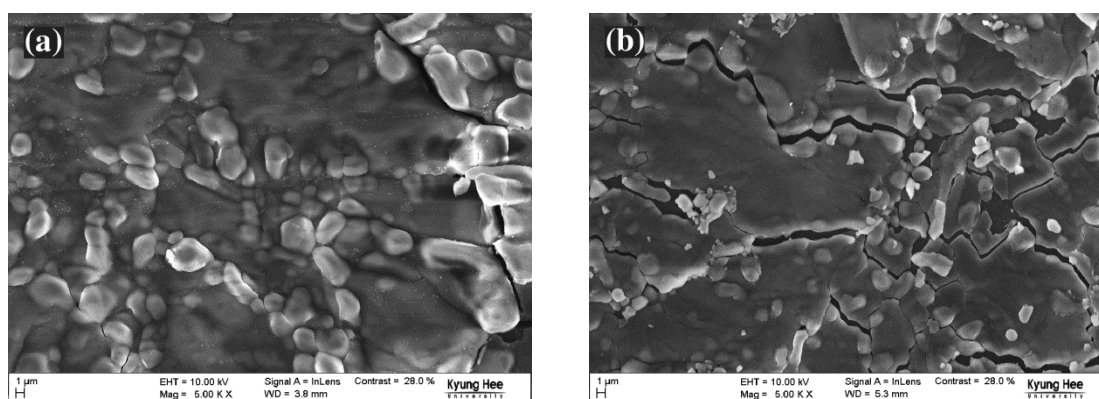
Iz prikazanih cikličnih voltamograma može se izvesti zaključak da pri većim koncentracijama PVA nanočestice srebra ostvaruju veći broj koordinativnih veza sa hidroksilnim grupama lanca PVA što se manifestuje i pojavom dva anodna pika kod Ag/PVA koloidne disperzije sa 10 mas. % PVA u odnosu na jedan anodni pik kod Ag/PVA koloidne disperzije sa 5 mas. % PVA. Takođe, ciklični voltamogrami Ag/PVA i Ag/PVA/Gr koloidnih disperzija sa 10 mas. % PVA pokazuju da 10 nakon sinteze dolazi do stabilizacije nanočestica srebra u koloidnim disperzijama tj. pojave jednog anodnog pika u odnosu na dva anodna pika kod koloidnih disperzija 24 h nakon sinteze što je u saglasnosti i sa UV-Vis analizom koja pokazuje prestanak rasta nanočestica srebra u periodu oko 10-15 dana nakon sinteze.

5.2. NANOKOMPOZITNI FILMOVI

PVA film, kao i nanokompozitni PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmovi dobijeni su izlivanjem rastvora i koloidnih disperzija u teflonskim posudama. Izliveni PVA rastvor sadržao je 10 mas. % PVA, koloidna PVA/Gr disperzija sadržala je 10 mas. % PVA i 0,01 mas. % grafena. Izlivene Ag/PVA kao i Ag/PVA/Gr koloidne disperzije sadržale su 10 mas. % PVA i dobijene su elektrohemijom redukcijom jona srebra pri gustini struje $j = 40 \text{ mA cm}^{-2}$ i vremenu sinteze od 30 min.

Izliveni rastvor i koloidne disperzije su zatim sušene na sobnoj temperaturi 3 dana, a nakon toga na temperaturi od 60° C 2 dana. Prosečna debljina filmova iznosila je $70 \mu\text{m}$.

FE-SEM mikrofotografije (slika 5.11) pokazuju da su nanočestice srebra u Ag/PVA/Gr filmu (Slika 5.11b) manjih dimenzija i/ili imaju manju agregaciju od nanočestica srebra u Ag/PVA filmu (slika 5.11a) usled listova grafena smeštenih između polimernih lanaca čime je sprečen rast, agregacija i aglomeracija nanočestica srebra u Ag/PVA/Gr filmu. Mogući način vezivanja biće diskutovan kod FTIR i XRD rezultata u daljem tekstu.



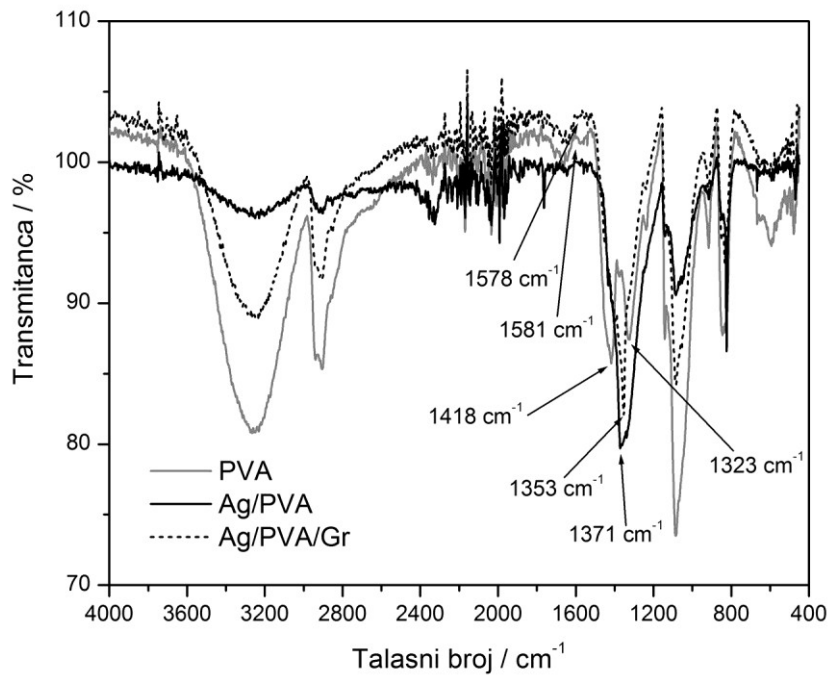
Slika 5.11. FE-SEM mikrofotografije a) Ag/PVA i b) Ag/PVA/Gr filmova.

5.2.1. INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA SA FURIJEOVOM TRANSFORMACIJOM

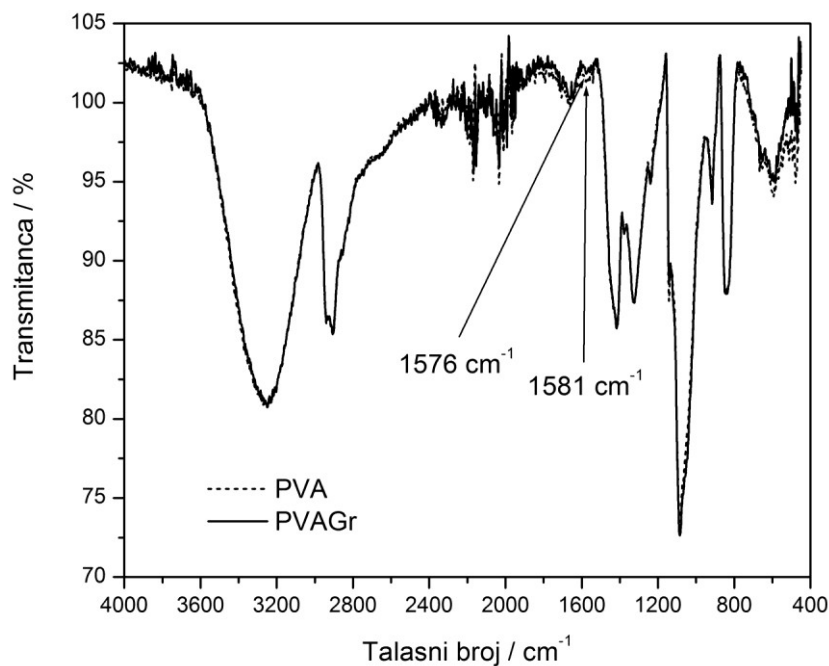
FTIR spektroskopijom ispitani su PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmovi u cilju utvrđivanja interakcija između PVA molekula, nanočestica srebra i grafena.

Spektri PVA (kao referentni), PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr pokazuju karakteristične trake (slika 5.12, slika 5.13, Tabela 5.2), za –OH istezanje na 3251, 3250, 3229 i 3231 cm^{-1} [178], redom, kao i trake koje potiču od istezanja C–H alkil grupe koja se nalazi na talasnim dužinama 845, 835, 824 i 833 cm^{-1} za PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr, redom [179]. Traka koja potiče od simetričnog C–C istezanja potvrđena je na talasnim dužinama 1142, 1141, 1139 i 1139 cm^{-1} za PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr, redom, dok je traka koja potiče od istezanja C–O iz sekundarnih alkohola potvrđena na talasnim dužinama 1086, 1085, 1084 i 1084 cm^{-1} , redom. Vibraciona traka u oblasti između 1090 i 1150 cm^{-1} pripisuje se kristalčnosti PVA s obzirom da je PVA polu-kristalni sintetički polimer [179].

Traka na 1578 cm^{-1} kod Ag/PVA/Gr spektra (slika 5.12, tabela 5.2), kao i traka na 1576 cm^{-1} kod PVA/Gr spektra (slika 5.13, tabela 5.2) odgovara skeletnim vibracijama grafena, što potvrđuje prisustvo grafena u Ag/PVA/Gr i PVA/Gr filmovima, dok kod PVA spektra, traka na 1581 cm^{-1} označava sp^2 hibridizovane C=C vibracije u polimernom PVA lancu. Očekivano, ova traka nije prisutna kod Ag/PVA spektra.



Slika 5.12. FT-IR spektri PVA, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova.



Slika 5.13. FT-IR spektri PVA i PVA/Gr filmova.

FTIR-spektri Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova pokazuju nekoliko razlika u poređenju sa PVA spektrom (slika 5.12). Važne razlike uočene su kod traka na 1418 i 1323 cm^{-1} PVA spektra koje odgovaraju udruženim vibracijama u ravni –OH grupe sa

klanjanjem C–H. Pomeranje trake sa 1418 cm⁻¹ kod PVA, na 1371 cm⁻¹ kod Ag/PVA i 1353 cm⁻¹ kod Ag/PVA/Gr spektra, kao i nepostojanje traka na 1323 cm⁻¹ kod Ag/PVA i Ag/PVA/Gr spektra nakon inkorporacije nanočestica srebra, ukazuje u oba slučaja na interakcije između nanočestica srebra i hidroksilnih grupa PVA molekula pošto je došlo do razdvajanja pomenutih (vibracija u ravni –OH grupe sa klanjanjem C–H) udruženih vibracija [180]. Veće pomeranje trake sa 1418 cm⁻¹, kod Ag/PVA/Gr na 1353 cm⁻¹, a kod Ag/PVA na 1371 cm⁻¹ ukazuje na pojavu dodatnih vodoničnih veza između OH⁻ grupa prisutnih u PVA i grupa koje sadrže kiseonik u listovima grafena smeštenih između polimernih lanaca u Ag/PVA/Gr filmu što može spečiti dalji rast i agregacija ili aglomeracija nanočestica srebra.

Tabela 5.2. Vrednosti talasnog broja na kojima se pojavljuju maksimumi na infracrvenim spektrima PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova.

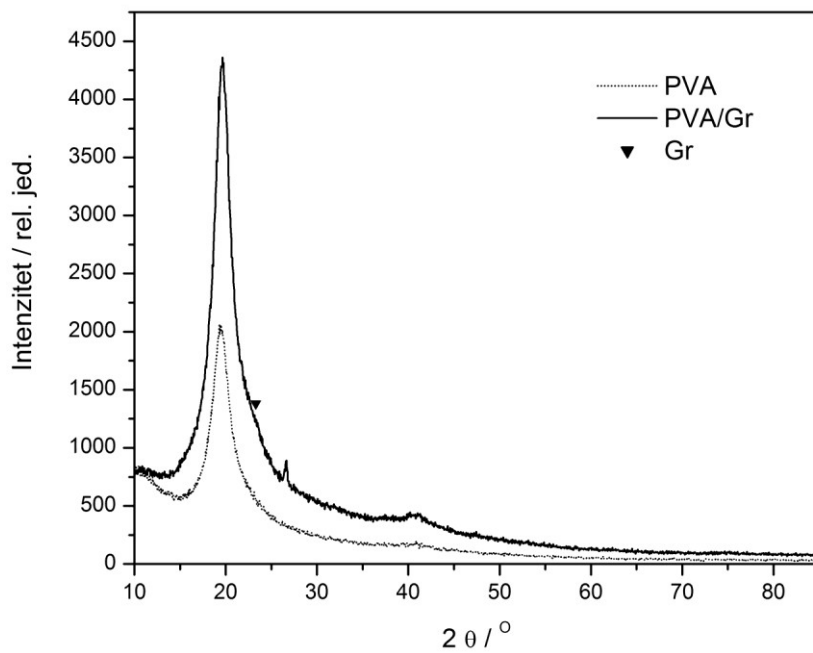
Talasni broj (cm ⁻¹)				Grupa [178,179,181,182]
PVA	PVA/ Gr	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr	
3251	3250	3229	3231	–OH vibracije istezanja
2905	2905	2902	2908	asimetrične CH ₂ vibracije istezanja i istezanje C–H alifatične grupe
1581	1576		1578	C=C vibracije istezanja
1418	1417	1371	1353	vibracije u ravni –OH grupe kuplovane sa klanjanjem C–H
1323	1324			
1234	1234		1235	C–C vibracije istezanja
1142	1141	1139	1139	simetrično C–C istezanje
1086	1085	1084	1084	C–O vibracije istezanja sekundarnih alkohola
916	916	916	916	simetrično C–C istezanje
845	835	824	833	C–H klackanje u ravni

5.2.2. DIFRAKCIJA X-ZRAKA

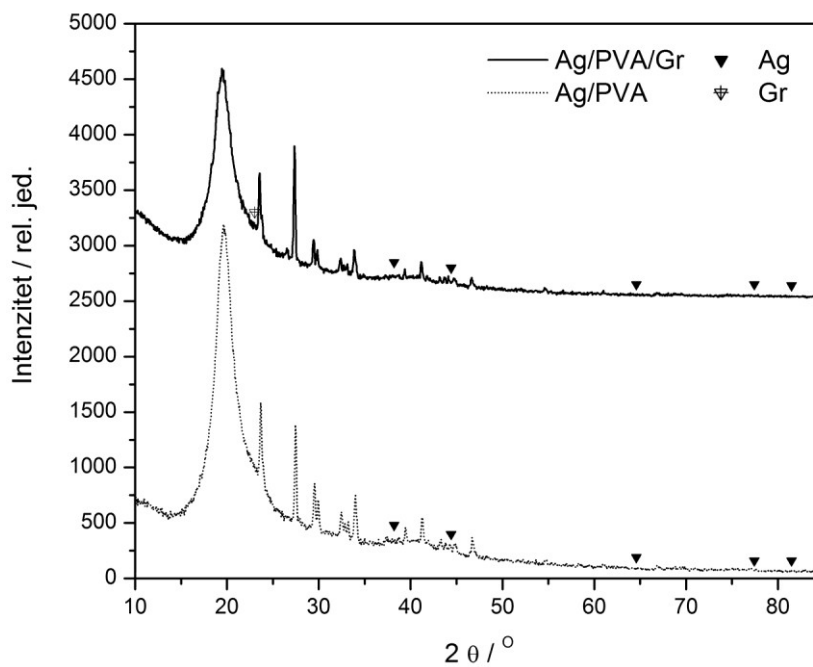
XRD difraktogrami PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova prikazani su na slici 5.14. i 5.15, redom. Na difraktogramima za PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr, pikovi na $2\theta = 19,3^\circ$, $19,65^\circ$, $19,65^\circ$ i $19,45^\circ$, redom, odgovaraju ravni (002) što je u vezi sa karakterističnim pikom za PVA koji dokazuje da PVA poseduje polu-kristalnu strukturu [23,183,184] usled inter i intramolekulskih vodoničnih veza PVA polimernog lanca [185,186]. Vrednosti uglova kod svih analiziranih uzoraka su $2\theta < 20^\circ$ što pokazuje da prisustvo nanočestica srebra i listova grafena ne narušava polukristalnu strukturu PVA [186].

Pet difrakcionih pikova za Ag/PVA i Ag/PVA/Gr (slika 5.15) na 2θ na $38,2^\circ$, $44,4^\circ$, $64,6^\circ$, $77,4^\circ$ i $81,5^\circ$ što odgovara Bragovim refleksijama (111), (200), (220), (311) i (222) kristalnih ravni srebra je u dobroj saglasnosti sa dostupnim podacima [128,186–188]. Slabije izražen pik na oko $2\theta = 25^\circ$ za PVA/Gr (slika 5.14) i Ag/PVA/Gr (slika 5.15) difraktogramima potvrđuje prisustvo grafena u PVA/Gr i Ag/PVA/Gr filmovima [31,189].

Srednja vrednost veličine kristalita, D_p , za PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr na $2\theta = 19,3^\circ$, $19,65^\circ$, $19,65^\circ$ i $19,45^\circ$, redom, izračunate pomoću Šererove jednačine (8) iznosi 2,782, 2,880, 2,880 i 2,602 nm, redom. Nanočestice srebra i grafena ne pokazuju veliki uticaj na srednju vrednost veličine kristalita kod svih analiziranih filmova.



Slika 5.14. XRD difraktogrami PVA i PVA/Gr filmova.



Slika 5.15. XRD difraktogrami Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova.

5.2.3. RAMANSKA SPEKTROSKOPIJA

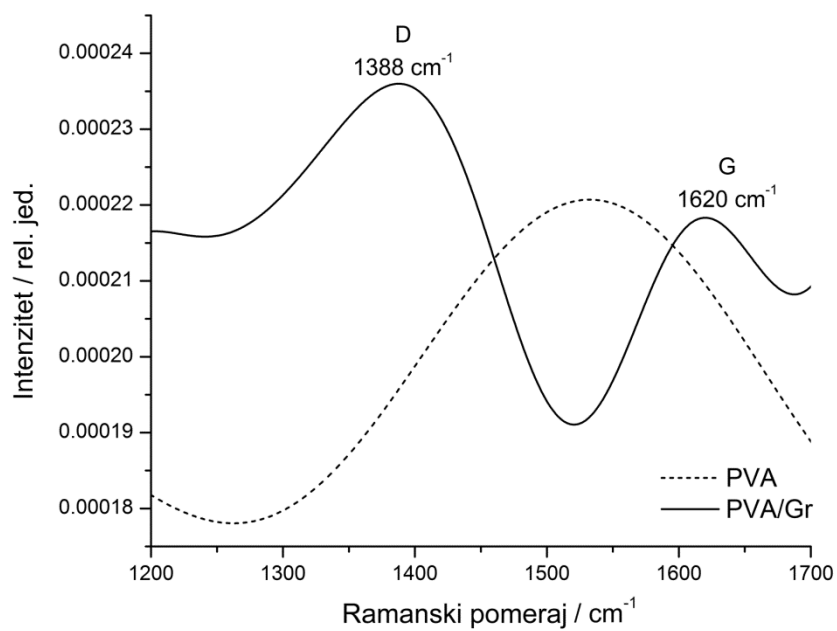
Ramanska spektroskopija (spektri prikazani na slici 5.16), korišćena je da bi se potvrdila inkorporacija grafena u PVA/Gr i Ag/PVA/Gr kompozitnim filmovima.

Ramanski spektar grafena karakterišu dva pika: G-pik, potiče iz prvog reda rasejanja E_{2g} fotona sp^2 orbitale ugljenikovog atoma (u oblasti 1500-1600 cm^{-1}), i D-pik (u oblasti 1200-1500 cm^{-1}), koji potiče od RBM (*eng.* radial breathing mode) k-tačke fotona A_{1g} simetrije. Može se reći da D-pik predstavlja ivice i druge defekte, delokalizovane sp^3 orbitale ugljenikovog atoma, kao i nečistoće, dok G-pik odgovara sp^2 -orbitali ugljenikovog atoma [191–193]. Takođe, karakterističan je i 2D pik u oblasti $\sim 2600-2700$ cm^{-1} koji se koristi za identifikaciju prisustva jedno ili višeslojnih listova grafena. U 2D opsegu ukoliko je prisutno više pikova zbog razdvajanja elektronskih traka radi se o strukturi višeslojnog grafena [194].

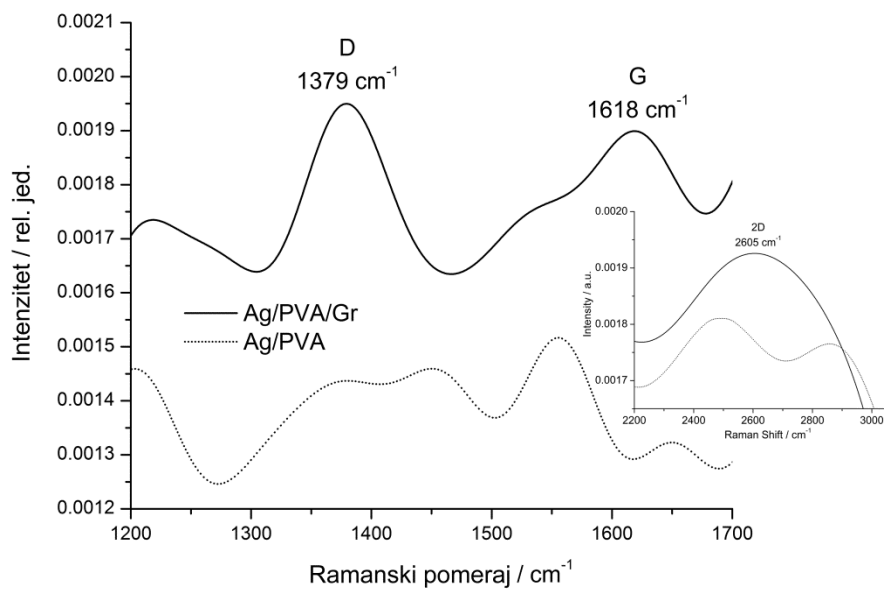
Na slici 5.16a prikazani su Ramanski spektri PVA i PVA/Gr filmova. Na PVA spektru se ne uočavaju karakteristični pikovi za grafen, dok se na PVA/Gr spektru uočava D-pik na 1388 cm^{-1} i G-pik PVA/Gr na 1620 cm^{-1} . Slika 5.16b prikazuje Ramanske spektre za Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmove. Na Ag/PVA spektru se ne uočavaju karakteristični pikovi za grafen, dok se na Ag/PVA/Gr spektru uočava D-pik na 1379 cm^{-1} , G-pik na 1618 cm^{-1} , kao 2D pik na 2605 cm^{-1} . Slab intenzitet D i G pika na spektrima je posledica male koncentracije grafena u PVA/Gr i Ag/PVA/Gr kompozitnih filmova.

Odnos intenziteta D i G pika (I_D/I_G) je još jedna karakteristika Ramanskog spektra grafena koji prikazuje nivo defekta (nepravilnosti) rešetke grafena i prisustvo nečistoća [191,195]. Odnos intenziteta za PVA/Gr iznosi $I_D/I_G = 1,08$, dok za Ag/PVA/Gr $I_D/I_G = 1,03$. Veće vrednosti intenziteta I_D/I_G pokazuju i veće nepravilnosti u rešetci grafena [191]. Međutim, u slučaju PVA/Gr i Ag/PVA/Gr, nepravilnosti se mogu tumačiti dobrom inkorporacijom listova grafena sa polimernim PVA lancem i nanočesticama srebra koje se ostvaruju sa delokalizovanim sp^3 orbitalama ugljenikovih atoma grafena.

(a)



(b)



Slika 5.16. Ramanski spektri za a) PVA i PVA/Gr filmove i b) Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmove.

5.2.4. FOTOELEKTRONSKA SPEKTROSKOPIJA X-ZRACIMA

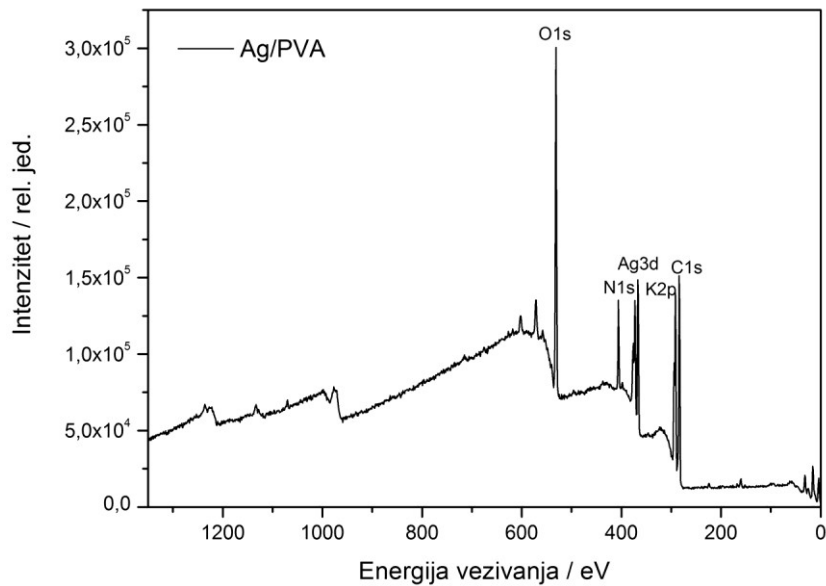
Elementarni sastav Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova određen je fotoelektronskom spektroskopijom X-zracima i rezultati su prikazani na slici 5.17a i b, redom i Tabeli 5.3.

XPS spektri oba filma pokazuje prisustvo ugljenika (C1s), kiseonika (O1s) i srebra (Ag3d), što je prikazano u Tabeli 5.3. C1s pik potiče od PVA (energija vezivanja (EV) 285,02 eV) ili od dodatog grafena koji ima EV 284,95 eV jer se C1s pik kome odgovara EV od 285,0 eV može pripisati C=C (sp²) grafitnoj mreži. Energija vezivanja Ag3d_{3/2} pika je 373,1 eV, a Ag3d_{5/2} pika 367,1 eV, za oba Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filma, što je u dobroj saglasnosti sa podacima iz literature i ukazuje na formirane nanočestice srebra [196]. O1s pik potiče od samog PVA sa energijom vezivanja od 533,0 ili od dodatog grafena EV 532,9 eV usled C–O veza, koje su karakteristika C–O istežanja listova grafena [197]. XPS spektar Ag/PVA/Gr filma nesporno dokazuje inkorporaciju grafena kroz rast C1s i O1s sadržaja.

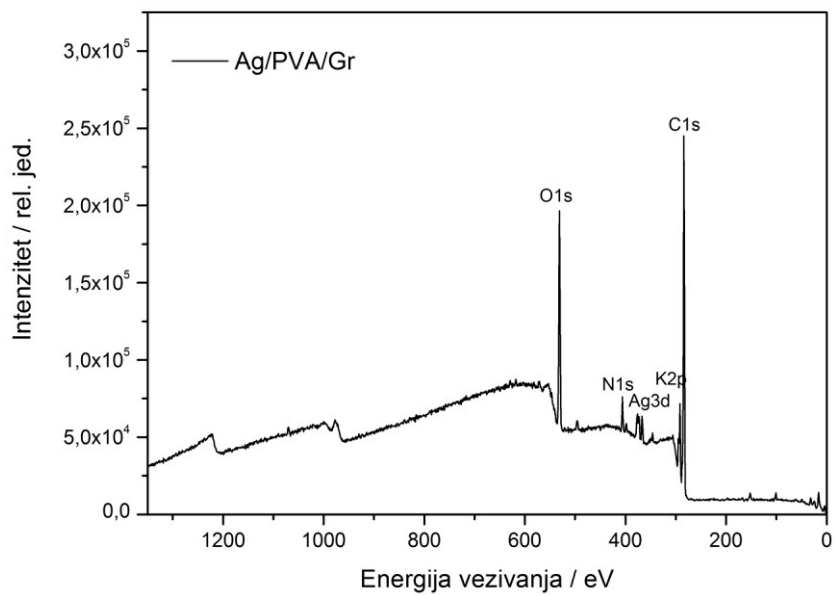
Tabela 5.3. Atomi udeli elemenata Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova.

	sastav (at. %)	energija vezivanja (eV)
Ag/PVA		
C1s	56,54	285,0
O1s	41,36	533,0
Ag3d _{3/2}	2,10	373,1
Ag3d _{5/2}		367,1
Ag/PVA/Gr		
C1s	77,38	284,9
O1s	22,30	532,9
Ag3d _{3/2}	0,32	373,1
Ag3d _{5/2}		367,1

(a)



(b)



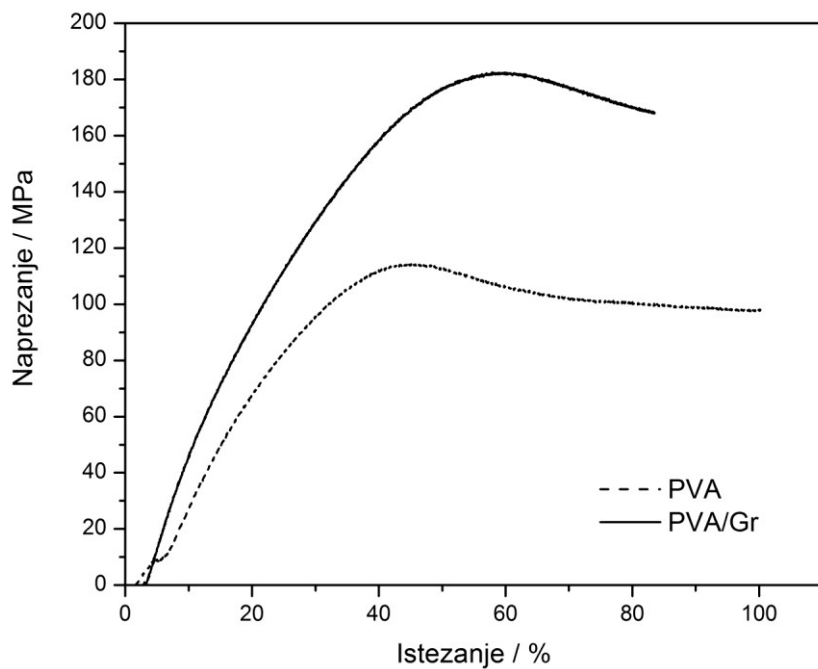
Slika 5.17. XPS spektri za a) Ag/PVA i b) Ag/PVA/Gr filmove.

5.2.5. MEHANIČKA SVOJSTVA

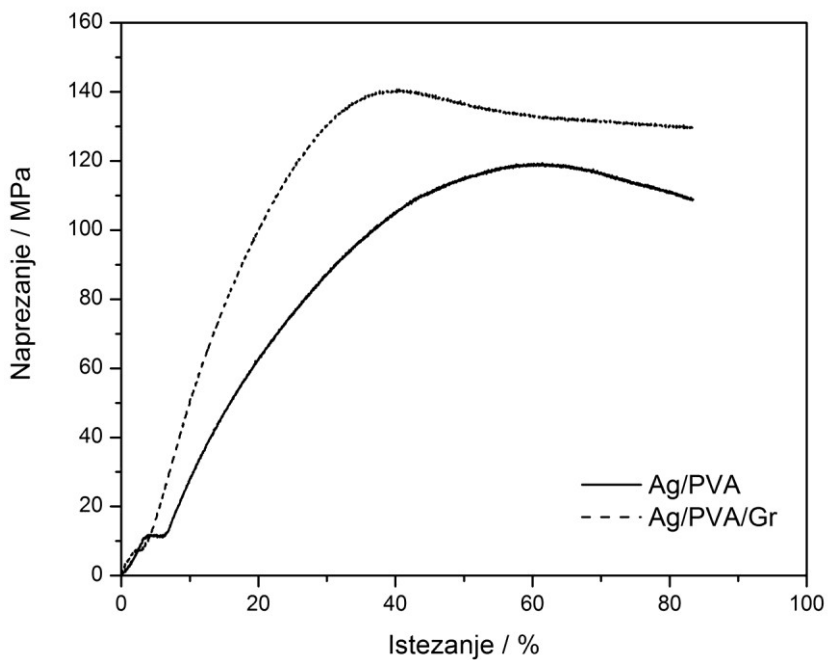
Test istezanja izveden je da bi se odredila mehanička svojstva PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova. Dijagrami napon-deformacija prikazani su na slici 5.18a i b, dok su vrednosti zatezne čvrstoće, Jungovog modula i istezanje navedeni u Tabeli 5.4. Slika 5.18a prikazuje dijagrame napon-deformacija PVA i PVA/Gr filmova. Dodatak grafena od 0,01 mas. % povećava zateznu čvrstoću sa 114,0 MPa za PVA film na 177,9 MPa za PVA/Gr film što je povećanje od 56 %, dok je modul elastičnosti povećan za 20,6 %. Takođe, pored uticaja grafena, ispitivan je i uticaj nanočestica srebra na mehanička svojstva polimernih filmova. Slika 5.18b prikazuje dijagrame napon-deformacija Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova. U odnosu na PVA film zatezne čvrstoće 114,0 MPa, zatezna čvrstoća za Ag/PVA i Ag/PVA/Gr je 121,2 i 141,1 MPa, redom, tj. 6,3 % i 23,8 % veća u odnosu na PVA film. Jungov modul elastičnosti za Ag/PVA film je 45,4 % manji u odnosu na PVA film, dok je za Ag/PVA/Gr film 23,8 % veći.

Istraživanja i drugih autora takođe pokazuju poboljšanja mehaničkih svojstava dodatkom malih koncentracija grafena u PVA matricu. Poboljšanje se može objasniti stvaranjem vodoničnih veza između grafena i hidroksilnih grupa PVA lanca koje se nalaze van kristalnih područja samog PVA čime se dodatno povećava kristaličnost i čvrstoća filma [160,198–200]. Primećeno je da sa povećanjem koncentracije grafena proporcionalno ne dolazi do poboljšanja mehaničkih svojstava tj. pri određenim koncentracijama koje pokazuju značajne promene mehaničkih svojstava, daljim povećanjem koncentracije nema značajnijih promena mehaničkih svojstava. Na osnovu toga, istraživanjem se došlo do postavljanja modela interakcija grafena i hidroksilnih grupa PVA lanca: (1) pri nižim koncentracijama pojedinačni listovi grafena ostvaruju interakcije sa PVA lancem, (2) povećanjem koncentracije grafena može doći do bočnih interakcija listova grafena čime dolazi do spajanja ivica listova koji tako spojeni interaguju sa PVA lancem, (3) daljim povećanjem koncentracije grafena listovi se delimično preklapaju i (4) pri većim koncentracijama dolazi do preklapanja više listova grafena koji su međusobno povezani Van der Valsovim vezama. Može se zaključiti da je efikasnost pri vezivanju grafena sa PVA lancem veća u slučaju (1) i (2) u odnosu na (3) i (4) tj. kada ne dolazi do međusobnih interakcija listova grafena [34,84].

(a)



(b)



Slika 5.18. Dijagrami istezanja za a) PVA i PVA/Gr i b) Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmove.

Istraživanja uticaja nanočestica srebra na mehanička svojstva PVA nanokompozitnih pokazuju da polimerni lanci formiraju vodonične veze sa nanočesticama srebra čime se kristaličnost polimernog filma povećava, što se odražava na poboljšanje mehaničkih svojstava. [180,201,202].

Rezultati testa istezanja nedvosmisleno pokazuju poboljšanje mehaničkih svojstava prisustvom grafena u PVA/Gr i Ag/PVA/Gr filmovima i nanočestica srebra u Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmovima. Takođe, može se zaključiti da postoji dobra inkorporacijom grafena i nanočestica srebra ostvarivanjem veza sa hidroksilnim grupama PVA molekula što su pokazale i prethodne analize infracrvene spektroskopije, difrakcije X-zraka i ramanske spektroskopije.

Tabela 5.4 Vrednosti zatezne čvrstoće, Jungovog modula i istezanja PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova

	Zatezna čvrstoća (MPa)	Jungov modul (GPa)	Istezanje (%)
PVA	114,0 ± 0,4	0,566 ± 0.095	91,1 ± 8,45
PVA/Gr	177,9 ± 4,8	0,683 ± 0.038	83,5 ± 0,01
Ag/PVA	121,2 ± 2,5	0,309 ± 0.059	83,4 ± 0,02
Ag/PVA/Gr	141,1 ± 0,4	0,701 ± 0.039	83,5 ± 0.04

5.2.6. TERMIČKA STABILNOST

Termogravimetrijska (TGA) i diferencijalna termogravimetrijska analiza (DTG) izvedene su da bi se istražio efekat inkorporacije listova grafena na termičku stabilnost polimernih filmova. Na slici 5.19 prikazane su TGA i DTG kriva za Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmove, dok su na slici 5.20 prikazane TGA i DTG krive za PVA i PVA/Gr filmove.

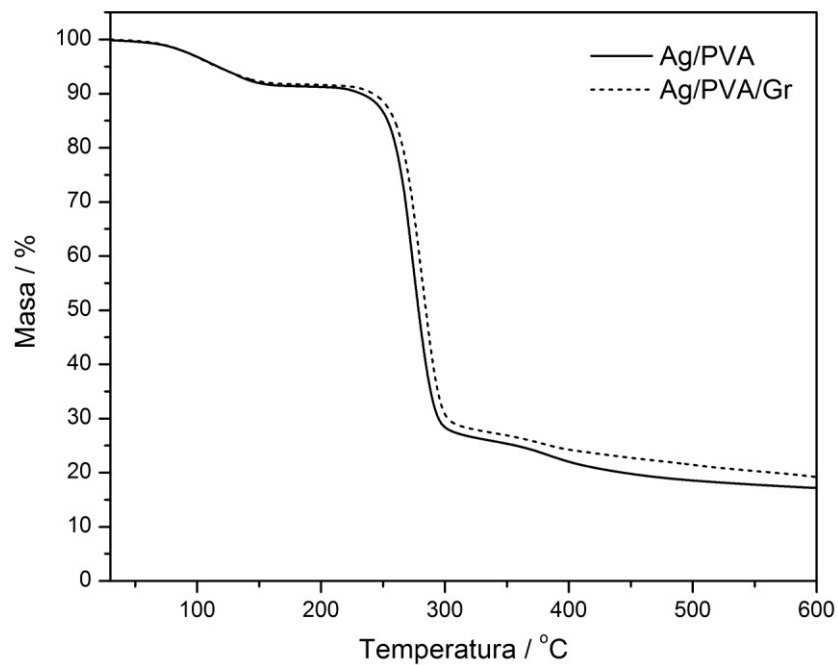
Kao što pokazuje slika 5.19a, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmovi pokazuju tri karakteristična stupnja gubitka mase: prvi u oblasti 70-120 °C koji se odnosi se na gubitak apsorbovane vode iz filmova, drugi u oblasti 230-320 °C u kom se pojavljuje značajan gubitak mase tj. degradacija PVA (u Ag/PVA filmu) i PVA i grafena (u Ag/PVA/Gr filmu), i treći u oblasti 350-600 °C gde dolazi do dalje degradacije zaostalih komponenti. DTG kriva (slika 5.19b) pokazuje pikove temperature na kojima dolazi do maksimuma gubitka mase. Temperaturni pik za Ag/PVA/Gr film je 282 °C, za 8 °C viši u odnosu na Ag/PVA film što potvrđuje postojanje veza između PVA molekula i grafena [199,203,204]. Takođe, manji gubitak mase na 450 °C (Slika 5.19a) za Ag/PVA/Gr (77,26 mas. %) u odnosu na Ag/PVA (80,21 mas. %) pokazuje veću stabilnost Ag/PVA/Gr filma zbog već pomenutih jačih međumolekulskih interakcija.

Sa slike 5.20 koja prikazuje TGA i DTG krive za PVA i PVA/Gr filmove mogu se takođe kao i u prethodnoj analizi uočiti tri karakteristična stupnja gubitka mase. Sa DTG krive (slika 5.20b) temperaturni pik na kome dolazi do maksimalnog gubitka mase za PVA film je 282 °C, dok je za PVA/Gr 285 °C tj. za 3 °C viši u odnosu na PVA film čime se potvrđuje uticaj listova grafena na povećanje termičke stabilnosti filma. Gubitak mase na 450 °C (slika 5.20a) u slučaju PVA filma iznosi je 85,11 mas. %, dok je za PVA/Gr film iznosio 88,56 mas. %.

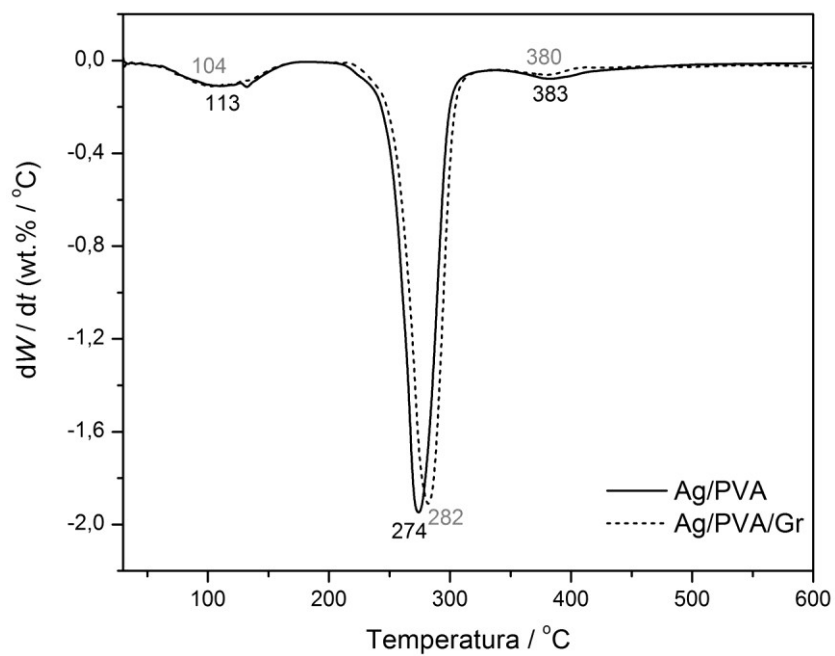
Na osnovu termogravimetrijske analize, može se zaključiti da prisustvo grafena povećava termičku stabilnost polimernih filmova. Prisustvo srebra iako pokazuje nešto niže temperaturne pikove na kojima dolazi do maksimuma gubitka mase u odnosu na filmove koji ne sadrže srebro, pokazuje manji gubitak mase na 450 °C. Nanočestice srebra svojim vezama sa –OH grupama PVA lanca povećavaju potrebnu energiju za

reakcije eliminacije koje dovode do stvaranja poliena i kidanja polimernog lanca što za posledicu ima i manji gubitak mase [184], što prethodna analiza jasno pokazuje.

(a)

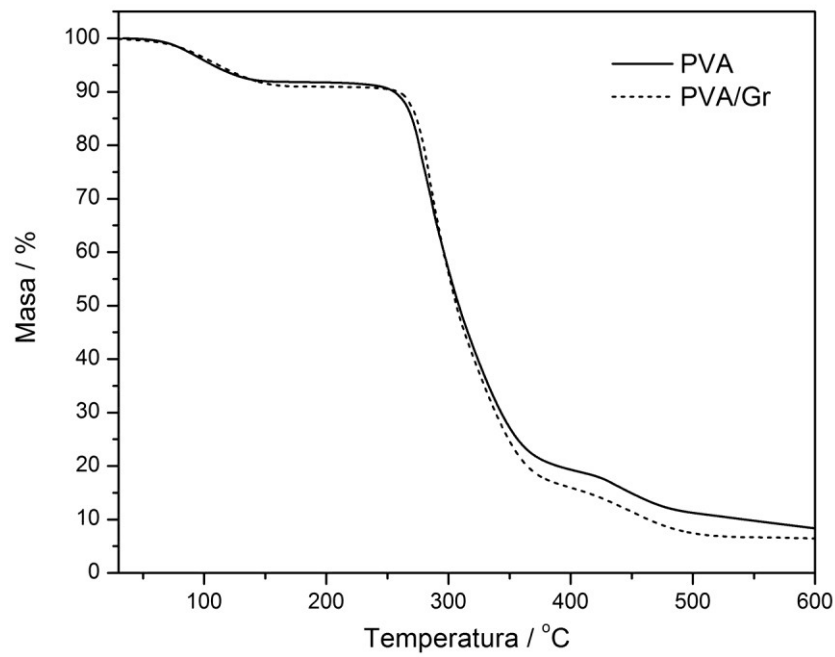


(b)

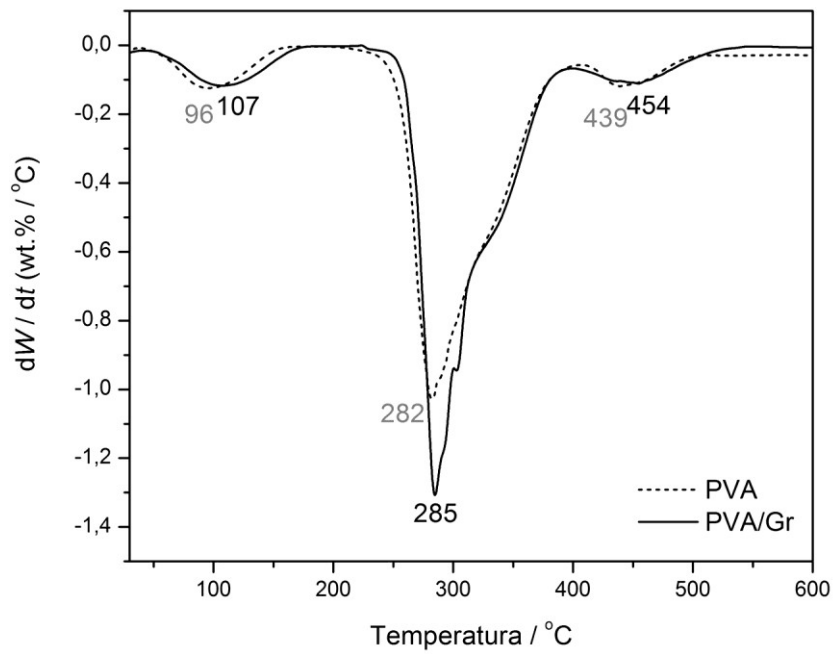


Slika 5.19. (a) TGA i (b) DTG krive za Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmove.

(a)



(b)

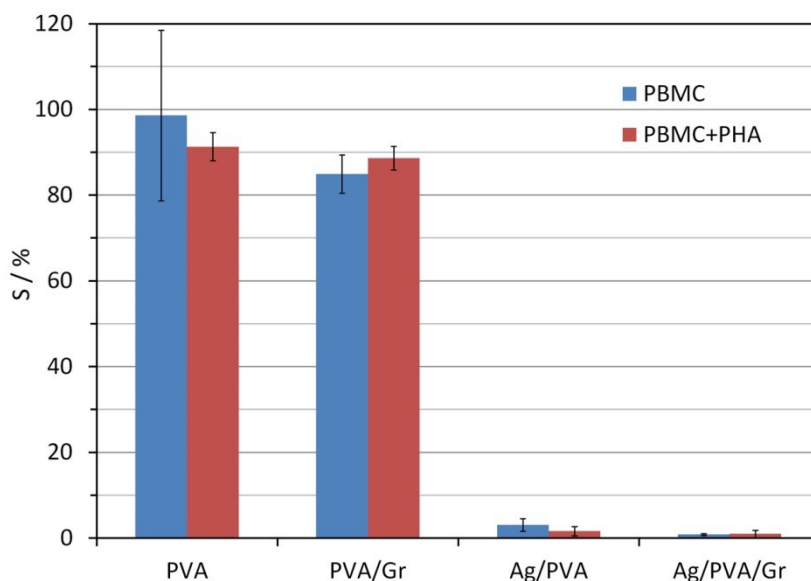


Slika 5.20. (a) TGA i (b) DTG krive za PVA i PVA/Gr filmove.

5.2.7. MTT TEST CITOTOKSIČNOSTI

Citotoksičnost PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova dobijenih iz disperzija sa 3,9 mM AgNO₃ je određena MTT testom sa zdravim mononuklearnim ćelijama periferne krvi (PBMC) i PBMC ćelijama stimulisanih na proliferaciju fitohemaglutininom (*eng.* PHA). PBMC ćelije se sastoje od limfocita i monocita i predstavljaju jednu od glavnih populacija humanih ćelija imunog sistema [205]. Ispitani efekti filmova na PBMC i PBMC+PHA ćelije kao prvu odbranu imunog sistema u telu čoveka su veoma bitni jer je potrebno razviti biomaterijal koji neće pokazati citotoksičnost na okolnom tkivu.

Preživljavanje PBMC i PBMC+PHA ćelija, izračunato pomoću jednačine (9), prikazano je na slici 5.21 i Tabeli 5.5.



Slika 5.21. Preživljavanje, *S*, PBMC nestimuliranih i PBMC stimuliranih na proliferaciju fitohemaglutininom (PBMC+PHA) u prisustvu PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova dobijenih iz disperzija sa 3,9 mM AgNO₃.

Prema literaturi citotoksičnost uzoraka (PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filma) određena na osnovu preživljavanja ćelija u odnosu na kontrolni uzorak (uzorak bez polimernog filma) se može klasifikovati kao: netoksičan, ukoliko je preživljavanje ćelija veće od 90 %, blago toksičan, ukoliko je preživljavanje ćelija od 60 % do 90 %, toksičan, ukoliko je preživljavanje ćelija manje od 60 %.

umereno toksičan, ukoliko je preživljavanje ćelija od 30 % do 59 % i znatno toksičan ukoliko je preživljavanje ćelija manje od 30 % [206].

Rezultati MTT testa (Tabela 5.5) pokazuju u slučaju PVA filma preživljavanje PBMC i PBMC+PHA ćelija od $98,55 \pm 19,91$ % i $91,27 \pm 3,26$ %, redom, što ga svrstava u red netoksičnih biomaterijala. PVA/Gr film pokazuje preživljavanje PBMC i PBMC+PHA ćelija od $84,87 \pm 4,45$ % i $88,60 \pm 2,72$ %, redom, što ga svrstava u red blago toksičnih biomaterijala. Preživljavanje PBMC i PBMC+PHA ćelija u slučaju Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova je ispod 30 %, što ih svrstava u red znatno toksičnih biomaterijala.

Tabela 5.5. Preživljavanje PBMC ćelija u prisustvu PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr (dobijenih iz disperzija sa 3,9 mM AgNO₃) filmova

Tip ćelije	Humane monoklearne ćelije periferne krvi (PBMC)			
Materijal	PVA	PVA/Gr	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr
Preživljavanje ćelije (S), %	$98,55 \pm 19,91$	$84,87 \pm 4,45$	$3,04 \pm 1,46$	$0,82 \pm 0,21$
Klasifikacija [206]	netoksičan	blago toksičan	znatno toksičan	znatno toksičan
Tip ćelije	PHA-stimulisane humane mononuklearne ćelije periferne krvi (PBMC+PHA)			
Materijal	PVA	PVA/Gr	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr
Preživljavanje ćelije (S), %	$91,27 \pm 3,26$	$88,60 \pm 2,72$	$1,58 \pm 1,08$	$0,96 \pm 0,87$
Klasifikacija [206]	netoksičan	blago toksičan	znatno toksičan	znatno toksičan

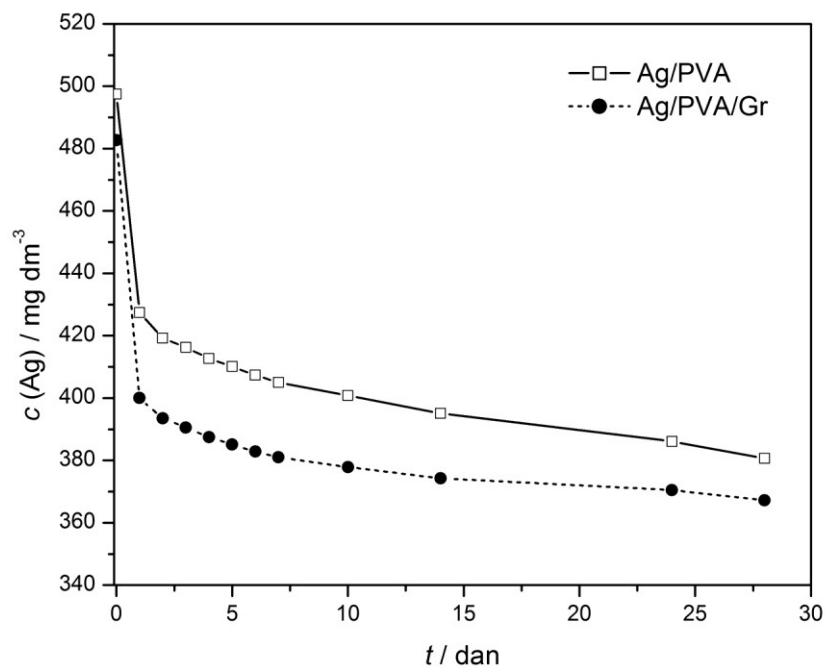
5.3. NANOKOMPOZITNI HIDROGELOVI

PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr hidrogelovi dobijeni su izlivanjem rastvora, odnosno odgovarajućih koloidnih disperzija, sastava: 10 mas. % PVA, 0,01 mas. % Gr i 1 mM AgNO₃ (u cilju smanjenja citotoksičnosti smanjena je koncentracija rastvora AgNO₃ u odnosu na prethodni koncentracije 3,9 mM) i pri istim parametrima sinteze: $j = 40 \text{ mA cm}^{-2}$, $t = 30 \text{ min}$. Izlivene koloidne disperzije u Petri šoljama podvrgnute su ciklusima zamrzavanja i odmrzavanja. Ukupno je izvedeno pet sukcesivnih ciklusa. Ciklus se sastojao od zamrzavanja 16 h na -18° C i odmrzavanja 8 h na 4° C. U slučaju Ag/PVA i Ag/PVA/Gr, najpre su koloidne disperzije nakon sinteze 8 dana stajali na sobnoj temperaturi zaštićeni od svetlosti u cilju stabilizacije nanočestica.

5.3.1. OTPUŠTANJE SREBRA

Kinetika otpuštanja srebra iz Ag/PVA i Ag/PVA/Gr nanokompozitnih hidrogelova u fosfatnom puferu (*eng.* PB) na 37 °C prikazana je na slici 5.22.

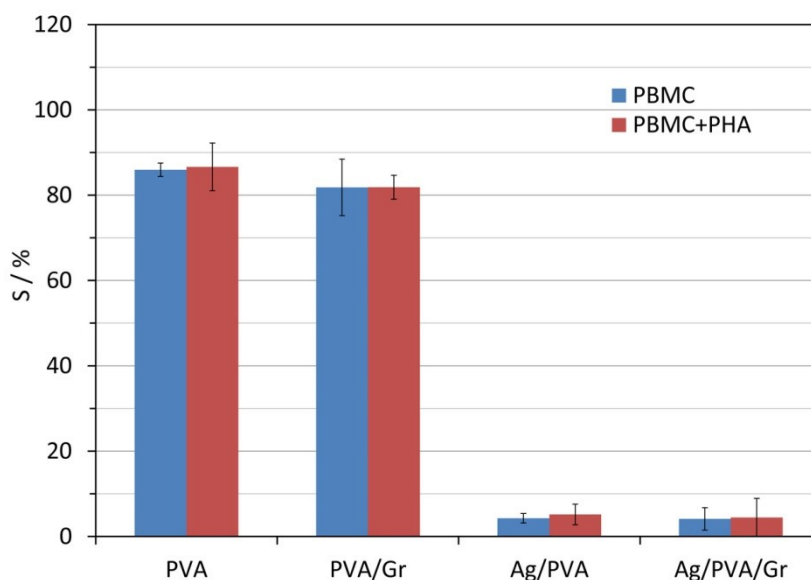
Koncentracija srebra u Ag/PVA i Ag/PVA/Gr hidrogelovima na početku naglo opada sa vremenom i 3 dana nakon otpuštanja 16 mas % i 19 mas %, redom, početne koncentracije srebra dostiže se plato koji narednih dana pokazuje značajano manju brzinu otpuštanja srebra. Takođe, može se zapaziti da su nakon 28 dana, oba Ag/PVA i Ag/PVA/Gr hidrogela zadržala ~75 % početne koncentracije srebra što je posledica stabilnosti nanočestica srebra u visokoumreženom PVA hidrogelu. Ovo zapažanje je veoma bitno jer zaostala količina srebra može da sačuva sterilnost hidrogela tokom vremena.



Slika 5.22. Vremenska zavisnost koncentracije srebra u Ag/PVA i Ag/PVA/Gr hidrogelovima tokom otpuštanja srebra u fosfatnom puferu na 37 °C (podaci predstavljaju srednju vrednost tri merenja).

5.3.2. MTT TEST CITOTOKSIČNOSTI

Citotoksičnost PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr hidrogelova dobijenih iz disperzija sa 1 mM AgNO₃ je određena MTT testom sa zdravim mononuklearnim ćelijama periferne krvi (PBMC) i PBMC ćelijama stimulisanih na proliferaciju fitohemaglutininom (*eng.* PHA). Preživljavanje PBMC i PBMC+PHA ćelija, izračunato pomoću jednačine (9), prikazano je na slici 5.23 i Tabeli 5.6.



Slika 5.23. Preživljavanje, *S*, PBMC nestimuliranih i PBMC stimuliranih na proliferaciju fitohemaglutininom (PBMC+PHA) u prisustvu PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr (dobijenih iz disperzija sa 1 mM AgNO₃) hidrogelova.

Već pomenuto u poglavlju 5.2.7, prema literaturi uzorak kome je određena citotoksičnost na osnovu preživljavanja ćelija u odnosu na kontrolni uzorak, može se klasifikovati kao: netoksičan, ukoliko je preživljavanje ćelija veće od 90 %, blago toksičan, ukoliko je preživljavanje ćelija od 60 % do 90 %, umereno toksičan, ukoliko je preživljavanje ćelija od 30 % do 59 % i znatno toksičan, ukoliko je preživljavanje ćelija manje od 30 % [206].

Rezultati MTT testa (Tabela 5.6) pokazuju u slučaju PVA hidrogela preživljavanje PBMC i PBMC+PHA ćelija od $85,94 \pm 1,57$ % i $86,64 \pm 5,59$ %, redom, što ga svrstava u red blago toksičnih biomaterijala. PVA/Gr film pokazuje preživljavanje PBMC i PBMC+PHA ćelija od $81,83 \pm 6,62$ % i $81,86 \pm 2,79$, redom, što ga svrstava u red blago toksičnih biomaterijala. Preživljavanje PBMC i PBMC+PHA ćelija u slučaju Ag/PVA i Ag/PVA/Gr hidrogelova je ispod 30 %, što ih svrstava u red znatno toksičnih biomaterijala.

Tabela 5.6. Preživljavanje PBMC ćelija u prisustvu PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr (dobijenih iz disperzija sa 1 mM AgNO₃) hidrogelova

Tip ćelije	Humane monuklearne ćelije periferne krvi (PBMC)			
Materijal	PVA	PVA/Gr	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr
Preživljavanje ćelije (S), %	$85,94 \pm 1,57$	$81,83 \pm 6,62$	$4,26 \pm 1,10$	$4,12 \pm 2,63$
Klasifikacija [206]	blago toksičan	blago toksičan	znatno toksičan	znatno toksičan
Tip ćelije	PHA-stimulisane humane mononuklearne ćelije periferne krvi (PBMC+PHA)			
Materijal	PVA	PVA/Gr	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr
Preživljavanje ćelije (S), %	$86,64 \pm 5,59$	$81,86 \pm 2,79$	$5,14 \pm 2,41$	$4,43 \pm 4,49$
Klasifikacija [206]	blago toksičan	blago toksičan	znatno toksičan	znatno toksičan

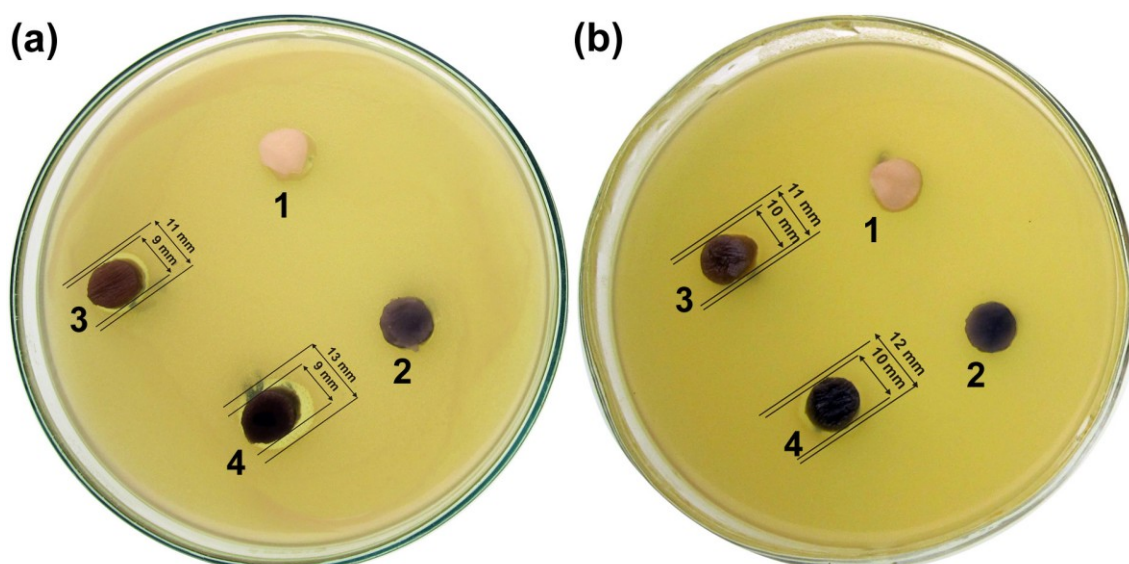
Na osnovu rezultata citotoksičnosti Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova (Tabela 5.5) dobijenih iz koloidnih disperzija koje su sadržale 3,9 mM AgNO₃ i rezultata citotoksičnosti Ag/PVA i Ag/PVA/Gr hidrogelova (Tabela 5.6) dobijenih iz koloidnih disperzija koje su sadržale 1 mM AgNO₃, može se zaključiti da je citotoksičnost hidrogelova manja 3-4 puta u odnosu na filmove. Ipak, filmovi, kao i hidrogelovi koji sadrže srebro sintetisani u ovom radu prema literaturi klasifikuju se kao znatno citotoksični [206–208].

Istraživanja Ag/PVA i Ag/PVA/Gr hidrogelova dobijenih bubrenjem u rastvoru AgNO₃ različitih koncentracija (0,25, 0,5, 1,0 i 3.9 mM) i naknadnom sintezom nanočestica [126], pokazuju blagu citotoksičnost u slučaju Ag/PVA i Ag/PVA/Gr

hidrogelova dobijenih bubrenjem u 0,25 mM rastvoru AgNO_3 , dok u ostalim slučajevima uzorci pokazuju veću citotoksičnost.

5.3.3. ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST

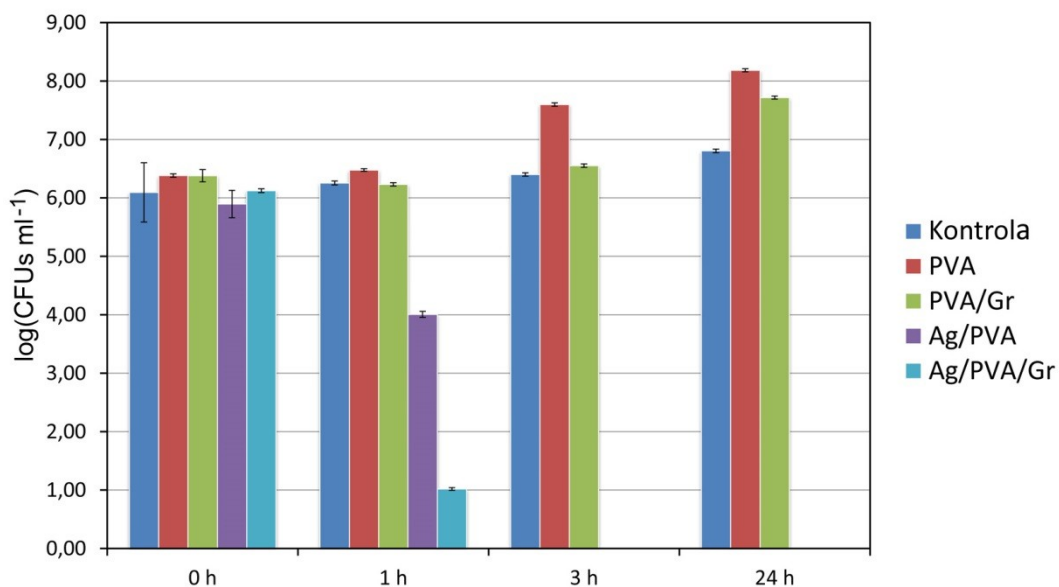
Kvalitativni antibakterijski agar difuzijski test urađen je za PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr hidrogelove (slika 5.24) na dve vrste bakterija (*Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*). Uzorci hidrogelova u obliku diska prečnika 9 mm testirani su prema *S. aureus* TL. Zone inhibicije nisu uočene za PVA i PVA/Gr hidrogelove, dok je za Ag/PVA prečnik zone inhibicije oko diska hidrogela iznosio 11 mm, a za Ag/PVA/Gr je bio nešto širi i iznosio je 13 mm. U slučaju *E. coli* ATCC 25922 testirani su uzorci prečnika 10 mm. Prečnik zona inhibicije je manje izražen, i iznosio je za Ag/PVA 11 mm, a za Ag/PVA/Gr je nešto širi 12 mm.



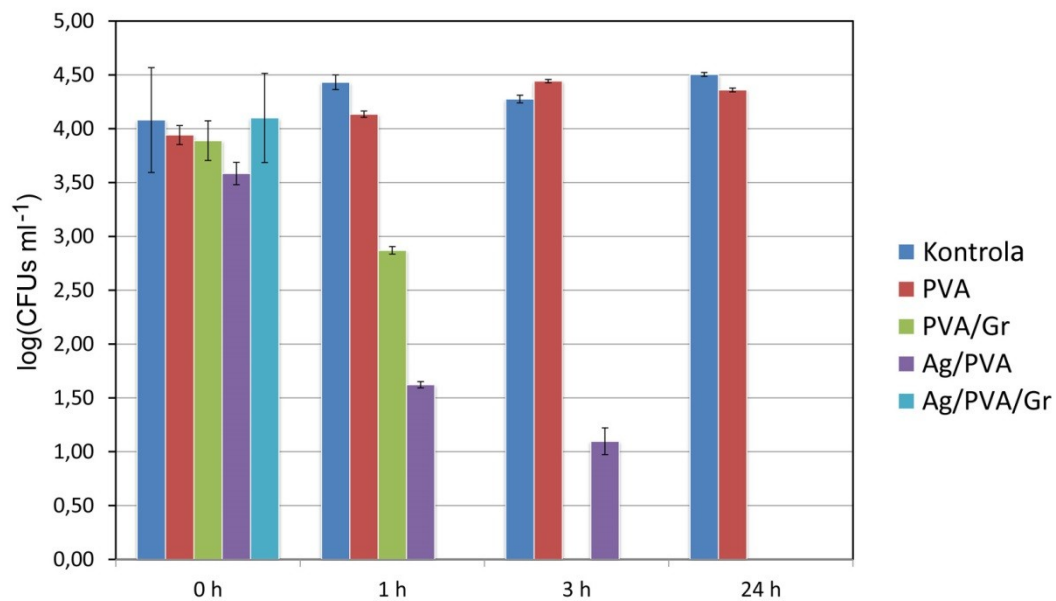
Slika 5.24. Antibakterijska aktivnost PVA (1), PVA/Gr (2), Ag/PVA (3) i Ag/PVA/Gr (4) hidrogelova prema (a) *S. aureus* TL i (b) *E. coli* ATCC 25922 ispitivana agar-difuzionom metodom.

Kinetika antibakterijske aktivnosti ispitana je i kvantitativno praćenjem ukupnog broja preživelih bakterijskih ćelija u suspenziji. Kontrolni uzorak je bakterijska suspenzija. Slika 5.25 prikazuje kinetiku antibakterijske aktivnosti u fosfatnom puferu PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr hidrogelova prema dve vrste bakterija *Escherichia coli* ATCC 25922 (slika 5.25a) i *Staphylococcus aureus* TL (slika 5.25b).

(a)



(b)



Slika 5.25. Promena ukupnog broja bakterijskih ćelija nakon kontakta sa PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr hidrogelovima u poređenju sa kontrolom a) za *E. coli* ATCC 25922 i b) *S. aureus* TL, u fosfatnom puferu posle 0, 1, 3 i 24 h.

Sa slike 5.25 uočava se da PVA hidrogel ne pokazuje antibakterijska svojstva prema obe vrste bakterije koje su korišćene za ispitivanje. Međutim, PVA/Gr hidrogel prema *E.coli* (slika 5.25a) ne pokazuje antibakterijsku aktivnost dok u slučaju *S. aureus* (slika 5.25b) se uočava pad ukupnog broja ćelija bakterija za 1 logaritamsku jedinicu već nakon 1 h inkubacije, dok se nakon 3 h i 24 h postiže baktericidni efekat što pokazuje da grafen poseduje antibakterijska svojstva.

Takođe, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr hidrogelovi u slučaju *E. coli* (slika 5.25a), nakon 1 h inkubacije znatno redukuju ukupan broj ćelija bakterija, za 2 i 4 logaritamske jedinice, redom. Nakon 3 h i 24 h uočen je baktericidni efekat. Ispitivanjem antibakterijske aktivnosti istih hidrogelova prema *S. aureus* (slika 5.25b), primećeno je da već nakon 1 h ukupan broj preživelih ćelija bakterija redukovan kod uzorka Ag/PVA (dve logaritamske jedinice), dok je Ag/PVA/Gr hidrogel pokazao baktericidni efekat. Kod oba uzorka hidrogela, nakon 3 h i 24 h nisu pronađene žive ćelije bakterija *S. aureus*. Veća antibakterijska aktivnost Ag/PVA/Gr, u odnosu na Ag/PVA, hidrogel može biti posledica manjih dimenzija nanonečestica srebra i prisustva grafena u hidrogelu.

6. ZAKLJUČCI

- Nanočestice srebra uspešno su sintetisane elektrohemijском metodom pri galvanostatskim uslovima u rastvoru polivinil-alkohola, kao i koloidnoj disperziji polivinil-alkohol/grafen.
- Rezultati UV-Vis spektroskopije, TEM analize i ciklične voltametrije pokazuju da su sintetisane nanočestice srebra sfernog oblika prečnika 10-40 nm i da je veći prinos nanočestica srebra iz 10 mas. % PVA rastvora u odnosu na 5 mas. % PVA. Utvrđeni su optimalni parametri sinteze za dobijanje nanočestica srebra u 10 mas. % PVA rastvoru pri gustini struje od 40 mA cm^{-2} i vremenu sinteze od 30 min. Manje dimenzije i manja agregacija nanočestica srebra potvrđene su kod Ag/PVA/Gr koloidne disperzije u odnosu na Ag/PVA koloidnu disperziju, što se može pripisati listovima grafena smeštenim između polimernih lanaca koji sprečavaju dalji rast, agregaciju ili aglomeraciju nanočestica srebra.
- Analiza PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova dobijenih izlivanjem koloidnih disperzija u tankom sloju i sušenjem na temperaturi od $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ izvršena je metodom difrakcije X-zraka, infracrvenom spektroskopijom sa furijeovom transformacijom, Ramanskom spektroskopijom, skenirajućom elektronskom mikroskopijom i fotoelektronskom spektroskopijom X-zracima. Potvrđeno je prisustvo srebra u kristalnom obliku, polukristalni oblik PVA, kao i da nanočestica srebra i listova grafena ne narušavaju polukristalnu strukturu PVA. Takođe je potvrđeno je postojanje interakcije između PVA polimernih lanaca i nanočestica srebra u slučaju Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova, kao i interakcija listova grafena smeštenih između polimernih lanaca kod PVA/Gr i Ag/PVA/Gr filmova.
- Test istezanja za određivanje mehaničkih svojstava filmova i termogravimetrijska analiza za određivanje termičke stabilnosti filmova pokazali su da nanokompozitni PVA filmovi dodatkom grafena i nanočestica srebra u polimernoj matrici PVA poboljšavaju mehanička i termička svojstva

ostvarivanjem veza sa hidroksilnim grupama PVA molekula. Test istezanja pokazuje da je zatezna čvrstoća za PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmove veća za 56 %, 6,3 % i 23,8 %, redom, u odnosu na PVA film. Pokazana je veća termička stabilnost PVA/Gr u odnosu na PVA film. Takođe, poređenjem Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmova pokazana je veća termička stabilnost Ag/PVA/Gr filma u odnosu na Ag/PVA film kao i manji gubitak mase na 450 °C Ag/PVA/Gr (77,26 mas. %) u odnosu na Ag/PVA film (80,21 mas. %).

- Hidrogelovi PVA, PVA/Gr, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr dobijeni metodom uzastopnog zamrzavanja i odmrzavanja odgovarajućih koloidnih disperzija karakterisani su atomskom apsorpcionom spektroskopijom, MTT testom citotoksičnosti, agar difuzionim testom i testom u bakterijskoj suspenziji. Kinetika otpuštanja srebra iz Ag/PVA i Ag/PVA/Gr nanokompozitnih hidrogelova u fosfatnom puferu na 37 °C pokazala je naglo otpuštanje srebra tokom prvih 3 dana, tj. 16 mas % kod Ag/PVA i 19 mas % srebra kod Ag/PVA/Gr hidrogela i kasnije postepeno otpuštanje, gde su nakon 28 dana oba Ag/PVA i Ag/PVA/Gr hidrogela zadržala ~75 % početne koncentracije srebra što je posledica stabilnosti nanočestica srebra u visokoumreženom PVA hidrogelu. To ukazuje da zaostala količina srebra može da sačuva sterilnost uzorka tokom vremena.
- Dokazana su antibakterijska svojstva Ag/PVA i Ag/PVA/Gr hidrogelova prema sojevima *E. coli* ATCC 25922 i *S. aureus* TL, kao i za PVA/Gr hidrogel prema soju *E. coli* ATCC 25922. MTT test citotoksičnosti je pokazao da PVA film netoksičan, dok su PVA hidrogel i PVA/Gr film i hidrogel blago toksični. Ag/PVA i Ag/PVA/Gr filmovi dobijeni iz disperzija sa 3,9 mM AgNO₃, kao i Ag/PVA i Ag/PVA/Gr hidrogelovi dobijeni iz disperzija sa 1 mM AgNO₃, pokazuju znatnu citotoksičnost zbog čega je potrebno za potencijalnu primenu u biomedicinske i farmaceutske svrhe koristiti manje koncentracije AgNO₃ prilikom sinteze.

LITERATURA

- [1] G. Binyamin, B.M. Shafi, C.M. Mery, *Semin. Pediatr. Surg.* **15** (2006) 276–283.
- [2] G. Kaur, O.P. Pandey, K. Singh, D. Homa, B. Scott, G. Pickrell, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* **102** (2014) 254–274.
- [3] S.R. Paital, N.B. Dahotre, *Mater. Sci. Eng. R Reports.* **66** (2009) 1–70.
- [4] L.T. Kuhn, *Introd. to Biomed. Eng.* (2005) 255–312.
- [5] R. Freitag, *Synthetic Polymers for Biotechnology and Medicine (Biotechnology Intelligence Unit 4)*, Hardcover, CRC Press, 2002.
- [6] A. Mahapatro, *Mater. Sci. Eng. C.* **55** (2015) 227–251.
- [7] M. Vallet-Regí, *Comptes Rendus Chim.* **13** (2010) 174–185.
- [8] Q. Chen, S. Liang, G.A. Thouas, *Prog. Polym. Sci.* **38** (2013) 584–671.
- [9] M. Vert, *Prog. Polym. Sci.* **32** (2007) 755–761.
- [10] A. Sinha, A. Guha, *Mater. Sci. Eng. C.* **29** (2009) 1330–1333.
- [11] D.F. Williams, *Sadhana.* **28** (2003) 563–574.
- [12] I. Gibas, H. Janik, *Chem. Chem. Technol.* **4** (2010) 297–304.
- [13] Q.V. Nguyen, D.P. Huynh, J.H. Park, D.S. Lee, *Eur. Polym. J.* **72** (2015) 602–619.
- [14] N. Angelova, D. Hunkeler, *Trends Biotechnol.* **17** (1999) 409–421.
- [15] O. Pillai, R. Panchagnula, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5** (2001) 447–451.
- [16] S.J. Buwalda, K.W.M. Boere, P.J. Dijkstra, J. Feijen, T. Vermonden, W.E. Hennink, *J. Control. Release.* **190** (2014) 254–273.
- [17] J.L. Drury, D.J. Mooney, *Biomaterials.* **24** (2003) 4337–4351.
- [18] S. Ramakrishna, J. Mayer, E. Wintermantel, K.W. Leong, *Compos. Sci. Technol.* **61** (2001) 1189–1224.
- [19] W. He, R. Benson, *Polymeric Biomaterials*, 2nd ed., Elsevier, 2011.
- [20] A. Abou-Okeil, A.M. Sheta, A. Amr, M.A. Ali, *Carbohydr. Polym.* **90** (2012) 658–666.
- [21] G.S. Sailaja, K. Sreenivasan, Y. Yokogawa, T. V. Kumary, H.K. Varma, *Acta*

- Biomater.* **5** (2009) 1647–1655.
- [22] J. Shen, D.J. Burgess, *Int. J. Pharm.* **422** (2012) 341–348.
- [23] R. Bryaskova, D. Pencheva, G.M. Kale, U. Lad, T. Kantardjiev, *J. Colloid Interface Sci.* **349** (2010) 77–85.
- [24] A. Panacek, L. Kvítek, R. Prucek, M. Kolar, R. Vecerova, N. Pizúrova, V.K. Sharma, T. Nevecna, R. Zboril, *J. Phys. Chem. B.* **110** (2006) 16248–16253.
- [25] N. Cioffi, L. Torsi, N. Ditaranto, G. Tantillo, L. Ghibelli, L. Sabbatini, T. Bleve-Zacheo, M. D'Alessio, P.G. Zambonin, E. Traversa, *Chem. Mater.* **17** (2005) 5255–5262.
- [26] M. Raffi, S. Mehrwan, T.M. Bhatti, J.I. Akhter, A. Hameed, W. Yawar, M.M. Ul Hasan, *Ann. Microbiol.* **60** (2010) 75–80.
- [27] D. Pencheva, R. Bryaskova, T. Kantardjiev, *Mater. Sci. Eng. C.* **32** (2012) 2048–2051.
- [28] R. Bryaskova, N. Georgieva, T. Andreeva, R. Tzoneva, *Surf. Coatings Technol.* **235** (2013) 186–191.
- [29] J.S. Gonzalez, A.S. Maiolo, C.E. Hoppe, V.A. Alvarez, *Procedia Mater. Sci.* **1** (2012) 483–490.
- [30] C. Cencetti, D. Bellini, A. Pavesio, D. Senigaglia, C. Passariello, A. Virga, P. Matricardi, *Carbohydr. Polym.* **90** (2012) 1362–1370.
- [31] Z. Tang, Y. Lei, B. Guo, L. Zhang, D. Jia, *Polymer (Guildf).* **53** (2012) 673–680.
- [32] T. Zhou, F. Chen, C. Tang, H. Bai, Q. Zhang, H. Deng, Q. Fu, *Compos. Sci. Technol.* **71** (2011) 1266–1270.
- [33] V. Chabot, D. Higgins, A. Yu, X. Xiao, Z. Chen, J. Zhang, *Energy Environ. Sci.* **7** (2014) 1564.
- [34] X. Zhao, Q. Zhang, D. Chen, P. Lu, *Macromolecules.* **43** (2010) 2357–2363.
- [35] C. Bao, Y. Guo, L. Song, Y. Hu, *J. Mater. Chem.* **21** (2011) 13942.
- [36] D. Bitounis, H. Ali-Boucetta, B.H. Hong, D.H. Min, K. Kostarelos, *Adv. Mater.* **25** (2013) 2258–2268.
- [37] A. Janković, S. Eraković, M. Mitrić, I.Z. Matić, Z.D. Juranić, G.C.P. Tsui, C.Y. Tang, V. Mišković-Stanković, K.Y. Rhee, S.J. Park, *J. Alloys Compd.* **624** (2015) 148–157.
- [38] B. Lu, T. Li, H. Zhao, X. Li, C. Gao, S. Zhang, E. Xie, *Nanoscale.* **4** (2012)

- 2978–2982.
- [39] H. Ji, H. Sun, X. Qu, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **105** (2016) 176–189.
- [40] A. Janković, S. Eraković, M. Vukašinović-Sekulić, V. Mišković-Stanković, S.J. Park, K.Y. Rhee, *Prog. Org. Coatings.* **83** (2015) 1–10.
- [41] S. Samavedi, L.K. Poindexter, M. Van Dyke, A.S. Goldstein, *Synthetic Biomaterials for Regenerative Medicine Applications*, Academic Press, 2013.
- [42] D.M. Faulk, S.F. Badylak, *Natural Biomaterials for Regenerative Medicine Applications*, Academic Press, 2013.
- [43] A. Sionkowska, *Prog. Polym. Sci.* **36** (2011) 1254–1276.
- [44] P.A. Gunatillake, R. Adhikari, *Biosynthetic Polymers for Medical Applications*, Woodhead Publishing is an imprint of Elsevier, 2016.
- [45] M.C. Hacker, A.G. Mikos, *Synthetic Polymers*, Second Edi, Elsevier Inc., 2011.
- [46] L. Puppulin, S. Della Negra, N. Sugano, O. Sbaizero, G. Pezzotti, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **53** (2016) 414–426.
- [47] S.M. Kurtz, O.K. Muratoglu, M. Evans, A.A. Edidin, *Biomaterials.* **20** (1999) 1659–1688.
- [48] P.L. Nayak, *J. Macromol. Sci. Part C Polym. Rev.* **39** (1999) 481–505.
- [49] W. Amass, a Amass, B. Tighe, *Polym. Int.* **47** (1998) 89–144.
- [50] S.S. Ray, M. Bousmina, *Prog. Mater. Sci.* **50** (2005) 962–1079.
- [51] L. Avérous, E. Pollet, *Environmental Silicate Nano-Biocomposites Green Energy and Technology*, illustrate, Springer Science & Business Media, 2012.
- [52] Y. Ikada, H. Tsuji, *Macromol. Rapid Commun.* **21** (2000) 117–132.
- [53] C.M. Hassan, N.A. Peppas, *Adv. Polym. Sci.* **153** (2000) 37–65.
- [54] O. Olabisi, K. Adewale, eds., *Handbook Of Thermoplastics*, 2nd ed., CRC Press, 2016.
- [55] M. Lewin, *Handbook of Fiber Chemistry*, 3rd ed., CRC Press, 2006.
- [56] S. Muppalaneni, H. Omidian, *J. Dev. Drugs.* **2** (2013) 1–5.
- [57] X. Tang, S. Alavi, *Carbohydr. Polym.* **85** (2011) 7–16.
- [58] C.C. DeMerlis, D.R. Schoneker, *Food Chem. Toxicol.* **41** (2003) 316–326.
- [59] J. Chen, Y. Zhang, G.C. Du, Z.Z. Hua, Y. Zhu, *Enzyme Microb. Technol.* **40** (2007) 1686–1691.
- [60] E. Chiellini, A. Corti, R. Solaro, *Polym. Degrad. Stab.* **64** (1999) 305–312.

- [61] J. Pajak, M. Ziemski, N. Bozena, *Chemik.* **64** (2010) 523–530.
- [62] R. Solaro, A. Corti, E. Chiellini, *Polym. Adv. Technol.* **11** (2000) 873–878.
- [63] E. Chiellini, A. Corti, S. D’Antone, R. Solaro, *Prog. Polym. Sci.* **28** (2003) 963–1014.
- [64] P.A. Williams, ed., *Handbook of Industrial Water Soluble Polymers*, illustrate, Blackwell Publishing, 2007.
- [65] N. Georgieva, R. Bryaskova, R. Tzoneva, *Mater. Lett.* **88** (2012) 19–22.
- [66] E.S. Costa-Júnior, E.F. Barbosa-Stancioli, A.A.P. Mansur, W.L. Vasconcelos, H.S. Mansur, *Carbohydr. Polym.* **76** (2009) 472–481.
- [67] J. Jose, M.A. Al-Harhi, M.A.A. AlMa’adeed, J.B. Dakua, S.K. De, *J. Appl. Polym. Sci.* **132** (2015) 1–8.
- [68] H.S. Mansur, C.M. Sadahira, A.N. Souza, A.A.P. Mansur, *Mater. Sci. Eng. C.* **28** (2008) 539–548.
- [69] B. Singh, L. Pal, *Int. J. Biol. Macromol.* **48** (2011) 501–510.
- [70] J.S. Gonzalez, V.A. Alvarez, *Thermochim. Acta.* **521** (2011) 184–190.
- [71] S. Jiang, S. Liu, W. Feng, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **4** (2011) 1228–1233.
- [72] D. Zhang, K. Chen, L. Wu, D. Wang, S. Ge, *J. Bionic Eng.* **9** (2012) 234–242.
- [73] M. Ru-yin, X. Dang-sheng, *J. China Univ. Min. Technol.* **18** (2008) 271–274.
- [74] V.I. Lozinsky, I.Y. Galaev, F.M. Plieva, I.N. Savina, H. Jungvid, B. Mattiasson, *Trends Biotechnol.* **21** (2003) 445–451.
- [75] M.H. Alves, B.E.B. Jensen, A.A.A. Smith, A.N. Zelikin, *Macromol. Biosci.* **11** (2011) 1293–1313.
- [76] V.M. Gun, I.N. Savina, S. V Mikhalovsky, *Adv. Colloid Interface Sci.* **187–188** (2013) 1–46.
- [77] G. Ertürk, B. Mattiasson, *J. Chromatogr. A.* **1357** (2014) 24–35.
- [78] V.I. Lozinsky, F.M. Plieva, *Enzyme Microb. Technol.* **23** (1998) 227–242.
- [79] M. Bercea, S. Morariu, D. Rusu, *Soft Matter.* **9** (2013) 1244–1253.
- [80] T. Hatakeyema, J. Uno, C. Yamada, A. Kishi, H. Hatakeyama, *Thermochim. Acta.* **431** (2005) 144–148.
- [81] N.A. Peppas, S.R. Stauffer, *J. Control. Release.* **16** (1991) 305–310.
- [82] S.R. Stauffer, N.A. Peppas, *Polymer (Guildf).* **33** (1992) 3932–3936.
- [83] Y. Huang, M. Zhang, W. Ruan, *J. Mater. Chem. A.* **2** (2014) 10508–10515.

- [84] J. Wang, X. Wang, C. Xu, M. Zhang, X. Shang, *Polym. Int.* **60** (2011) 816–822.
- [85] M. Qi, Y. Gu, N. Sakata, D. Kim, Y. Shirouzu, C. Yamamoto, A. Hiura, S. Sumi, K. Inoue, *Biomaterials*. **25** (2004) 5885–5892.
- [86] J.L. Holloway, A.M. Lowman, G.R. Palmese, *Acta Biomater.* **6** (2010) 4716–4724.
- [87] D. Zhang, J. Duan, D. Wang, S. Ge, *J. Bionic Eng.* **7** (2010) 235–243.
- [88] A.S. Maiolo, M.N. Amado, J.S. Gonzalez, V.A. Alvarez, *Mater. Sci. Eng. C.* **32** (2012) 1490–1495.
- [89] Y. Huang, Y. Zheng, W. Song, Y. Ma, J. Wu, L. Fan, *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* **42** (2011) 1398–1405.
- [90] A. Joshi, G. Fussell, J. Thomas, A. Hsuan, A. Lowman, A. Karduna, E. Vresilovic, M. Marcolongo, *Biomaterials*. **27** (2006) 176–184.
- [91] D.A. Bichara, X. Zhao, N.S. Hwang, H. Bodugoz-Senturk, M.J. Yaremchuk, M.A. Randolph, O.K. Muratoglu, *J. Surg. Res.* **163** (2010) 331–336.
- [92] G. Yoshimatsu, N. Sakata, H. Tsuchiya, M. Ishida, F. Motoi, S. Egawa, S. Sumi, M. Goto, M. Unno, *Transplant. Proc.* **45** (2013) 1875–1880.
- [93] T.-H. Young, W.-Y. Chuang, M.-Y. Hsieh, L.-W. Chen, J.-P. Hsu, *Biomaterials*. **23** (2002) 3495–3501.
- [94] L.C. Winterton, J.M. Lally, K.B. Sentell, L.L. Chapoy, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **80** (2007) 424–432.
- [95] Y. Wang, Y.L. Hsieh, *J. Memb. Sci.* **309** (2008) 73–81.
- [96] N.A.M. Zain, M.S. Suhaimi, A. Idris, *Biochem. Eng. J.* **50** (2010) 83–89.
- [97] R. Dalla-Vecchia, D. Sebrão, M. da G. Nascimento, V. Soldi, *Process Biochem.* **40** (2005) 2677–2682.
- [98] X. Yang, K. Yang, S. Wu, X. Chen, F. Yu, J. Li, M. Ma, Z. Zhu, *Radiat. Phys. Chem.* **79** (2010) 606–611.
- [99] J.H. Sung, M.R. Hwang, J.O. Kim, J.H. Lee, Y. Il Kim, J.H. Kim, S.W. Chang, S.G. Jin, J.A. Kim, W.S. Lyoo, S.S. Han, S.K. Ku, C.S. Yong, H.G. Choi, *Int. J. Pharm.* **392** (2010) 232–240.
- [100] T.M. Don, C.F. King, W.Y. Chiu, C.A. Peng, *Carbohydr. Polym.* **63** (2006) 331–339.
- [101] M. Zhai, F. Yoshii, T. Kume, K. Hashim, *Carbohydr. Polym.* **50** (2002) 295–303.

- [102] E.A. Kamoun, X. Chen, M.S. Mohy Eldin, E.R.S. Kenawy, *Arab. J. Chem.* **8** (2015) 1–14.
- [103] E.A. Kamoun, E.-R.S. Kenawy, X. Chen, *J. Adv. Res.* **8** (2017) 217–233.
- [104] T. Bhunia, L. Goswami, D. Chattopadhyay, A. Bandyopadhyay, *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms.* **269** (2011) 1822–1828.
- [105] M. Kokabi, M. Sirousazar, Z.M. Hassan, *Eur. Polym. J.* **43** (2007) 773–781.
- [106] L. Fan, H. Yang, J. Yang, M. Peng, J. Hu, *Carbohydr. Polym.* **146** (2016) 427–434.
- [107] M.H. Huang, M.C. Yang, *Int. J. Pharm.* **346** (2008) 38–46.
- [108] L. Xie, M. Jiang, X. Dong, X. Bai, J. Tong, J. Zhou, *J. Appl. Polym. Sci.* **124** (2012) 823–831.
- [109] K. Tarun, N. Gobi, *Indian J. Fibre Text. Res.* **37** (2012) 127–132.
- [110] M.T. Razzak, D. Darwis, Zainuddin, Sukirno, *Radiat. Phys. Chem.* **62** (2001) 107–113.
- [111] M. Teodorescu, S. Morariu, M. Bercea, L. Sacarescu, *RSC Adv.* **6** (2016) 39718–39727.
- [112] N. Himly, D. Darwis, L. Hardiningsih, *Radiat. Phys. Chem.* **42** (1993) 911–914.
- [113] C. Lutz, J.A. Steevens, eds., *Nanomaterials: Risks and Benefits*, Springer Science & Business Media, 2008.
- [114] C.-J. Zhong, J. Luo, B. Fang, B.N. Wanjala, P.N. Njoki, R. Loukrakpam, J. Yin, *Nanotechnology.* **21** (2010) 62001.
- [115] N. Gokarneshan, P.P. Gopalakrishnan, B. Jeyanthi, *ISRN Nanomater.* **2012** (2012) 1–8.
- [116] T. Pradeep, Anshup, *Thin Solid Films.* **517** (2009) 6441–6478.
- [117] L. Ge, Q. Li, M. Wang, J. Ouyang, X. Li, M.M.Q. Xing, *Int. J. Nanomedicine.* **9** (2014) 2399–2407.
- [118] S. León-Silva, F. Fernández-Luqueño, F. López-Valdez, *Water, Air, Soil Pollut.* **227** (2016) 306.
- [119] Y. a Krutyakov, a a Kudrinskiy, a Y. Olenin, G. V Lisichkin, *Russ. Chem. Rev.* **77** (2008) 233–257.
- [120] J. Biswal, N. Misra, L.C. Borde, S. Sabharwal, *Radiat. Phys. Chem.* **83** (2013)

67–73.

- [121] A.-T. Le, P.T. Huy, T.Q. Huy, P.D. Cam, a. a. Kudrinskiy, a. Y. Olenin, G. V. Lisichkin, Y. a. Krutyakov, *Nanotechnologies Russ.* **5** (2010) 554–563.
- [122] J.J. Zhu, X.H. Liao, X.N. Zhao, H.Y. Chen, *Mater. Lett.* **49** (2001) 91–95.
- [123] G.R. Nasretdinova, R.R. Fazleeva, R.K. Mukhitova, I.R. Nizameev, M.K. Kadirov, A.Y. Ziganshina, V. V. Yanilkin, *Russ. J. Electrochem.* **51** (2015) 1029–1040.
- [124] Ž. Jovanović, J. Stojkowska, B. Obradović, V. Miskovic-Stankovic, *Mater. Chem. Phys.* **133** (2012) 182–189.
- [125] Ž. Jovanović, A. Radosavljević, J. Stojkowska, B. Nikolić, B. Obradovic, Z. Kačarević-Popović, V. Mišković-Stanković, *Polym. Compos.* **35** (2014) 217–226.
- [126] M.M. Abudabbus, I. Jevremović, A. Janković, A. Perić-Grujić, I. Matić, M. Vukašinović-Sekulić, D. Hui, K.Y. Rhee, V. Mišković-Stanković, *Compos. Part B Eng.* **104** (2016) 26–34.
- [127] R.A. Khaydarov, R.R. Khaydarov, O. Gapurova, Y. Estrin, T. Scheper, *J. Nanoparticle Res.* **11** (2009) 1193–1200.
- [128] M.K. Rabinal, M.N. Kalasad, K. Praveenkumar, V.R. Bharadi, A.M. Bhikshavartimath, *J. Alloys Compd.* **562** (2013) 43–47.
- [129] M.Z. Hu, C.E. Easterly, *Mater. Sci. Eng. C.* **29** (2009) 726–736.
- [130] L. Rodríguez-Sánchez, M.C. Blanco, M.A. Lopez-Quintela, *J. Phys. Chem. B.* **104** (2000) 9683–9688.
- [131] B. Yin, H. Ma, S. Wang, S. Chen, *J. Phys. Chem. B.* **107** (2003) 8898–8904.
- [132] V. Mišković-Stanković, *Organske zaštitne prevlake*, SITZAMS, Beograd, 2001.
- [133] H. Ma, B. Yin, S. Wang, Y. Jiao, W. Pan, S. Huang, S. Chen, F. Meng, *ChemPhysChem.* **5** (2004) 68–75.
- [134] L. Blandon, M. V Vazquez, D.M. Benjumea, G. Ciro, *Port. Electrochim. Acta.* **30** (2012) 135–144.
- [135] K.-L. Liang, Y.-C. Wang, W.-L. Lin, J.-J. Lin, *RSC Adv.* **4** (2014) 15098–15103.
- [136] J. Krstić, J. Spasojević, A. Radosavljević, M. Šiljegović, Z. Kačarević-Popović, *Radiat. Phys. Chem.* **96** (2014) 158–166.
- [137] A. Kyrychenko, D.A. Pasko, O.N. Kalugin, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19** (2017) 8742–8756.

- [138] K.M.M. Abou El-Nour, A. Eftaiha, A. Al-Warthan, R.A.A. Ammar, *Arab. J. Chem.* **3** (2010) 135–140.
- [139] S.Y. Seo, G.H. Lee, S.G. Lee, S.Y. Jung, J.O. Lim, J.H. Choi, *Carbohydr. Polym.* **90** (2012) 109–115.
- [140] L. Guo, W. Yuan, Z. Lu, C.M. Li, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **439** (2013) 69–83.
- [141] K. Swaroop, S. Francis, H.M. Somashekarappa, *Mater. Today Proc.* **3** (2016) 1792–1798.
- [142] A.M. Abdelgawad, S.M. Hudson, O.J. Rojas, *Carbohydr. Polym.* **100** (2014) 166–178.
- [143] H.L. Abd El-Mohdy, *J. Polym. Res.* **20** (2013) 177.
- [144] K.B. Narayanan, S.S. Han, *Food Chem.* **234** (2017) 103–110.
- [145] N. Eghbalifam, M. Frounchi, S. Dadbin, *Int. J. Biol. Macromol.* **80** (2015) 170–176.
- [146] N. Durán, M. Durán, M.B. de Jesus, A.B. Seabra, W.J. Fávaro, G. Nakazato, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **12** (2016) 789–799.
- [147] C. Marambio-Jones, E. Hoek, *J. Nanoparticle Res.* **12** (2010) 1531–1551.
- [148] W. Likus, G. Bajor, K. Siemianowicz, *Acta. Biochim. Pol.* **60** (2013) 495–501.
- [149] M. Rai, A. Yadav, A. Gade, *Biotechnol. Adv.* **27** (2009) 76–83.
- [150] W. Yang, C. Shen, Q. Ji, H. An, J. Wang, Q. Liu, Z. Zhang, *Nanotechnology.* **20** (2009) 85102.
- [151] K.K.Y. Wong, X. Liu, *Med. Chem. Commun.* **1** (2010) 125–131.
- [152] C. Carlson, S.M. Hussein, A.M. Schrand, L.K. Braydich-Stolle, K.L. Hess, R.L. Jones, J.J. Schlager, *J. Phys. Chem. B.* **112** (2008) 13608–13619.
- [153] B.S. Atiyeh, M. Costagliola, S.N. Hayek, S.A. Dibo, *Burns.* **33** (2007) 139–148.
- [154] E. Vlachou, E. Chipp, E. Shale, Y.T. Wilson, R. Papini, N.S. Moiemmen, *Burns.* **33** (2007) 979–985.
- [155] C.N.R. Rao, A.K. Sood, K.S. Subrahmanyam, A. Govindaraj, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48** (2009) 7752–7777.
- [156] J. Byun, *J. Microbiol. Biotechnol.* **25** (2015) 145–151.
- [157] V.C. Sanchez, a Jachak, R.H. Hurt, a B. Kane, *Chem. Res. Toxicol.* (2012) 15–34.

- [158] Z. Singh, *Nanotechnol. Sci. Appl.* **9** (2016) 15–28.
- [159] Z. Li, H. Wang, B. Yang, Y. Sun, R. Huo, *Mater. Sci. Eng. C.* **57** (2015) 181–188.
- [160] J. Liang, Y. Huang, L. Zhang, Y. Wang, Y. Ma, T. Cuo, Y. Chen, *Adv. Funct. Mater.* **19** (2009) 2297–2302.
- [161] A.M. Pandele, M. Ionita, L. Crica, S. Dinescu, M. Costache, H. Iovu, *Carbohydr. Polym.* **102** (2014) 813–820.
- [162] W. Qian, X. Hu, W. He, R. Zhan, M. Liu, D. Zhou, Y. Huang, X. Hu, Z. Wang, G. Fei, J. Wu, M. Xing, H. Xia, G. Luo, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* **166** (2018) 61–71.
- [163] D. Depan, B. Girase, J.S. Shah, R.D.K. Misra, *Acta Biomater.* **7** (2011) 3432–3445.
- [164] Y. Liu, M. Park, H.K. Shin, B. Pant, J. Choi, Y.W. Park, J.Y. Lee, S.J. Park, H.Y. Kim, *J. Ind. Eng. Chem.* **20** (2014) 4415–4420.
- [165] Y. Liu, J. Wen, Y. Gao, T. Li, H. Wang, H. Yan, B. Niu, R. Guo, *Appl. Surf. Sci.* **436** (2018) 624–630.
- [166] X. Hu, N. Ren, Y. Chao, H. Lan, X. Yan, Y. Sha, X. Sha, Y. Bai, *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* **102** (2017) 297–304.
- [167] H.M. Hegab, A. Elmekawy, L. Zou, D. Mulcahy, C.P. Saint, M. Ginic-Markovic, *Carbon N. Y.* **105** (2016) 362–376.
- [168] H. Ji, H. Sun, X. Qu, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **105** (2016) 176–189.
- [169] O. Akhavan, E. Ghaderi, A. Esfandiar, *J. Phys. Chem. B.* **115** (2011) 6279–6288.
- [170] M.R. Guascito, D. Chirizzi, R.A. Picca, E. Mazzotta, C. Malitesta, *Mater. Sci. Eng. C.* **31** (2011) 606–611.
- [171] L. Lu, A. Kobayashi, K. Tawa, Y. Ozaki, *Chem. Mater.* **18** (2006) 4894–4901.
- [172] S. Kundu, K. Wang, H. Liang, *J. Phys. Chem. C.* **113** (2009) 134–141.
- [173] S. Mahendia, A.K. Tomar, S. Kumar, *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.* **176** (2011) 530–534.
- [174] R. Jayasekara, I. Harding, I. Bowater, G.B.Y. Christie, G.T. Lonergan, *Polym. Test.* **23** (2004) 17–27.
- [175] X. Shen, J. Wu, S. Bai, H. Zhou, *J. Alloys Compd.* **506** (2010) 136–140.
- [176] D. Li, M.B. Muller, S. Gilje, R.B. Kaner, G.G. Wallace, *Nat. Nanotechnol.* **3**

- (2008) 101–105.
- [177] A. Šileikaitė, I. Prosyčevas, J. Puišo, A. Juraitis, A. Guobienė, *Mater. Sci.* **12** (2006) 287–291.
- [178] M.H. Buraidah, A.K. Arof, *J. Non. Cryst. Solids.* **357** (2011) 3261–3266.
- [179] H.S. Mansur, R.L. Oréfice, A.A.P. Mansur, *Polymer (Guildf).* **45** (2004) 7193–7202.
- [180] Z.H. Mbhele, M.G. Salemane, C.G.C.E. van Sittert, J.M. Nedeljkovic, V. Djoković, A.S. Luyt, *Chem. Mater.* **15** (2003) 5019–5024.
- [181] Z.I. Ali, F.A. Ali, A.M. Hosam, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **72** (2009) 868–875.
- [182] H. Li, T. Lu, L. Pan, Y. Zhang, Z. Sun, *J. Mater. Chem.* **19** (2009) 6773.
- [183] S.K. Mallapragada, N. a Peppas, *J. Polym. Sci.* **34** (1996) 1339–1346.
- [184] S. Pandey, S.K. Pandey, V. Parashar, G.K. Mehrotrab, A.C. Pandey, *J. Mater. Chem.* **21** (2011) 17154–17159.
- [185] Q. Cheng, F. Pan, B. Chen, Z. Jiang, *J. Memb. Sci.* **363** (2010) 316–325.
- [186] M. Ghanipour, D. Dorranean, *J. Nanomater.* **2013** (2013) 10.
- [187] Y.L. Luo, Q.B. Wei, F. Xu, Y.S. Chen, L.H. Fan, C.H. Zhang, *Mater. Chem. Phys.* **118** (2009) 329–336.
- [188] P.K. Khanna, N. Singh, S. Charan, V.V.V.S. Subbarao, R. Gokhale, U.P. Mulik, *Mater. Chem. Phys.* **93** (2005) 117–121.
- [189] S. Wang, Y. Zhang, N. Abidi, L. Cabrales, *Langmuir.* **25** (2009) 11078–11081.
- [190] I.O. Ali, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **436** (2013) 922–929.
- [191] V.H. Nguyen, B.K. Kim, Y.L. Jo, J.J. Shim, *J. Supercrit. Fluids.* **72** (2012) 28–35.
- [192] J. Li, C. Liu, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010** (2010) 1244–1248.
- [193] T.T. Baby, S. Ramaprabhu, *J. Mater. Chem.* **21** (2011) 9702.
- [194] Z. Ni, Y. Wang, T. Yu, Z. Shen, *Nano Res.* **1** (2008) 273–291.
- [195] S. Lee, J.-Y. Hong, J. Jang, *Polym. Int.* **62** (2013) 901–908.
- [196] A.C. Joshi, G.B. Markad, S.K. Haram, *Electrochim. Acta.* **161** (2015) 108–114.
- [197] S.B. Bon, L. Valentini, R. Verdejo, J.L.G. Fierro, L. Peponi, M.A. Lopez-Manchado, J.M. Kenny, *Chem. Mater.* **21** (2009) 3433–3438.
- [198] X. Yang, L. Li, S. Shang, X. ming Tao, *Polymer (Guildf).* **51** (2010) 3431–3435.

- [199] D.S. Yu, T. Kuila, N.H. Kim, J.H. Lee, *Chem. Eng. J.* **245** (2014) 311–322.
- [200] J. Guo, L. Ren, R. Wang, C. Zhang, Y. Yang, T. Liu, *Compos. Part B Eng.* **42** (2011) 2130–2135.
- [201] E. Fortunati, F. Luzi, D. Puglia, A. Terenzi, M. Vercellino, L. Visai, C. Santulli, L. Torre, J.M. Kenny, *Carbohydr. Polym.* **97** (2013) 837–848.
- [202] A.G. El-Shamy, W. Attia, K.M. Abd El-Kader, *J. Alloys Compd.* **590** (2014) 309–312.
- [203] L. Jiang, X.-P. Shen, J.-L. Wu, K.-C. Shen, *J. Appl. Polym. Sci.* **118** (2010) 275–279.
- [204] X. Yuan, *Polym. Bull.* **67** (2011) 1785–1797.
- [205] C. Greulich, J. Diendorf, J. Geßmann, T. Simon, T. Habijan, G. Eggeler, T.A. Schildhauer, M. Epple, M. Köller, *Acta Biomater.* **7** (2011) 3505–3514.
- [206] G. Meriç, J.E. Dahl, I.E. Ruyter, *Dent. Mater.* **24** (2008) 1201–1206.
- [207] Y. Hu, V. Darcos, S. Monge, S. Li, Y. Zhou, F. Su, *J. Mater. Chem. B.* **2** (2014) 2738.
- [208] G. Sjögren, G. Sletten, J.E. Dahl, *J. Prosthet. Dent.* **84** (2000) 229–236.

BIOGRAFIJA AUTORA

Rade Surudžić rođen je 29.04.1981. godine u Negotinu. Osnovnu školu i gimnaziju završio je u Negotinu. Diplomirao je na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2011. godine na Katedri za fizičku hemiju i elektrohemiju radom na temu „Koroziona stabilnost biokeramičkih prevlaka hidroksiapatit/lignin na titanu u simuliranom telesnom fluidu“.

Školske 2011/12. godine upisao je doktorske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Hemijsko inženjerstvo, pod rukovodstvom mentora dr Vesne Mišković-Stanković, redovnog profesora TMF. Rade Surudžić je položio sve ispite predviđene studijskim programom na doktorskim studijama sa prosekom 9,18. U zvanje istraživač-saradnik izabran je 29.12.2011.

Iz oblasti istraživanja kojoj pripada predložena tema doktorske disertacije Rade Surudžić je autor jednog rada u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (M21a), jednog rada u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), dva rada u časopisu međunarodnog značaja (M23), dva saopštenja sa međunarodnog skupa štampanih u izvodu (M34) i jednog saopštenja sa skupa nacionalnog značaja štampanog u izvodu (M64).

Spisak objavljenih radova i saopštenja:

1. Radovi objavljeni u naučnim časopisima međunarodnog značaja – M20

1.1. Rad u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti - M21a

1. **R. Surudžić**, A. Janković, N. Bibić, M. Vukašinović-Sekulić, A. Perić-Grujić, V. Mišković-Stanković, A.J. Park, K.Y. Rhee, Physico-chemical and mechanical properties and antibacterial activity of silver/poly(vinyl alcohol)/graphene nanocomposites obtained by electrochemical method, *Composites Part B: Engineering*, **85** (2016) 102-112. ISSN: 1359-8368, IF (2015) = 3.850.

1.2. Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu – M21

1. **R. Surudžić**, A. Janković, M. Mitrić, I. Matić, Z.D. Juranić, Lj. Živković, V. Mišković-Stanković, K.Y. Rhee, S.J. Park, D. Hui, The effect of graphene loading on mechanical, thermal and biological properties of poly(vinyl alcohol)/graphene nanocomposites, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **34** (2016) 250–257. ISSN: 1226-086X, IF (2015) = 4.179.

1.3. Rad u međunarodnom časopisu – M23

1. **R. Surudžić**, Ž. Jovanović, N. Bibić, B. Nikolić, V. Mišković-Stanković, Electrochemical synthesis of silver nanoparticles in poly(vinyl alcohol) solution, *Journal of the Serbian Chemical Society*, **78** (2013) 2087–2098. ISSN: 1820-7421, IF (2013) = 0.95.

2. **R. Surudžić**, A. Janković, M. Vukašinović-Sekulić, A. Perić-Grujić, K.Y. Rhee, V. Mišković-Stanković, Optimization of the electrochemical synthesis of silver nanoparticles in poly(vinyl alcohol) colloid solutions, *Bulgarian Chemical Communications*, **49** (2017) 186-193. ISSN: 0324-1130, IF (2015) = 0.229.

2. Zbornici međunarodnih naučnih skupova – M30

2.1. Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu – M34

1. **R. Surudžić**, Ž. Jovanović, V. Mišković Stanković, Electrochemical synthesis and characterization of silver nanoparticles in poly(vinyl alcohol) solution, *The Eleventh Young Researchers' Conference: Materials Science and Engineering*, Belgrade, December 3 – 5, 2012, Serbia, Book of Abstracts, TM 9, p. 51. ISBN: 9788673061221.

2. **R. Surudžić**, Ž. Jovanović, V. Mišković Stanković, Formation of Silver Nanoparticles in Poly(vinyl alcohol) Solution by Electrochemical Synthesis, *The Twelfth Young Researchers' Conference: Materials Science and Engineering*, Belgrade, December 11 – 13, 2013, Serbia, Book of Abstracts, IX/4, p. 32. ISBN: 9788680321288.

3. Zbornici skupova nacionalnog značaja – M60

3.1. Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu – M64

1. **R. Surudžić**, Z. Jovanović, V. Misković-Stanković, Optimizacija uslova elektrohemijske sinteze nanocestica srebra u rastvoru poli(vinil alkohola), *Prva konferencija mladih hemicara Srbije*, 19-20 Oktobar, Beograd, 2012, Zbornik radova (CD Rom) NM P17, str. 105. ISBN: 978-86-7132-050-4.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани Раде Суруџић

Број индекса ДС - 4003/2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Електрохемијска синтеза и карактеризација нанокompозита поливинил-алкохола, графена и наночестица сребра

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Прилог 2.

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

Име и презиме аутора	Раде Суруџић
Број индекса	ДС - 4003/2011
Студијски програм	Хемијско инжењерство
Наслов рада	

**Електрохемијска синтеза и карактеризација нанокомпозита поливинил-
алкохола, графена и наночестица сребра**

Ментор др Весна Мишковић-Станковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

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:

Електрохемијска синтеза и карактеризација нанокомпозита поливинил-алкохола, графена и наночестица сребра

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

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

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

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

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

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

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