

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Anđela N. Radisavljević

**Procesiranje i karakterizacija polimernih
nanovlakana sa antimikrobnim efektom za
prevenciju infekcija izazvanih kateterizacijom
urinarnog trakta**

doktorska disertacija

Beograd, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Anđela N. Radisavljević

**Processing and characterization of polymer
nanofibers with antimicrobial activity for the
prevention of infections caused by
catheterization of the urinary tract**

Doctoral Disertation

Belgrade, 2022

Mentori:

dr Petar Uskoković, red. prof. Univerziteta u
Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

dr Mirjana Rajilić-Stojanović, van. prof.
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški
fakultet

Članovi komisije:

dr Vesna Radojević, red. prof. Univerziteta u
Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

dr Dušica Stojanović, naučni savetnik Univerziteta u
Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

dr Jasna Stajić-Trošić, naučni savetnik Univerziteta
u Beogradu, Institut za hemiju, tehnologiju i
metalurgiju

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Neizmernu zahvalnost dugujem mentorki, dr Mirjani Rajilić-Stojanović, na nesebičnoj pomoći, sugestijama, savetima, ali i kritikama, kako bi ova doktorska disertacija poprimila svoj konačni oblik. Pored toga, zahvaljujem se na izdvojenom vremenu i svim mudrim savetima koje mi je davala mimo okvira ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se mentoru dr Petru Uskokoviću na korisnim savetima i sugestijama u svim fazama izrade ove disertacije.

Hvala članovima komisije, dr Vesni Radojević i dr Dušici Stojanović, na korisnim savetima i usmeravanju tokom izrade ove doktorske disertacije, a posebno na razumevanju i ogromnoj podršci kada mi je to najviše trebalo. Takođe, hvala dr Jasni Stajić-Trošić na sugestijama i učešću u izradi disertacije.

Zahvaljujem se dragoj kolegini dr Milici Milutinović za svesrdnu pomoć tokom izrade ove disertacije, kao i svim zaposlenim na Katedri za Biotehnologiju i biohemijsko inženjerstvo na lepjoj atmosferi i druženju.

Posebno hvala prijateljima i kolegama Iki, Joci, Joki, Bubiju, Srđanu i Danielu koji sve vreme stoje uz mene i pružaju nesebičnu podršku.

Hvala kumi Maji i Iskri što su me svojim zagrljajima lečile i izmamljivale osmeh u najtežoj fazi života.

Zahvaljujem tetki za uloženi mukotrpani trud tokom pisanja svakog sastava, učenja ruskog jezika, a posebno hvala na socijalizaciji od malih nogu.

Hvala roditeljima što su mi darovali sestru Anicu, mog životnog saputnika, koja ponosno stoji iza svakog mog uspeha, ali i neuspeha, čvrsto, kao na Drini ćuprija.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj Majci za svaku skuvanuu kafu, isceđen sok, čokoladnu bananicu, ručak, užinu, brigu, negu, energiju, podršku, kritiku i snagu u našim najtežim borbama i izvinjavam za sve neprospavane noći na ovom našem „trnovitom putu do zvezda“.

I na kraju, zahvaljujem se Gospodu Bogu što čuva moja dva Anđela – Tatu i Ljiku, kojima bih rekla – Hvala što ste me na sebi jedinstven način usmeravali i podržavali i učinili da budem baš ovakva kakva jesam. Svojim prisustvom ulepšali ste moj život. Dok živim ja, živećete i Vi.

Posvećeno Roditeljima i Sestri s ljubavlju,

u znak zahvalnosti za

pomoć svake vrste, čitav moj život.

Procesiranje i karakterizacija polimernih nanovlakana sa antimikrobnim efektom za prevenciju infekcija izazvanih kateterizacijom urinarnog trakta

REZIME

U ovoj doktorskoj disertaciji razvijeni su polimerni materijali, nosači biološki aktivnih supstanci namenjeni za oblaganje urinarnih katetera. Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) nanovlakna sa antibiotikom cefazolinom su procesirana pomoću tri metode elektropredenja. Dobijeni nanovlaknasti matovi su otpuštali lek različitom dinamikom i za 30 dana oslobođeno je ~68 %, ~43 % i ~5 % iz nanovlaknastih matova dobijenih elektropredenjem iz rastvora, koaksijalnim i emulzionim elektropredenjem, redom. Nanovlakna sa cefazolinom su pokazala antibakterijsko dejstvo prema *S. aureus* i *E. coli*. Razvijeni su i PCL nanovlaknasti matovi korišćenjem metode elektropredenja iz rastvora sa četiri koncentracije ekstrakta hajdučke trave. Korišćenjem statistički planiranog eksperimenta optimizovani su uslovi sušenja raspršivanjem za dobijanje suvog ekstrakta podesnog za inkorporaciju u polimerni materijal. Sušenje je izvedeno na temperaturi od 130 °C, pri brzini protoka tečnog ekstrakta od 7,5 ml/min sa 1,2 % sadržaja suve materije. Do 98 % inkorporiranih polifenola hajdučke trave oslobođeno je iz PCL nanovlakana tokom pet dana. Nanovlaknasti matovi su pokazali antioksidativnu i antibakterijsku aktivnost prema *S. aureus*. Dodatak ekstrakta hajdučke trave poboljšao je mehanička svojstva PCL nanovlaknastih matova, evidentno kroz povećanje Jungovog modula elastičnosti (do 5,7 puta), zatezne čvrstoće (do 5,5 puta) i prekidne deformacije (do 1,45 puta).

Silikonski i gumeni kateteri obloženi PCL nanovlaknastim matovima sa cefazolinom ili ekstraktom hajdučke trave uz adheziv n-butil-2-cijanoakrilat pokazali su dobru mehaničku stabilnost i antibakterijsku aktivnost. U disertaciju su razvijeni materijali pogodni za dobijanje obloženih katetera koji mogu da spreče razvoj bakterija i infekcije urinarnog trakta.

Ključne reči: poli(ϵ -kaprolakton); elektropredenje; cefazolin, hajdučka trava; polifenoli; oslobađanje leka; kinetika oslobađanja leka; antibakterijska aktivnost; antioksidativna aktivnost; mehanička svojstva

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Inženjerstvo materijala

UDK broj:

Processing and characterization of polymer nanofibers with antimicrobial activity for the prevention of infections caused by catheterization of the urinary tract

ABSTRACT

Polymeric materials, carriers of biologically active substances, intended for the production of urinary catheter coatings were developed in this doctoral thesis. Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) nanofibers with antibiotic cefazolin were produced by using three electrospinning methods. The obtained nanofiber mats showed different dynamics of drug release. After a period of 30 days ~68%, ~43% and ~5% of the drug was released from the nanofiber mats obtained by blend electrospinning, co-axial and emulsion electrospinning, respectively. PCL nanofibers with cefazolin suppressed the growth of *S. aureus* and *E. coli*. Moreover, PCL nanofiber mats containing four different concentrations of yarrow extract were processed by using blend electrospinning. Spray drying parameters for obtaining dry yarrow extract, which is suitable for incorporation in a polymeric material, were optimized in a statistically planned experiment. The drying was performed at 130 °C, with a liquid extract (1.2 % of dry matter content) flow rate of 7.5 ml/min. Up to 98 % of the total polyphenols were released from the electrospun PCL nanofibers after a period of five days. Nanofiber mats showed antioxidant and antibacterial activity against *S. aureus*. The addition of yarrow extract improved mechanical properties of PCL nanofibers, evident by an increase in Young's modulus of elasticity (up to 5.7 fold), the tensile strength (up to 5.5 fold), and the strain at break (up to 1.45 fold).

Silicone and rubber catheters were coated with PCL nanofiber mats with cefazolin or yarrow by using adhesive n-butyl-2-cyanoacrylate. The coated catheters showed good mechanical stability and antibacterial activity. The materials are suitable for production of coated catheters that could prevent urinary tract infections.

Keywords: poly(ϵ -caprolactone); electrospinning; cefazolin; yarrow; polyphenols; drug release; drug release kinetics; antibacterial activity; antioxidant activity; mechanical properties

Scientific field: Technological Engineering

Scientific subfield: Material Engineering

UDC Number:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKA RAZMATRANJA.....	3
2.1. Nanotehnologija i bionanotehnologija	3
2.1.1. Definicija nanonauke i nanotehnologije	3
2.1.2. Kratak istorijat nanotehnologije	3
2.1.3. Pioniri u nanotehnologiji	4
2.1.4. Bionanotehnologija.....	4
2.2. Polimerni materijali.....	5
2.2.1. Biomaterijali	5
2.2.2. Biorazgradivi polimerni biomaterijali	6
2.2.3. Alifatični biorazgradivi poliestri.....	9
2.2.4. Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL)	10
2.2.4.1. Sinteza PCL.....	10
2.2.4.2. Svojstva i degradacija PCL	11
2.2.4.3. PCL u nanotehnologiji	12
2.3. Sistemi za isporuku lekova.....	14
2.3.1. Sistem sa kontrolisanom isporukom lekova	15
2.3.1.1. Klasifikacija sistema za isporuku lekova sa kontrolisanim oslobađanjem	17
2.3.2. Biomaterijali kao nanonosai u kontrolisanoj isporuci lekova.....	18
2.4. Geneza i razvoj elektrosprednja kao metode procesiranja nanovlakana.....	19
2.4.1. Osnove i vrste procesa elektrosprednja	20
2.4.1.1. Elektrosprednje iz rastvora	20
2.4.1.2. Koaksijalno elektrosprednje	21
2.4.1.3. Emulziono elektrosprednje	22
2.4.2. Faktori koji uticu na proces elektrosprednja	24
2.4.2.1. Uticaj karakteristika rastvora na proces elektrosprednja nanovlakana	24
2.4.2.2. Uticaj procesnih parametara elektrosprednja na karakteristike nanovlakana.....	25
2.4.2.3. Uticaj ambijentalnih parametara pri izvođenju elektrosprednja na karakteristike nanovlakana	26
2.4.3. Karakterizacija elektrospredjenih nanovlakna	26
2.4.4. PCL nanovlakna u biomedicini – kratak pregled dosadašnjih istraživanja	27
2.4.5. Primena lekovitog bilja u nanovlaknima	30
2.5. Lekovito bilje	31
2.5.1. Upotreba lekovitog bilja	31
2.5.2. Hajdučka trava (<i>Achillea millefolium</i> L.)	31

2.5.2.1. Primena hajdučke trave u tretmanu zarastanja rana.....	33
2.5.3. Postupak prerade i dobijanja suvih biljnih ekstrakata	33
2.5.4. Optimizacija procesnih promenljivih metodom odzivnih površina.....	35
2.5.5. Polifenoli.....	36
2.6. Kateterizacija urinarnog trakta	37
2.6.1. Urinarni kateteri.....	37
2.6.2. Materijali za oblaganje urinarnih katetera	39
3. CILJEVI RADA.....	41
4. EKSPERIMENTALNI DEO	42
4.1. Materijali i oprema	42
4.1.1. Materijali.....	42
4.1.2. Oprema	43
4.2. Metode procesiranja nanovlakana	44
4.3. Metode dobijanja ekstrakta hajdučke trave	45
4.3.1. Priprema tečnog ekstrakta hajdučke trave	45
4.3.2. Sušenje raspršivanjem tečnog ekstrakta hajdučke trave	46
4.3.3. Optimizacija uslova sušenja raspršivanjem	46
4.3.3.1. Prinos osušenog ekstrakta	47
4.4. Oblaganje komercijalno dostupnih katetera nanovlaknastim matom.....	47
4.5. Metode karakterizacije materijala	47
4.5.1. Morfološka karakterizacija materijala	47
4.5.2. Ispitivanje hemijskih interakcija u materijalima.....	48
4.5.3. Ispitivanje termičkih svojstava materijala	48
4.5.4. Ispitivanje mehaničkih svojstava materijala	48
4.5.4.1. „Peel“ test.....	49
4.5.5. Određivanje ukupnog sadržaja polifenola	50
4.5.6. <i>In vitro</i> studije oslobađanja bioaktivne supstance	51
4.5.6.1. Kinetičke studije oslobađanja bioaktivne supstance	52
4.5.7. Određivanje antioksidativne aktivnosti	53
4.5.8. Određivanje antibakterijske aktivnosti	54
4.5.8.1. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije mikrodilucionom metodom sa resazurinom kao indikatorom.....	54
4.5.8.2. Određivanje antibakterijske aktivnosti metodom razblaženja	55
4.5.8.3. Određivanje antibakterijske aktivnosti metodom zone inhibicije.....	55
5. REZULTATI I DISKUSIJA	56
5.1. Karakterizacija PCL nanovlakana sa cefazolinom	56
5.1.1. Morfološke karakteristike PCL nanovlakana sa cefazolinom	57

5.1.2. Hemijske interakcije u PCL nanovlaknima sa cefazolinom	60
5.1.3. Termička svojstva PCL nanovlakana sa cefazolinom	61
5.1.4. Kinetika oslobađanja leka iz PCL nanovlakana sa cefazolinom	64
5.1.5. Antibakterijska aktivnost PCL nanovlakana sa cefazolinom	66
5.2. Optimizacija procesa dobijanja i karakterizacija suvog ekstrakta hajdučke trave	69
5.2.1. Postavljanje modela	69
5.2.2. Uticaj procesnih parametara na prinos osušenog ekstrakta	70
5.2.3. Uticaj procesnih parametara na ukupan sadržaj polifenola u osušenom ekstraktu	74
5.2.4. Uticaj procesnih parametara na antioksidativnu aktivnost osušenog ekstrakta.....	74
5.2.5. Validacija modela	76
5.2.6. Antibakterijska aktivnost tečnog i suvog ekstrakta	77
5.3. Karakterizacija PCL nanovlakana sa suvim ekstraktom hajdučke trave.....	78
5.3.1. Morfološke karakteristike PCL nanovlakana sa suvim ekstraktom hajdučke trave	78
5.3.2. Hemijske interakcije u PCL nanovlaknima sa suvim ekstraktom hajdučke trave.....	79
5.3.3. Termička svojstva PCL nanovlakana sa suvim ekstraktom hajdučke trave	80
5.3.4. Mehanička svojstva PCL nanovlakana sa suvim ekstraktom hajdučke trave.....	82
5.3.5. Kinetika oslobađanja polifenola iz PCL nanovlakana sa suvim ekstraktom hajdučke trave	85
5.3.6. Antioksidativna aktivnost PCL nanovlakana sa suvim ekstraktom hajdučke trave	87
5.3.7. Antibakterijska aktivnost PCL nanovlakana sa suvim ekstraktom hajdučke trave	88
5.4. Evaluacija primenjivosti PCL nanovlaknastih matova sa dodatkom cefazolina ili suvog ekstrakta hajdučke trave za oblaganje komercijalnih urinarnih katetera	89
5.4.1. Adhezija između novorazvijenih PCL nanovlaknastih matova i komercijalnih katetera	89
5.4.2. Antibakterijska aktivnost katetera obloženih novorazvijenim PCL nanovlaknastim matovima	90
6. ZAKLJUČAK	93
7. LITERATURA.....	95
Изјава о ауторству.....	118
Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада.....	119
Изјава о коришћењу.....	120
Оцена извештаја о провери оригиналности докторске дисертације	122

1. UVOD

Antimikrobni polimeri su materijali koji sprečavaju rast mikroorganizama i pogodni su za različite primene, od pakovanja hrane i filtera u tretmanu vode do medicinske i zdravstvene zaštite. Posebna pažnja posvećena je ovim materijalima jer bi mogli da igraju važnu ulogu u prevenciji i redukciji prenosa bolesti (Muñoz-Bonilla i dr., 2013). Funkcionalizovani polimerni materijali sadrže biološki aktivne komponente u polimernoj matrici i mogu se koristiti kao nosači lekova u različitim aplikacijama uključujući antibakterijske flastere i gaze, za tretmane rana u cilju sprečavanja infekcija, kao i za regeneraciju tkiva ili kostiju (Ruckh i dr., 2012; Xue i dr., 2014). I dok veliki broj nosača lekova nalazi široku primenu u praksi, problem infekcija usled urinarne kateterizacije je i dalje aktuelan u kliničkoj praksi a poseban problem predstavlja činjenica da određene medicinske indikacije zahtevaju dugoročnu primenu katetera (Feneley i dr., 2015). Prepoznajući ovaj problem definisan je cilj doktorata – razvoj novih polimernih materijala kao nosača lekova namenjenih za sprečavanje infekcija izazvanih urinarnom kateterizacijom.

Najčešća komplikacija vezana za urinarnu kateterizaciju je kolonizacija bakterija i formiranje biofilma na kateteru. Kateter na kom je formiran biofilm predstavlja vrlo relevantan izvor lokalnih infekcija urinarnog trakta (Donlan, 2001). Kada se javi lokalna infekcija pacijenti se obično leče sistemskim antibioticima. Sistemskom isporukom, često se ne postiže dovoljna koncentracija antibiotika na željenoj lokaciji. U cilju postizanja dovoljne količine antibiotika na ciljanoj lokaciji, poželjna je kontrolisana lokalna isporuka leka što se može postići primenom materijala koji obezbeđuje kontrolisano otpuštanje antibiotskog leka (Kowalczuk i dr., 2010; Xue i dr., 2014). Kontrolisanom isporukom aktivna supstanca se zadržava u terapijskoj dozi duže vreme na ciljanom mestu, čime se značajno smanjuje mogućnost širenja infekcije i drugih neželjenih reakcija (Katti i dr., 2004).

Predmet istraživanja ove teze predstavlja procesiranje nanovlakana iz polimernog rastvora metodom elektropredenja. Dobijena polimerna nanovlakna su iskorišćena kao nosači biološki aktivnih supstanci, koji omogućavaju sprečavanje rasta mikroorganizama a time i infekcija prilikom aplikacije. Prednost primene ovakvih sistema jeste mogućnost dostave visoko kontrolisanih doza lekova na tačnu lokaciju neophodne aplikacije.

Nanovlakna čine grupu materijala čije su prednosti velika specifična površina u odnosu na zapreminu, visoka poroznost, odlična strukturna mehanička svojstva, ekstremna fleksibilnost i ekonomičnost, između ostalog (Son i dr., 2014). Nanovlakna dobijena elektropredenjem imaju manji prečnik i veću specifičnu površinu u poređenju sa vlaknima dobijenim konvencionalnim metodama predenja. Elektropredenje je jedinstven pristup koji koristi elektrostatičke sile za proizvodnju kontinualnih vlakana nanodimenzija iz različitih polimernih rastvora ili rastopa. Nanovlakna dobijena procesom elektropredenja mogu se primeniti u inženjerstvu tkiva, kao nosači lekova, antibakterijske gaze, materijali za zavoje rana itd. (Madhaiyan i dr., 2013; Katti i dr., 2004). Različiti profili otpuštanja lekova kroz nanovlaknaste materijale mogu se postići različitim metodama procesiranja nanovlakana i to koaksijalnim režimom, emulzionim elektropredenjem i elektropredenjem iz rastvora (Madhaiyan i dr., 2013).

Polimeri koji se koriste u oblasti medicine moraju posedovati posebna svojstva kao što su biokompatibilnost, biorazgradivost i niska imunogenost. Najviše korišćeni polimeri u istraživanjima za biološke aplikacije su poli(laktid) (PLA), poli(glikolid) (PLG), poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA), poli(ϵ -kaprolakton) (PCL), poli(etilen oksid) (PEO), želatin i njihove blende (Lee i dr., 2003). U ovoj doktorskoj disertaciji korišćen je PCL, koji u porodici poliestara ima posebno mesto jer je biorazgradiv, ima visoku permeabilnost za male molekule, nije toksičan, ne smanjuje pH vrednost sredine tokom razgradnje (za razliku od PLA i PLG), ima dobru rastvorljivost, nisku temperaturu topljenja (59-64 °C) i izuzetnu kompatibilnost kada se pomeša sa drugim polimerima (Chandra i Rustgi, 1998; Okada, 2002; Nair i Laurencin, 2007). PCL je pogodan za elektropredenje, i do sada je ispitan veliki broj sistema na bazi PCL nanovlakana kao nosača aktivnih supstanci za različite

medicinske primene, ali nije ispitana primena PCL nanovlakana kao potencijalnog materijala za oblaganje urinarnih katetera.

Klinički je ispitano nekoliko vrsta agensa/materijala za prevlake urinarnih katetera sa antimikrobnim svojstvima, uključujući srebro i komercijalne antibiotike. Dokazano je da su prevlake sa antibioticima efikasnije od prevlaka legura srebra protiv infekcija izazvanih većinom Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (Johnson i dr., 2012). Ovaj podatak je bio motivacija da za početna istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji kao aktivna supstanca bude korišćen komercijalni antibiotik širokog spektra dejstva - cefazolin. Cefazolin je inkorporiran u sadržaju od 20 % (u odnosu na masu polimera) u PCL nanovlakna procesirana različitim metodama elektropredenja uključujući koaksijalni režim, emulziono i elektropredenje iz rastvora. Sva dobijena nanovlakna su pokazala antibakterijsku aktivnost ali sa različitom dinamikom oslobađanja aktivne supstance. Različita dinamika oslobađanja antibiotskog leka pogodna je jer se i kateteri primenjuju u različitim vremenskim periodima (mogu biti kratkoročni i dugoročni).

U kasnijim fazama istraživanja korišćena je i prirodna smeša biološki aktivnih supstanci prisutna u ekstraktu hajdučke trave za koju je naučno dokazano da poseduje antimikrobno i antioksidativno dejstvo a tradicionalno se koristi za tretman površinskih povreda jer pomaže zarastanje rana (Benedek i Kopp, 2007; Lakshmi i dr., 2011). Da bi se omogućila inkorporacija dovoljne količine suve materije ekstrakta proizveden je suvi ekstrakt hajdučke trave metodom sušenja raspršivanjem. Uslovi pod kojima je potrebno izvesti sušenje da bi se ostvario najveći prinos procesa i maksimalna očuvanost polifenola, kao nosioca biološke aktivnosti hajdučke trave, definisani su u okviru statistički planiranog eskperimenta (Radisavljević i dr., 2022). Dobijeni suvi ekstrakt inkorporiran je u PCL nanovlakna procesirana metodom elektropredenja iz rastvora u koncentracijama od 5 %, 10 %, 15 % i 20 % u odnosu na masu polimera. Ispitana je antibakterijska i antioksidativna aktivnost ovih materijala, kao i mehanička svojstva.

U poslednjoj fazi, ispitana je adhezija između nanovlaknastih matova najboljih karakteristika sa cefazolinom ili suvim ekstraktom hajdučke trave kao bioaktivnim materijama i komercijalno dostupnih katetera. Dobijeni materijali su vezani pomoću adheziva na biološki inertne polimerne materijale tako da su dobijeni kateteri koji sprečavaju rast patogenih mikroorganizama. Primena ovako modifikovanih katetera mogla bi značajno smanjiti rizik za razvoj komplikacija izazvanih infekcijama kod pacijenata koji zahtevaju urinarnu kateterizaciju.

U okviru *Teorijskog dela* doktorske disertacije detaljnim pregledom literature predstavljena su dosadašnja istraživanja u oblasti biomaterijala sličnih namena, primene metode elektropredenja za dobijanje nanovlakana, kao i njihova primena u oblasti medicine. Takođe, dat je uvid u dosadašnja istraživanja vezana za primenu elektropredenih polimernih nanovlakana i njihovim različitim aplikacijama, kao i načini modifikacije površine komercijalno dostupnih katetera kao metode pripreme za dalje modifikacije u cilju funkcionalizacije.

U okviru *Eksperimentalnog dela*, dat je prikaz materijala i metoda koji su korišteni za dobijanje nanovlaknastih biološki aktivnih matova u skladu sa predmetom istraživanja ove doktorske disertacije. Zatim je dat opis postupka pripreme suvog ekstrakta hajdučke trave i nanovlaknastih matova, kao i uređaja na kojima su vršena procesiranja i eksperimentalna merenja.

U poglavlju *Rezultati i diskusija*, prikazani su i diskutovani eksperimentalni rezultati dobijeni primenom različitih metoda karakterizacije materijala.

U poglavlju *Zaključak* su sumirani svi dobijeni rezultati na osnovu izvedenih istraživanja.

Svi citirani navodi, kao i radovi koji su nastali u toku istraživanja i rada na ovoj doktorskoj disertaciji, nalaze se u poglavlju *Literatura*.

2. TEORIJSKA RAZMATRANJA

2.1. Nanotehnologija i bionanotehnologija

2.1.1. Definicija nanonauke i nanotehnologije

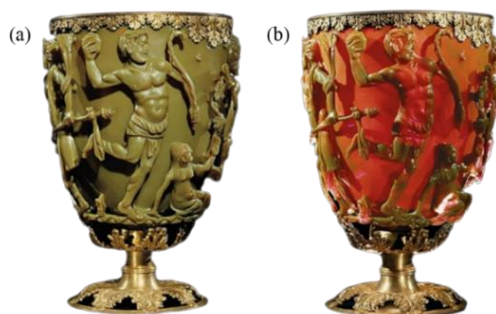
Prefiks „nano“ potiče od grčke reči koja znači „patuljak“ ili nešto veoma malo i prikazuje milijarditi deo merne jedinice (10^{-9}). Istraživanjima u oblasti nanometarskih dimenzija bave se nanonauka i nanotehnologija. Nanonauka se bavi proučavanjem materije i molekula na nanometarskoj skali, tj. u rasponu od 1 do 100 nm, a tehnologija koja koristi rezultate nanonauke u praktičnim primenama kao što su npr. uređaji naziva se nanotehnologija (Mansoori i Soelaiman, 2005). Ilustracije radi, ljudska kosa je debljine 60 000 nm (dakle 60 μm) i ne spada u nanomaterijale, a dvostruka spirala dezoksiribonukleinske kiseline ima prečnik od 1 nm i molekul je u oblasti nanonauke (Gnach i dr., 2015).

Iako prisutna od antičkih vremena i nanonauka i nanotehnologija dobile su na značaju sa razvojem metoda kojima su omogućena istraživanja u ovoj oblasti dimenzija. Nanotehnologija je jedna od najperspektivnijih tehnologija 21. veka i zasnovana je na korišćenju teorije nanonauke kroz posmatranje, merenje, manipulisanje, sklapanje, kontrolu i proizvodnju materije nanometarskih dimenzija. Nacionalna inicijativa za nanotehnologiju (eng. *National Nanotechnology Initiative*, NNI) u Sjedinjenim Američkim Državama definiše nanotehnologiju kao „nauku, inženjering i tehnologiju koja se sprovodi na nanorazmeri (od 1 do 100 nm), gde jedinstveni fenomeni omogućavaju nove primene u širokom spektru oblasti, od hemije, fizike i biologije, do medicine, inženjerstva i elektronike“ (National Nanotechnology Initiative (NNI)).

2.1.2. Kratak istorijat nanotehnologije

Nanostrukturne materijale su ljudi ispitivali i dobijali jednostavnim procesima proizvodnje još u antičko doba iskorišćavajući superiorna svojstva nanomaterijala, ni ne sluteći da je reč o strukturama nano razmere. Tek kasnijih godina, sa razvojem nanotehnologije, naučnici su se osvrnuli na ispitivanje tih materijala savremenim uređajima i analizama utvrdili da je reč o nanostrukturnim materijalima.

Tako su na primer nanočestice korišćene još u četvrtom veku nove ere, od strane Rimljana, za dobijanje Likurgove šolje. Likurgova šolja predstavlja jedno od najistaknutijih dostignuća u antičkoj industriji stakla i napravljena je od dihroičnog stakla. Dihroično staklo menja boju u određenim uslovima osvetljenja. Tako, Likurogva šolja ima dve različite boje: staklo izgleda zeleno na direktnom svetlu, a crveno-ljubičasto kada svetlost sija kroz staklo (slika 2.1.) (Bayda i dr., 2019).



Slika 2.1. Likurgova čaša: Staklo izgleda (a) zeleno u reflektovanoj svetlosti i (b) crveno-ljubičasto u propuštenoj svetlosti (preuzeto iz Bayda i dr., 2019)

Naučnici su tek 1990. godine, razvojem savremenih uređaja za identifikaciju nanostrukture, analizirali šolju koristeći transmisionu elektronsku mikroskopiju (eng. *Transmission electron microscopy*, TEM) da bi objasnili fenomen dihiroizma (Barber i Freestone, 1990). Uočeni dihiroizam (dve boje) je posledica prisustva nanočestica prečnika 50-100 nm. Rendgenska analiza je pokazala da su ove nanočestice legura srebra i zlata (Ag-Au), sa odnosom Ag:Au od oko 7:3, koja dodatno sadrži oko 10 % bakra (Cu) dispergovanog u staklenoj matrici (Freestone i dr., 2007; Wagner i dr., 2000). Nanočestice zlata proizvode crvenu boju kao rezultat apsorpcije svetlosti na talasnoj dužini od oko 520 nm. Crveno-ljubičasta boja nastaje usled apsorpcije svetlosti od strane većih čestica, dok se zelena boja pripisuje rasejanju svetlosti koloidnim disperzijama nanočestica srebra većih od 50 nm. Likurgova šolja je prepoznata kao jedan od najstarijih sintetskih nanomaterijala (Mansoori i Soelaiman, 2005).

Tokom IX-XVII veka, blistave keramičke glazure korišćene u islamskom svetu, a kasnije i u Evropi, sadržale su nanočestice srebra, bakra i drugih metala (Pradell i dr., 2007). Italijani su takođe koristili nanočestice u stvaranju renesansne keramike tokom 16. veka (Poole i Owens, 2003). Na njih su uticale otomanske tehnike: tokom XIII-XVIII veka, za proizvodnju sečiva sablji „Damask“, korišćene su cementitne nanožice i ugljenične nanocevi da bi se obezbedila snaga, otpornost i sposobnost održanja oštine (Reibold i dr., 2006).

Danas nanotehnologija predstavlja jednu od brzorastućih naučnih disciplina za proučavanje i razvoj uređaja i materijala u različitim oblastima. Nanotehnologije doprinose skoro svakoj oblasti nauke, uključujući fiziku, nauku o materijalima, hemiju, biologiju, računarstvo i inženjerstvo. Nanotehnologija se koristi u zaštiti životne sredine i za efikasniju proizvodnju energije. Nanotehnologija omogućava stvaranje manjeg zagađenja tokom proizvodnje materijala, proizvodnju solarnih ćelija za proizvodnju električne energije, čišćenje organskih hemikalija koje zagađuju podzemne vode i čišćenje isparljivih organskih jedinjenja iz vazduha. Zatim, potreba za računarskim primenama na nanorazmeri je stvorila oblast nanoinformatike. Posebnu oblast zauzima primena nanotehnologije u medicinske svrhe i primetno je da su poslednjih godina nanotehnologije primenjene na ljudsko zdravlje sa obećavajućim rezultatima, posebno u oblasti lečenja kancera (Bayda i dr., 2019).

2.1.3. Pioniri u nanotehnologiji

Američki fizičar i dobitnik Nobelove nagrade Ričard Fajnman (Richard Feynman) predstavio je koncept nanotehnologije 1959. godine (Feynman, 1960). Posle petnaest godina, Norio Taniguči (Norio Taniguchi), japanski naučnik, prvi je upotrebio i definisao termin „nanotehnologija“ 1974. godine na sledeći način: „nanotehnologija se uglavnom sastoji od obrade, razdvajanja, konsolidacije i deformacije materijala jednim atomom ili jednim molekulom“ (Taniguchi i dr., 1974). Godine 1986. Erik Drexler (K. Eric Drexler) objavio je prvu knjigu o nanotehnologiji „Motori stvaranja: Dolazeća era nanotehnologije“, što je dovelo do toga da teorija „molekularnog inženjeringa“ postane popularnija (Drexler, 1986). Kasnije, 1991., Drexler, Peterson i Pergamit (Drexler, Peterson i Pergamit) su objavili još jednu knjigu pod naslovom „Neograničena budućnost: nanotehnološka revolucija“ u kojoj koriste termine „nanobotovi“ ili „sastavljači“ za nano procese u medicinskim aplikacijama, a čuveni izraz „nanomedicina“ je u pomenutoj knjizi prvi put iskorišćen (Drexler, 1991).

2.1.4. Bionanotehnologija

Bionanotehnologija je razvijena kao posebna disciplina u okviru nanotehnologija koja se bavi razvojem materijala namenjenih za primenu u živom organizmu. U cilju postizanja svojstava materijala koji su pogodni za primenu u živom organizmu, bionanotehnologija je orijentisana ka usavršavanju osnovnih svojstava materijala, kao što su sastav, struktura i morfologija. Primenom tehnologije moguće je upravljati veličinom čestica, a sa ciljem dobijanja nanostrukturnih materijala

(Sanvicens i Marco, 2008). Kod nanostrukturnih materijala primenljivih u živom organizmu važno je istaći da su njihove dimenzije uporedive sa veličinom ćelijskih komponenti (nukleinskih kiselina ili proteina) ili virusa, što pruža mogućnost njihove međusobne interakcije na molekulskom nivou (Goodsell, 2004). Primena bionanotehnologije u mnogim oblastima, kao što su rana dijagnostika ili isporuka lekova, intenzivno se istražuje i pokazuje odlične rezultate. Pozitivni primeri uključuju nanomaterijale za isporuku lekova i regenerativnu medicinu, kao i nanočestice sa antibakterijskim dejstvom ili funkcionalne nanostrukture koje se koriste za detekciju biomarkera kao što su nanobiočipovi, nanoelektrode ili nanobiosenzori (Weissig i dr., 2014).

Nakon višegodisnjih istraživanja i napretka u oblasti nanotehnologija, pokazan je ogroman potencijal koji nanotehnologije imaju u biologiji i medicini kako za dijagnozu tako i za terapiju mnogih ljudskih bolesti (Kinnear i dr., 2017). Bionanotehnologiju mnogi stručnjaci smatraju jednom od najintrigantnijih oblasti primene nanonauka.

2.2. Polimerni materijali

Konvencionalni polimeri, poli(etilen), poli(propilen), poli(vinil hlorid) ili poli(stiren), su materijali koji se koriste u svakodnevnom životu, u formi plastike, veštačkih vlakana, gume i premaza boja. Sa razvojem savremenog društva, pokazalo se da konvencionalni polimeri ne mogu da zadovolje sve potrebe, zbog čega se javila potreba za razvojem novih polimera sa specifičnim funkcijama - naprednih funkcionalizovanih polimera. Pored unapređenih mehaničkih svojstava konvencionalnih polimernih materijala, napredni funkcionalizovani polimerni materijali mogu posedovati hemijsku reaktivnost, fotoosetljivost, električnu provodljivost, katalitička svojstva, biokompatibilnost, biološku aktivnost, farmakološka svojstva, selektivno odvajanje i pretvaranje energije. Takvi polimeri imaju primenu u mnogim oblastima kao što su prikupljanje i skladištenje energije, bežične komunikacije, biomedicina, odvajanje nafte/vode ili gasa i inteligentne i bioničke industrije (Zhao i dr., 2017; Zhang i dr., 2017). Nauka o funkcionalizovanim polimerima, razvijena 1960-ih, je interdisciplinarna oblast koja obuhvata hemiju i fiziku polimera, nauku o materijalima, biologiju, energiju, nanonauku i životnu sredinu (Anderson i dr., 1981). Funkcionalizovani polimeri su jedan od važnih osnova moderne industrije i napredne tehnologije, pa je velika usmerenost posvećena razvoju novih funkcionalizovanih polimera kako bi se zadovoljile nove potrebe savremenog društva.

Brojni pregledni radovi ukazuju na mogućnost primene naprednih funkcionalizovanih polimera u različitim oblastima. Postoji širok opseg funkcija naprednih funkcionalizovanih polimera, kao što su polimerne micelle ili vezikule za isporuku lekova i gena, polimerni gelovi, biomedicinski polimeri, polimeri sa memorijom oblika, polimeri koji reaguju na stimulanse, luminiscentni polimeri, polimeri kovalentnog organskog okvira i supramolekularni polimeri (Wang i dr., 2020). Napredni funkcionalizovani polimeri obuhvataju jako puno nesrodnih tema, pa su u ovoj doktorskoj disertaciji predstavljena istraživanja koja su vezana za biomedicinske polimere materijale, odnosno polimerne biomaterijale.

2.2.1. Biomaterijali

Biomaterijal se može definisati kao materijal namenjen za povezivanje sa biološkim sistemima u cilju procene, lečenja, povećanja ili zamene bilo kog tkiva, organa ili funkcije tela (Piskin, 1995). Globalno tržište implantabilnih biomaterijala vredelo je skoro 75,1 milijardu dolara u 2013. Ovo tržište je raslo sa kombinovanom godišnjom stopom rasta od 6,7 % između 2014. i 2019. godine, što je rezultiralo globalnim tržištem od 109,5 milijardi dolara u 2019. godini. Očekuje se da će globalno tržište dostići 161,2 milijarde dolara u 2025. godini uz godišnju stopu rasta od 9 %. U okviru globalnog tržišta biomaterijala za implantaciju, očekuje se da će sektor polimernih biomaterijala pokazati najveći rast, sa godišnjom stopom rasta od 22,1 %, zbog mogućnosti primene u širokom spektru biomedicinskih aplikacija (BCC Research advanced-materials; PR Newswire).

Veliki broj klasa materijala je obuhvaćen pojmom “biomaterijali”, a neke od njih su: metalni biomaterijali, keramički i staklasti biomaterijali, sintetički nedegradabilni i degradabilni polimeri, kompozitni biomaterijali, bioderivatni polimeri i tkiva, kao i pasivne i bioaktivne prevlake (Tian i dr., 2012). Sintetički polimeri su veoma atraktivni i korisni u oblasti biomaterijala, zbog svoje hemijske strukture i fizičkih svojstava. Pored toga što se mogu spajati sa drugim polimerima, polimerni biomaterijali se mogu kombinovati u sistemima zajedno sa prirodnim materijalima ili neorganskim nanočesticama, radi dobijanja novih, unikatnih, sinergijskih svojstava i bolje primene (Wang i dr., 2011).

Polimerni materijali nalaze primenu u dijagnostici i lečenju bolesti kao što su kancer, kardiovaskularne, cerebrovaskularne i zarazne bolesti. Veliki broj funkcionalizovanih polimera, kao što su micelle, gelovi, kompoziti ili vlakna nalaze biomedicinsku primenu. Regulisanjem strukturnih parametara polimera i njegove morfologije, termičke i hemijske stabilnosti, oblika, dimenzije i mehaničkih svojstava korišćenjem određenih strategija postižu se kontrolisana svojstva polimera za postizanje ciljanih funkcionalnosti koje mogu da zadovolje zahteve specifičnih biomedicinskih aplikacija (Park i dr., 2005; Wang i dr., 2020).

2.2.2. Biorazgradivi polimerni biomaterijali

Da bi bili biorazgradivi, polimeri moraju da sadrže hemijske veze u glavnom polimernom lancu koje se mogu hidrolizovati u biološkim uslovima. Biorazgradivi biomaterijali imaju prednost u odnosu na biostabilne materijale u smislu dugoročne biokompatibilnosti. Istraživanja o primeni biorazgradivih biomaterijala umesto trajnih protetskih uređaja za pomoć u oporavku i regeneraciji tkiva, uz tehnička i etička pitanja koja prate revizijske operacije, u poslednje vreme budi veliko interesovanje (Langer i Vacanti, 1993; Vacanti i Langer, 1999; Dvir i dr., 2011). Zbog toga, biorazgradivi polimerni biomaterijali brzo zamenjuju druge klase materijala, kao što su metali, legure i keramika (Barbucci, 2002; Langer i Vacanti, 1993; Vacanti i Langer, 1999).

S obzirom na složenost ljudskog tela i različitosti pojedinačnih područja primene polimernih biomaterijala, nijedan polimerni sistem se ne može smatrati idealnim biomaterijalom za sve medicinske primene. Biorazgradivi polimerni materijali se primenjuju kao terapijski uređaji, uključujući privremene implantate i trodimenzionalne nosače u inženjerstvu tkiva, ali i za farmakološke primene kao nosači za kontrolisano ili kontinualno oslobađanje leka. Za svaku od namena potrebna su posebna fizičko-hemijska, biološka i degradaciona svojstva materijala. Proučavanja se vrše na širokom spektru prirodnih ili sintetičkih polimera koji mogu da se podvrgnu hidrolitičkoj ili enzimskoj degradaciji za biomedicinske primene (Song i dr., 2018). Stoga su istraživanja u sintezi biorazgradivih biomaterijala usmerena ka razvoju i sintezi polimera sa svojstvima prilagođenim specifičnim biomedicinskim primenama. Trenutni razvoj koji uključuje multifunkcionalne i kombinatorne pristupe u dizajnu ubrzao je inovacije biorazgradivih biomaterijala (Song i dr., 2018).

Svojstvo od suštinskog značaja za biomaterijal je biokompatibilnost - sposobnost materijala da funkcioniše sa odgovarajućim odgovorom domaćina u specifičnoj primeni (Piskin, 1995). Mnoga fizičko-hemijska svojstva materijala uzrokuju odgovor tkiva domaćina na materijal. Na biokompatibilnost materijala utiču molekulska masa, rastvorljivost, hidrofilitnost/hidrofobnost, površinska energija, hemijski sastav materijala, mehanizam degradacije i/ili erozije, mazivost i oblik i struktura (Kohane i Langer, 2008). Važno je napomenuti da je potrebno da biorazgradivi biomaterijali održe adekvatnu biokompatibilnost tokom vremena jer se fizičko-hemijska i mehanička svojstva biorazgradivog biomaterijala vremenom mogu razlikovati i, prema tome, rezultujući proizvodi razgradnje mogu imati različite nivoe kompatibilnosti sa tkivom u poređenju sa početnim materijalom. Idealan biorazgradivi biomaterijal treba da ima proizvode razgradnje koji su netoksični i koji se lako metabolišu i uklanjaju iz tela.

Pored biokompatibilnosti, nekoliko drugih važnih svojstava se mora uzeti u obzir prilikom izbora biorazgradivog biomaterijala. Npr. u inženjerstvu tkiva vreme degradacije biomaterijala treba da se usaglasi sa procesom regeneracije i/ili zarastanja kako bi se obezbedilo pravilno remodelovanje tkiva. Ukoliko se koristi za kontrolisano otpuštanje lekova, biomaterijal mora održavati odgovarajuću permeabilnost tokom perioda primene. Konačno, mehanička svojstva biomaterijala treba da budu adekvatna da ne ometaju normalno funkcionisanje organizma, a ukoliko se koriste u regenerativnoj medicini, poželjno je da biomaterijali podstiču regeneraciju tokom svakodnevne aktivnosti pacijenta, i da svaka promena mehaničkih svojstava biomaterijala usled degradacije treba da zadrži kompatibilnost sa procesom zarastanja ili regeneracije (Song i dr., 2018).

Zbog interesovanja u oblastima koje zahtevaju biorazgradive biomaterijale, uključujući regenerativnu medicinu, inženjerstvo tkiva, kontrolisanu dostavu lekova, gensku terapiju, došlo je do ekspanzije biomedicinske primene sintetičkih biorazgradivih polimera i analognih prirodnih polimera. Iako su neki prirodni polimeri pokazali prednost u smislu podržavanja ćelijske funkcije i adhezije, postoji nekoliko ograničenja u pogledu njihove upotrebe. Na primer, teško je kontrolisati mehanička svojstva i stepen degradacije prirodnih polimera, a prirodni polimeri češće izazivaju imunski odgovor (Lee i dr., 2001; Schmidt i Baier, 2000). Sintetički polimeri se mogu modifikovati da poseduju mnogo širi spektar mehaničkih i hemijskih svojstava od prirodnih polimera. Sintetički polimeri se mogu procesirati pod kontrolisanim uslovima tako da pokazuju predvidiva i ponovljiva mehanička i fizička svojstva kao što su zatezna čvrstoća, modul elastičnosti i brzina degradacije (Seal i dr., 2001). Kod sintetičkih polimera je takođe lakše kontrolisati sastav a time i prisustvo nečistoća u materijalu. Zbog svega navedenog primena čistih sintetičkih polimera sa definisanom strukturom nosi manje rizike u pogledu toksičnosti, imunogenosti i infekcija u odnosu na prirodne polimere (Song i dr., 2018).

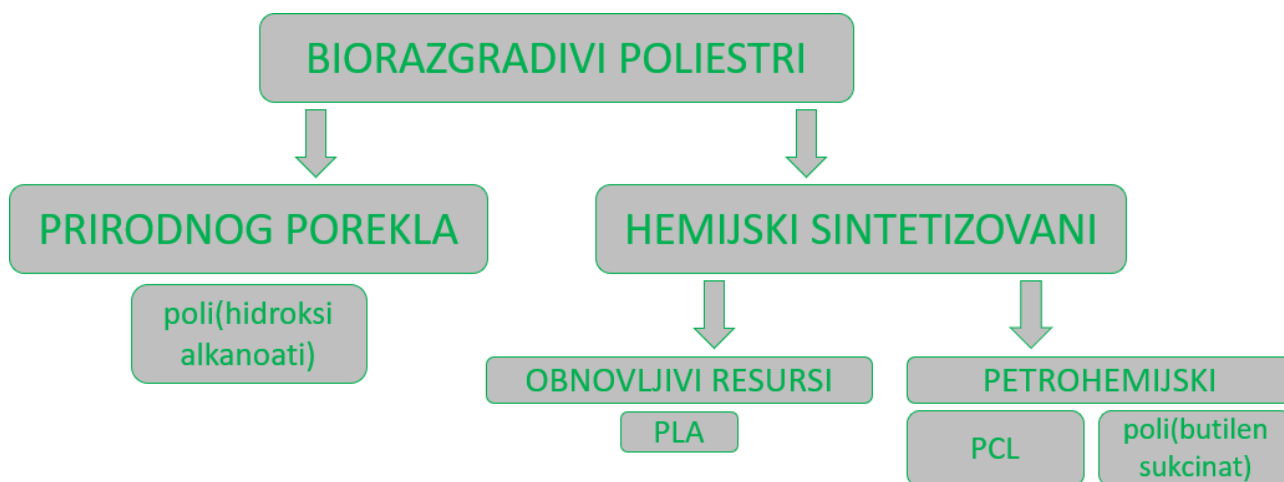
Biomedicinska primena prirodnih polimera datira hiljadama godina unazad (npr. korišćenje pamučnih gaza, koje su sačinjene prvenstveno od celuloznih vlakana), dok je primena sintetičkih biorazgradivih polimera počela tek u drugoj polovini 1960-ih (Barbucci, 2002). Biorazgradivi sintetički polimeri se primenjuju u više kliničkih sistema, uključujući izradu resorptivnih konaca za hiruške šavove, sistemima za kontrolisanu dostavu lekova, ortopedskih fiksacionih uređaja i u inženjerstvu tkiva. Njihova uloga može biti:

- ✓ da zamene tkiva, koja su obolela ili na drugi način postala nefunkcionalna, npr. zamena zgloba, srčanih zalizaka i arterija, rekonstrukcije zuba, očna sočiva;
- ✓ da potpomognu obnovu tkiva, uključujući konce za hiruške šavove, ali i ploče za potporu pri lomu kostiju i implantate za tetive i ligamente;
- ✓ za kontrolisanu dostavu lekova na određena mesta u telu, tj. na ciljana mesta (npr. tkivo tumora ili inficirano tkivo) ili kao sistemi za dostavu leka na duži vremenski period (npr. u slučaju insulina, pilokarpina, kontraceptiva) (Chandra i Rustgi, 1998).

Kao što je već napomenuto, polimeri moraju da sadrže hemijske veze u glavnom polimernom lancu koje se mogu hidrolizovati u biološkim uslovima da bi se definisali kao biorazgradivi. Poliestri su klasa polimera koji sadrže estarske veze koje su podložne hidrolizi. Hidroliza poliestara može se odvijati uz pomoć enzima koje proizvode određeni organizmi; međutim, oni se takođe mogu razgraditi abiotski, barem delimično, bez katalitičkog delovanja enzima spontano, u prisustvu vode. Poliestri koji podležu abiotskoj hidrolizi takođe se nazivaju biorazgradivi, pošto se razgradnja dešava u biološkom okruženju. U slučaju medicinske primene biorazgradivih polimera, takođe je važno da se proizvodi razgradnje polimera potpuno eliminišu iz tela, i u tom slučaju polimer se može smatrati i bioresorbujućim (Li i Vert, 2002).

Analogno klasifikaciji svih polimera postoji klasifikacija biorazgradivih poliestara prema njihovom poreklu pa se razlikuju poliestri prirodnog porekla i hemijski sintetizovani poliestri. Podgrupa hemijski sintetizovanih poliestara sadrži poliestre dobijene iz obnovljivih izvora, kao što je

PLA i one dobijene iz petrohemijskih, kao što je PCL i poli(butilen sukcinat) (slika 2.2.). Hemijski sintetisani poliestri se mogu dobiti na dva osnovna načina: direktnom reakcijom esterifikacije hidroksi kiselina ili dikiselina i diola, ili polimerizacijom otvaranja prstena laktona ili cikličnih diestara.



Slika 2.2. Klasifikacija biorazgradivih poliestara prema poreklu sa odabranim primerima: poli(hidroksi alkanoti); PLA; PCL; poli(butilen sukcinat)

U stvaranju biorazgradivog poliestra neophodno je razumeti i kontrolisati način degradacije. Abiotska hidroliza estarskih veza glavnog lanca obično je karakteristična za proces biorazgradnje alifatičnih poliestara i od primarne je važnosti u medicinskoj primeni. Brzina cepanja poliesterskog lanca može se kontrolisati ili svojstvima materijala ili spoljnim faktorima koji utiču na reakciju hidrolize kao što su pH ili temperatura. Erozijska poliestarskog materijala, kao posledica degradacije, može biti površinska ili zapreminska. Prilikom površinske erozije, poliestri gube svoju masu sa površine, što je praćeno smanjenjem debljine uzorka. Molekulska masa se ne menja pri ovoj vrsti erozije, pošto se oligomeri formirani na površini mogu rastvoriti u spoljašnjem medijumu. Zapreminska erozija se dešava kroz celu masu uzorka, i ne utiče na oblik i veličinu uzorka, dok se molekulska masa smanjuje. Za određene primene, važno je da se erozija polimera odvija na poseban način; a tipičan primer je kontrolisano oslobađanje aktivnih supstanci iz polimerne matrice, za koju je površinska erozija poželjnija. Površinska ili zapreminska erozija su samo dva granična slučaja i na način erozije može uticati niz faktora, kao što su difuzivnost vode i malih oligomera kroz polimernu matricu, morfologija i veličina uzorka i brzina degradacije (Göpferich, 1996; Burkersroda i dr., 2002).

Pored abiotske hidrolize, u biološkoj sredini hidroliza estarske veze može biti enzimski katalizovana. Ekstracelularni enzimi koji katalizuju hidrolitičku degradaciju poliestara su preveliki da bi prodrli u polimerni matriks i njihovo delovanje je ograničeno samo na površinu. Hidrolitičke enzime može proizvoditi domaćin na kom je primenjen biomaterijal ali i mikroorganizmi. Mikroorganizmi vrše razgradnju poliestara na hemijski (dejavom metabolita, npr. promenom pH sredine) ili na enzimski način. U slučaju potpune mikrobiološke razgradnje, polimerni materijal se prvo ekstracelularno fragmentiše na supstance koje mogu ući u ćelije mikroorganizama, gde se konačno metabolišu. Delovanje mikroorganizama zavisi od sastava i strukture polimera i od spoljašnjih uslova, kao što su temperatura, pH i vlažnost (Lucas i dr., 2008).

2.2.3. Alifatični biorazgradivi poliestri

Alifatični poliestri, zbog pogodnih svojstava biorazgradivosti i biokompatibilnosti, predstavljaju jednu od veoma važnih klasa sintetičkih biorazgradivih polimera i danas su komercijalno dostupni u različitim oblicima. Ovi materijali su se primenjivali kao hiruški konci još 1960-ih godina. Poliestri pružaju mnoge mogućnosti u dizajniranju polimera kombinacijama različitih monomera u cilju postizanja svojstava koja zadovoljavaju kriterijume za primenu u biomedicini (Gunatillake i Adhikari, 2003).

Alifatični poliestri su klasa polimera koji sadrže alifatičnu estarsku grupu u svom glavnom lancu i jedna od osnovnih podela ovih poliestara je na poli(α -hidroksi kiseline), poli(ω -hidroksi kiseline), poli(hidroksialkanoate) i poli(alkilen dikarboksilate) (tabela 2.1.). Iz grupe poli(α -hidroksi kiselina) komercijalno su dostupne poli(glikolna kiselina) (PGA) i poli(mlečna kiselina) (PLA). Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) je najzastupljeniji među poli(ω -hidroksi kiselinama) zbog svoje niske temperature topljenja i kompatibilnosti pri mešanju sa drugim polimerima. Poli(hidroksialkanoati) su poliestri koje u prirodi proizvode brojni mikroorganizmi i među glavnim predstavnikom može se smatrati poli(3-hidroksibutirat). Među poli(alkilen dikarboksilatima) komercijalno je dostupan poli(butilensukciat) i predstavlja dobru alternativu konvencionalnim polimerima (Djonlagic i Nikolic, 2011).

Tabela 2.1. Strukturne formule i primeri osnovnih klasa alifatičnih biorazgradivih poliestara

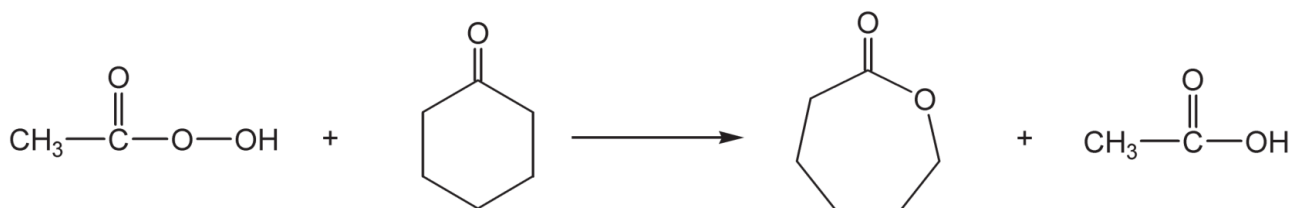
Polimer	Jedinica koja se ponavlja	Primer (Akronim)
poli(α -hidroksi kiselina)	$\left[\text{O}-\overset{\text{R}}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]$	R = H, poli(glikolna kiselina), PGA R = CH ₃ , poli(mlečna kiselina), PLA
poli(ω -hidroksi kiselina)	$\left[\text{O}-\left(\text{CH}_2\right)_x-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]$	x = 3, poli(γ -butirolakton), PBL x = 4, poli(δ -valerolakton), PVL x = 5, poli(ϵ -kaprolakton), PCL
poli(hidroksialkanoat)	$\left[\text{O}-\overset{\text{R}}{\text{CH}}-\left(\text{CH}_2\right)_x-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]$	R = CH ₃ , x = 1, poli(3-hidroksibutirat), P(3HB) R = H, x = 2, poli(4-hidroksibutirat), P(4HB)
poli(alkilen dikarboksilat)	$\left[\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\left(\text{CH}_2\right)_x-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\left(\text{CH}_2\right)_y-\text{O} \right]$	x = 2, y = 2, poli(etilensukciat), PES x = 2, y = 4, poli(butilensukciat), PBS x = 4, y = 4, poli(butilenadipat), PBA

2.2.4. Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL)

PCL, koji se sastoji od heksanoatnih ponavljajućih jedinica, je jedan od najzastupljenijih sintetičkih biorazgradivih alifatičnih poliestara među poli(ω -hidroksi kiselinama) (tabela 2.1). PCL je jedan od najranije sintetizovanih polimera čije dobijanje datira još od ranih 1930-ih godina (Van Natta i dr., 1934). Već 1970-ih i 1980-ih, PCL i njegovi kopolimeri su korišćeni kao sistemi za dostavljanje lekova. Rana primena PCL, posledica je mnogobrojnih prednosti ovog materijala u odnosu na prirodne polimere, poput kontrolisane kinetike degradacije, dobrih mehanička svojstava, lakoće oblikovanja, mogućnosti dobijanja porozne strukture i kontrolisanja otpuštanja lekova iz unutrašnjosti polimerne matrice. Iako je ovaj sintetski polimer inicijalno izazvao interesovanje, vrlo brzo je pažnja preusmena na polimere koji degradiraju u kraćem roku, pa PCL kao biomaterijal ponovo dobija na aktuelnosti tek sa razvojem nanotehnologija. Dobra rastvorljivost PCL, njegova niska temperatura topljenja i izuzetna kompatibilnost pri mešanju sa drugim polimerima su zaslužni za ponovnu aktuelizaciju primene PCL u medicinske svrhe (Chandra i Rustgi, 1998; Okada, 2002; Nair i Laurencin, 2007).

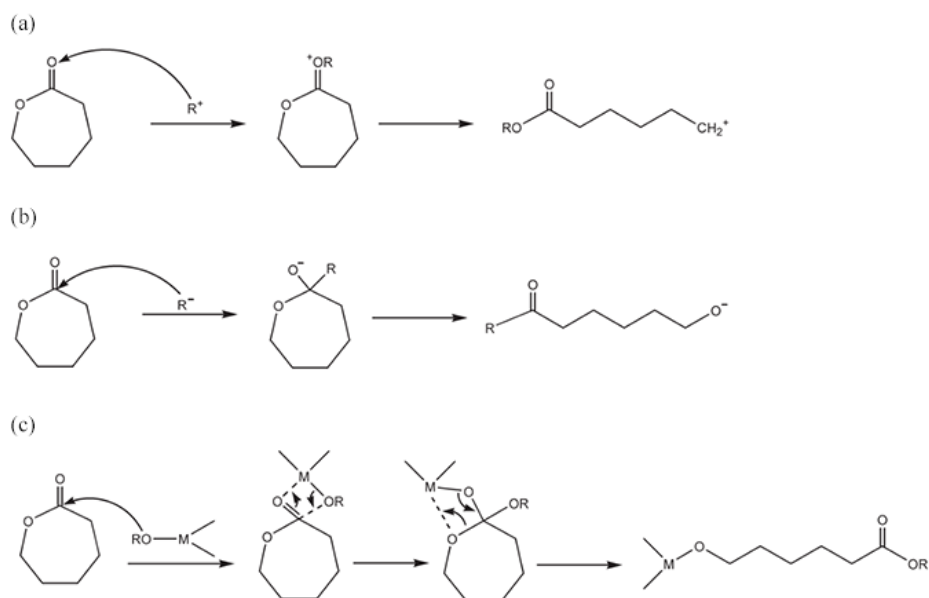
2.2.4.1. Sinteza PCL

PCL se uglavnom proizvodi polimerizacijom otvaranja prstena (eng. *Ring-opening polymerization*, ROP) cikličnog monomera ϵ -kaprolaktona. Ovaj monomer se proizvodi oksidacijom cikloheksanona sa persirćetnom kiselinom (slika 2.3.).



Slika 2.3. Sinteza ϵ -kaprolaktona iz cikloheksanona (preuzeto iz Djonlagic i Nikolic, 2011)

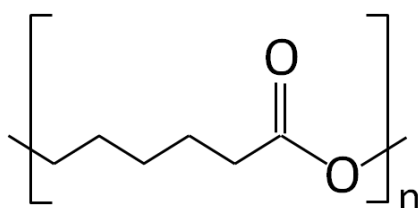
U zavisnosti od korišćenog sistema inicijator/katalizator, polimerizacija otvaranja prstena ϵ -kaprolaktona može da se odvija preko katjonskih, anjonskih ili koordinaciono-insercionih mehanizama (slika 2.4.) (Stridsberg i dr., 2002). PCL se može sintetizovati i polikondenzacijom odgovarajuće hidroksi kiseline: 6-hidroksikaproična (6-hidroksiheksanska) kiselina. Međutim, ovaj metod sinteze je manje istražen za proizvodnju PCL zbog svih nedostataka svojstvenih direktnoj reakciji polikondenzacije.



Slika 2.4. Polimerizacija otvaranja prstena ϵ -kaprolaktona preko (a) katjonskih, (b) anjonskih ili (c) koordinaciono-insercionih mehanizama (preuzeto iz Djonlagic i Nikolic, 2011)

2.2.4.2. Svojstva i degradacija PCL

Hemijska formula PCL je $(C_6H_{10}O_2)_n$ a gustina $1,145 \text{ g/cm}^3$. IUPAC ime mu je (1,7)-polioksepan-2-on, dok je strukturna formula prikazana na slici 2.5.



Slika 2.5. Strukturna formula PCL

PCL je hidrofoban, polukristalni polimer sa temperaturom topljenja u opsegu $59\text{-}64 \text{ }^\circ\text{C}$. Stepennost kristaliničnosti se povećava sa smanjenjem molekulske mase i može dostići 80 % za PCL molekulske mase od 5.000 g/mol , i 40 % za PCL sa molekulskom masom od 100.000 g/mol . Temperatura staklastog prelaza PCL je znatno ispod sobne temperature i iznosi oko $-60 \text{ }^\circ\text{C}$. PCL ima nisku zateznu čvrstoću, ispod 20 MPa , ali izuzetno veliko izduženje pri lomu, koje može biti i do 1000 % (Nair i Laurencin, 2007; Labet i Thielemans, 2009). Veoma važno svojstvo PCL je njegova sposobnost da formira blende sa nizom drugih polimera. Blende PCL sa drugim biorazgradivim polimerima, kao što su PLA, poli(D,L-laktid-ko-glikolid) (PLGA) i skrob, su ispitivane u cilju boljeg kontrolisanja brzine razgradnje ili poboljšanja performansi materijala (Avérous, 2004; Pitt, 1990). U blendama sa nerazgradivim polimerima, kao što je poli(vinil-hlorid), hlorovani polietilen i bisfenol A polikarbonat, PCL služi uglavnom kao plastifikator (Pitt, 1990). PCL je rastvorljiv u hloroformu, dihlormetanu, ugljen-tetrahloridu, benzenu, toluenu, cikloheksanonu i 2-nitropropanu. Slabo je rastvorljiv u acetonu, 2-butanonu, etilacetatu, dimetilformamidu i acetonitrilu i nerastvorljiv je u alkoholima, petroletru i dietil etru.

PCL je sklon abiotskoj hidrolitičkoj degradaciji, međutim, pri mnogo sporijoj stopi razgradnje u poređenju sa PLA i PGA. Zbog svoje spore degradacije *in vivo*, u poređenju sa drugim poliestrima, PCL je pogodniji za dugotrajne implantate (Woodruff i Huttmacher, 2010). Mehanizam hidrolitičke

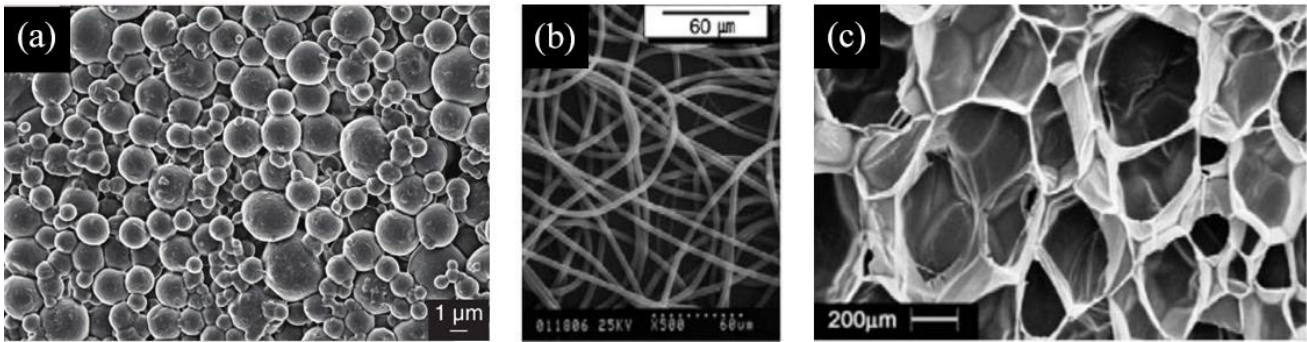
degradacije odvija se nasumičnim cepanjem estarske veze. To je masovni proces praćen smanjenjem molekulske mase tokom hidrolize i brzina kojom se smanjuje molekulska masa je nezavisna od oblika uzorka (odnos površina/zapremina) (Pitt, 1990; Chen i dr., 2000). Hidrolizu estarskih veza autokatalizuju krajnje karboksilne grupe (Antheunis i dr., 2010; Antheunis i dr., 2009). Degradacija počinje u amorfnim delovima i kristaliničnost se povećava tokom razgradnje. Unakrsno povezivanje, koje smanjuje kristaliničnost, olakšava abiotsku hidrolitičku degradaciju, zbog lakšeg prodiranja vode u amorfnu fazu (Höglund i dr., 2007). Na brzinu hidrolize utiču pH i temperatura, a hidroliza je brža u baznim rastvorima i na povišenim temperaturama (Ye i dr., 1997). Dugotrajna istraživanja hidrolitičke degradacije PCL filmova u fluidima koji podsećaju na biološke medijume, kao što je modifikovani Eagle medijum, pokazali su da se razgradnja PCL odvija brže u takvim medijumima u poređenju sa hidrolizom u rastvoru fosfatnog pufera (Pena i dr., 2006).

PCL je sklon razgradnji i u prisustvu enzima, posebno enzima iz grupe lipaza (Li i Vert, 2002; Tokiwa i Suzuki, 1977). Enzimski hidrolitička degradacija PCL je ispitivana za niz lipaza, i pokazano je da lipaze iz bakterija roda *Pseudomonas* i gljivica *Rhizopus arrhizus* i *Rhizopus delemere* značajno povećavaju stopu hidrolitičke degradacije ovog poliestra (Li i dr., 2003; Iwamoto i Tokiwa, 1994; Antipova i dr., 2018). Na razgradnju PCL lipazama utiče niz faktora, kao što su molekulska masa i kristaliničnost PCL, kao i veličina i poroznost uzorka (Tsuji i Ishizaka, 2001; Mochizuki i dr., 1995). Pošto se erozija polimera u enzimskoj degradaciji odvija na površini uzorka, oblik i veličina uzorka utiču na brzinu enzimske degradacije (Funabashi i dr., 2007). Enzimski katalizovana degradacija, kao površinski proces, se usporava pri unakrsnom povezivanju polimera jer formirane mrežne strukture smanjuju pristup enzima polimeru (Darwis i dr., 1998).

PCL sa prosečnom molekulskom masom od 50.000 g/mol potrebno je oko tri godine za potpunu degradaciju *in vitro* (Gunatillake i Adhikari, 2003). Razgradnja PCL *in vivo* se u najvećoj meri odvija abiotskom hidrolizom estarskih grupa koja je praćena smanjenjem molekulske mase. Istraživanja PCL nosača su pokazala da degradaciona putanja, pod *in vitro* simuliranim fiziološkim uslovima i *in vivo*, prati opšti trend zapreminske hemijske degradacije (Lam i dr., 2009; Lam i dr., 2008). U ranim fazama degradacije ne dolazi do gubitka mase, što, zajedno sa smanjenjem molekulske mase, ukazuje na zapreminsku, a ne na površinsku eroziju. U drugoj fazi degradacije PCL dolazi do gubitka mase, što je praćeno usporavanjem smanjenja molekulske mase (brzina kidanja lanca) zbog povećane kristaliničnosti uzorka (Pitt, 1990). Kada molekulska masa PCL padne na oko 3.000 g/mol, mali komadi PCL mogu biti intracelularno degradirani u fagozomima makrofaga, džinovskim imunskim ćelijama ili fibroblastima za manje od 13 dana na nekim mestima implantata (Woodward i dr., 1985). Jedini metabolit koji nastaje od PLC usled fagocitoze pored vode je 6-hidroksikaproična kiselina. Proizvod hidrolize PCL, 6-hidroksikaproična kiselina može ući u ciklus limunske kiseline i biti potpuno metabolisan. Studije su pokazale da se proizvodi hidrolize PCL potpuno metabolišu i PCL se ne akumulira ni u jednom organu u telu (Sun i dr., 2006).

2.2.4.3. PCL u nanotehnologiji

PCL poseduje odlična reološka i viskoelastična svojstva u odnosu na ostale resorptivne polimere, što ga čini pogodnim za proizvodnju nanomaterijala različitih namena (Luciani i dr., 2008; Lee i dr., 2003; Marrazzo i dr., 2008; Huang i dr., 2007; Zein i dr., 2002). Najčešće primenjivane forme PCL u nanotehnologiji uključuju nanosfere, nanovlakna i nanopene (slika 2.6.).



Slika 2.6. Različite strukture od PCL: (a) nanosfere, (b) nanovlakna i (c) pene (adaptirano iz Tshweu i dr., 2014; Woodruff i Hutmacher, 2010)

Nanosfere su uniformne sferne strukture u rasponu veličine od 10 do 1000 nm namenjene za isporuku lekova (McMillan i dr., 2011). Čestice leka mogu biti enkapsulirane u nanosferama, dispergovane ili apsorbirane na nanosferama. Veličina nanosfera omogućava im da se primenjuju intravenozno putem injekcije, za razliku od mnogih drugih koloidnih sistema, koji začepljuju i igle i kapilare. Sistem nanočestica ima značajnu prednost prilikom isporuke lekova jer može povećati terapijski indeks pomoću nekoliko mehanizama kao što su produženo oslobađanje leka, povećanje njegove stabilnosti u biološkoj sredini, poboljšanje ćelijske i tkivne apsorpcije i smanjenje ukupne toksičnosti (Woodruff i Hutmacher, 2010). Istraživanja su pokazala da se različiti lekovi ali i enzimi, odnosno više klasa bioaktivnih molekula mogu inkapsulirati u PCL nanosfere i koristiti u različitim medicinskim aplikacijama (Singh i dr., 2013; Łukasiewicz i dr., 2021).

Nanovlakna su čvrsta vlakna prečnika od nekoliko nanometara do 1000 nm (Rošic i dr., 2013) i poseduju jedinstvene karakteristike, kao što su velika specifična površina u odnosu na zapreminu, visoka poroznost, odlična strukturna mehanička svojstva, ekstremna fleksibilnost i ekonomičnost, između ostalog (Son i dr., 2014). Mogu se dobiti različitim metodama procesiranja, pri čemu je elektropredenje najzastupljenija metoda za procesiranje netkanih nanovlaknastih matova (Kajdič i dr., 2019). Nanovlakna pružaju velike mogućnosti za dobijanje materijala sa novim svojstvima kroz različite fizičke i hemijske modifikacije tokom ili nakon procesiranja. Različitim metodama elektropredenja, moguće je procesirati nanovlakna željenih karakteristika (Madhaiyan i dr., 2013). Nanovlakna predstavljaju jedan od obećavajućih nanomaterijala za brojne primene u biomedicini, pri čemu su već pokazali značajnu primenljivost u oblasti tkivnog inženjerstva, zarastanja rana kao i isporuke lekova putem transdermalnih flastera za isporuku lekova, stentova, ali i kao zamena za krvne sudove (Madhaiyan i dr., 2013).

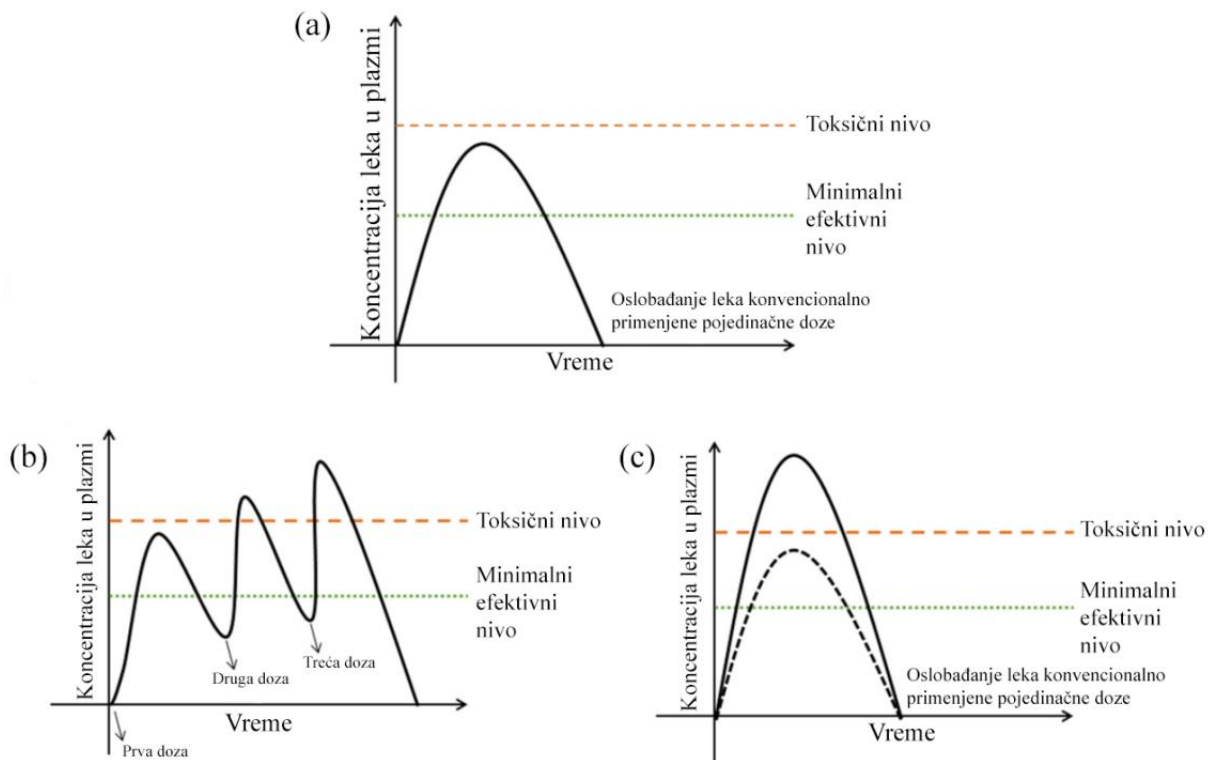
Pene se široko koriste u mnogim inženjerskim aplikacijama, kao što su medicinski uređaji, elektronika, biotehnologija, pakovanje itd. (Wang i dr., 2015). U zavisnosti od tehnike pravljenja pena može se odrediti ponašanje pene i, konačno, uticati na karakteristike strukture, kao što su poroznost, prosečni prečnik, oblik pora i međusobna povezanost između njih. Ispitano je pravljenje PCL pena pod nadkritičnim uslovima pri čemu je proučen uticaj parametara procesa (pritisak i temperatura) na konačnu morfologiju uzoraka. Formiranje PCL pena variranjem operativnih parametara tokom procesiranja može se optimizovati kako bi se dobile polimerne pene sa željenim morfološkim karakteristikama koje su pogodne za specifične biomedicinske aplikacije (Baldino i dr., 2020). Ispitane su i pene na bazi PLA-PCL pogodne za primenu kao skafoldi u inženjerstvu tkiva (Lv i dr., 2018; Sartore i dr., 2019).

2.3. Sistemi za isporuku lekova

Sistem za isporuku leka omogućava oslobađanje aktivnog farmaceutskog sastojka da bi se unapredio terapijski odgovor. Kod konvencionalnih sistema za isporuku lekova (tablete, kapsule, sirupi, masti, kreme itd.) ne može da se ostvari produženo oslobađanje aktivne supstance a ograničena je mogućnost isporuke aktivne supstance definisanim delovima tela. Bez efikasnog mehanizma isporuke, ceo terapijski proces može biti kompromitovan. Teorijski, proces se unapređuje ukoliko se lek isporuči kontrolisano (određenom kontrolisanom brzinom) i na ciljano mesto. Ovakvom isporukom postiže se maksimalna efikasnost i bezbednost. Sistemi sa kontrolisanom isporukom lekova razvijeni su kako bi se rešili problemi vezani za konvencionalnu isporuku lekova. U poslednje dve decenije došlo je do značajnog napretka u sistemima sa kontrolisanom isporukom lekova, od makro i nano skale do ciljane isporuke na mesto aplikacije (Adepu i Ramakrishna, 2021).

Lek je supstanca (priznata u zvaničnoj farmakopeji) namenjena za upotrebu u lečenju, ublažavanju ili prevenciji bolesti. Isporuka leka je tehnika isporuke leka pacijentu na takav način da naročito povećava koncentraciju leka u nekim delovima tela u poređenju sa drugim (Langer, 1998). Krajnji cilj bilo kog sistema za isporuku je da produži, ograniči i usmeri lek u obolelo tkivo uz zaštićenu interakciju. Čest problem vezan za konvencionalne sisteme za isporuku leka *per os* (tablete, kapsule, sirupi, itd.) je da se lek brzo eliminiše iz tela, što za posledicu može da ima situaciju da se doza ne održava u okviru terapijskog okvira. Nakon uzimanja jedne konvencionalne doze, ukoliko se lek brzo metaboliše, koncentracija leka je nakon isporuke visoka, ali je praćena eksponencijalnim smanjenjem. Vremenski okvir izloženosti leku može da bude nedovoljan da proizvede značajan terapijski efekat što dovodi do subterapijskog odgovora (Adepu i Ramakrishna, 2021). Takođe, isporukom leka konvencionalnim sistemima isporuke, lek ulazi i u zdrava tkiva gde njegovo dejstvo nije potrebno. Na primer, upotreba antibiotika ako se isporučuje *per os*, vodi ka stvaranju rezistencije jer su bakterije ljudskog tela, npr. crevne mikrobiote, izložene antibiotiku kojim se leči infekcija.

Slika 2.7. ilustruje fluktuacije farmakokinetičke krive koncentracije leka u sistemske cirkulaciji (krvnoj plazmi) do kojih dolazi pri konvencionalnoj isporuci leka *per os*. Postoje različiti pristupi isporuci leka sa ciljem da se koncentracija leka u krvnoj plazmi održava iznad minimalne efektivne koncentracije i ispod toksične koncentracije. Primena više doza u redovnim vremenskim intervalima je alternativa primeni jedne doze, koja dovodi do fluktuacija nivoa leka u krvnoj plazmi i često pada ispod efektivnih nivoa (slika 2.7. (a) i (b)). Isporuka povećane jedne konvencionalne doze može povećati sistemske koncentracije leka iznad toksičnih nivoa (slika 2.7. (c)).

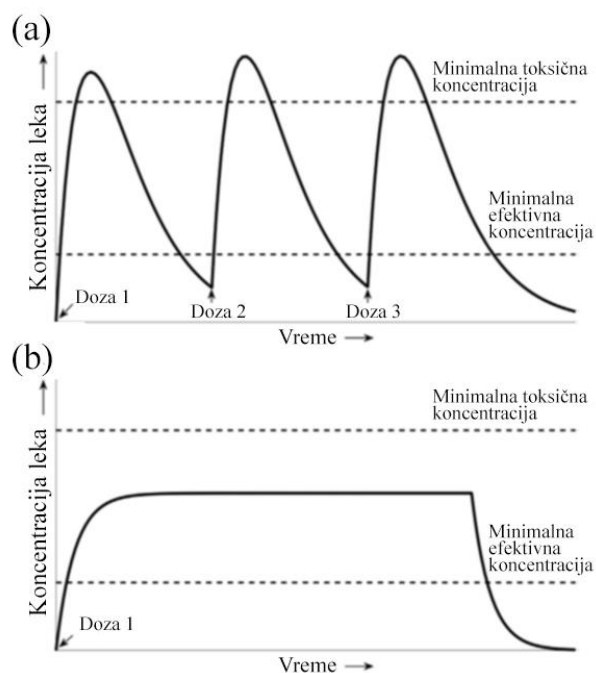


Slika 2.7. Nepovoljni profili koncentracije leka u krvnoj plazmi sa vremenom do kojih može doći primenom konvencionalnih isporuka leka i to nakon primene: (a) pojedinačne konvencionalne doze, (b) višestruke doze i (c) povećane pojedinačne doze (adaptirano iz Adepu i Ramakrishna, 2021)

Sistem sa kontrolisanom isporukom leka je alternativa koja može da omogući konstantnu koncentraciju leka unutar terapijskog okvira u željenom delu tela (Hardenia i dr., 2019). Adekvatnom isporukom lekovite supstance smanjuje se vreme i povećava efikasnost procesa lečenja.

2.3.1. Sistem sa kontrolisanom isporukom lekova

Sistem za isporuku leka pomoću koga se održava konstantan nivo leka u krvi ili tkivu tokom dužeg perioda se smatra sistemom za kontrolisanu isporuku. Farmakokinetičke krive koncentracije leka u krvnoj plazmi u zavisnosti od vremena za dva tipa sistema isporuke, konvencionalnog i kontrolisanog, predstavljene su na slici 2.8. U konvencionalnom sistemu isporuke, postoji doziranje posebne količine oralnih tableta ili injekcija u određenom vremenu da bi se koncentracija leka u krvnoj plazmi podigla na efikasan nivo, pri čemu nivo leka fluktuiira iznad i ispod minimalne efektivne koncentracije. Sistem kontrolisane isporuke, s druge strane, pokazuje farmakokinetičku krivu nultog reda sa samo jednom dozom kontrolisane isporuke leka iz određene formulacije. Teorijski, nivoi leka se konstantno održavaju unutar terapijskog okvira (Park, 2014).



Slika 2.8. Doziranje leka za: (a) konvencionalni sistem za isporuku lekova i (b) sistem sa kontrolisanom isporukom lekova (adaptirano iz Adepu i Ramakrishna, 2021)

Ukoliko je brzina metabolisanja leka usaglašena sa brzinom oslobađanja leka iz sistema, sistem sa kontrolisanom isporukom leka omogućava održavanje konstantnog nivoa leka u krvnoj plazmi ili tkivu. Sistemi za kontrolisanu isporuku omogućavaju da se smanji ukupna doza leka i učestalost isporuke terapije, što povoljno utiče na lagodnost osećaja pacijenata. Manja koncentracija leka u biološkoj sredini smanjuje toksičnost leka i neželjene efekte, dok je ukupna efikasnost lečenja povećana (Hardenia i dr., 2019). Neke od navedenih prednosti sistema sa kontrolisanom isporukom lekova su šematski predstavljene na slici 2.9.



Slika 2.9. Prednosti sistema sa kontrolisanom isporukom lekova

Nanovlakna kao nosači lekovite supstance predstavljaju jedan od potencijalnih sistema sa kontrolisanom isporukom lekova koji se intenzivno proučavaju u oblasti medicine. Prednost ovakvih sistema jeste mogućnost dostave visoko kontrolisanih doza lekova na tačnu lokaciju neophodne aplikacije. Istraživači širom sveta su, između ostalog, proučavali nanovlakna kao sredstvo za

transdermalnu isporuku različitih terapijskih agensa. Transdermalni put dostave terapijskih agensa je poželjniji u odnosu na oralni put zbog različitih prednosti kao što su neinvazivnost i visoka lagodnost osećaja pacijenata. Ipak, tehnički je dosta zahtevno razvijanje sistema nosača koji omogućava efikasan prolazak leka kroz dermalnu barijeru. Nanovlakna kao transdermalni sistemi sa kontrolisanom isporukom lekova su dizajnirana da u sebi imaju visoku koncentraciju terapijskih agensa koji promoviraju njihov protok kroz različite slojeve kože pri čemu je moguće kontrolisati brzinu oslobađanja terapijskih agensa na duže vreme. Različite vrste lekova kao što su antibiotici ili antimikrobni lekovi, antifungalni lekovi, anti-inflamatorni lekovi ili lekovi protiv kancera, mogu se isporučivati transdermalnim putem pomoću nanovlakana. Iako polimerna nanovlakna imaju ogroman potencijal za primenu u transdermalnoj isporuci lekova, sva dosadašnja istraživanja dostupna u literaturi opisuju ili *in-vitro* ili *in-vivo* (na različitim životinjskim modelima) efikasnost transdermalnih nanovlakana. Klinička evaluacija nanovlakana kao sistema za transdermalnu isporuku i dalje predstavlja izazov (Kumar i dr., 2021).

Infekcija kožnih rana može biti odgovorna za produženo trajanje zarastanja rana, duži period hospitalizacije, pa čak i smrt pacijenata (Thakkar i Misra, 2017). Infekcije kože mogu se efikasno lečiti upotrebom antibiotika/antimikrobnih lekova koji se primenjuju lokalno. Pored konvencionalnih antibiotskih masti i krema istraživanja su ukazala na mogućnost upotrebe nanovlakana u ove svrhe. Tako je inkorporiranjem antibiotika cefadroksil monohidrata u hitozan/poli(vinil alkohol) nanovlakna postignuta visoka *in vitro* antimikrobna aktivnost prema *S. aureus* sa niskom toksičnošću na epidermalne keratinocite (Iqbal i dr., 2020). Visoka efikasnost nanovlakana kao transdermalnih sistema za lokalnu dostavu lekova i lečenje rana kod zečeva, pokazana je u slučaju inkorporiranja antibiotika ciprofloksacina u polivinil alkohol i natrijum alginatna nanovlakna (Kataria i dr., 2014).

Generalno, nanovlakna su vrlo atraktivna u istraživanjima kao sredstva za kontrolisanu dostavu lekova jer ovaj metod dostave uglavnom uključuje lokalnu primenu i može sprečiti nespecifičnu isporuku u tkiva koja nisu ciljana lekom. S tim u vezi, u ovoj dokorskoj disertaciji procesirana su PCL nanovlakna kao nosači lekovitih supstanci sa ciljanom dostavom, namenjena za oblaganje komercijalno dostupnih katetera. Ovi sistemi su razvijeni sa ciljem da spreče infekcije i potencijalno ubrzaju zarastanje mikro oštećenja tkiva koja mogu nastati prilikom kateterizacije urinarnog trakta.

2.3.1.1. Klasifikacija sistema za isporuku lekova sa kontrolisanim oslobađanjem

Sistemi za isporuku leka sa kontrolisanim oslobađanjem se klasifikuju na osnovu mehanizma oslobađanja leka iz doznog oblika u sisteme sa kontrolisanim rastvaranjem, kontrolisanom difuzijom, kontrolisanim prodiranjem vode (kontrolisanim osmotskim pritiskom i kontrolisanim bubrenjem) i hemijski kontrolisane sisteme (Gupta i dr., 2010).

U sistemima za oslobađanje sa kontrolisanim rastvaranjem, lekovi su ili obloženi polimernom membranom (sistemi rezervoara) ili inkapsulirani u matrici (monolitni sistemi) koje se sporo rastvaraju. U sistemima rezervoara, lekovi su zaštićeni unutar polimernih membrana sa malom rastvorljivošću. Korišćenjem ovog sistema, oslobađanje leka je određeno debljinom i brzinom rastvaranja polimerne membrane koja okružuje jezgro leka. U monolitnim sistemima, lek je homogeno raspoređen kroz polimernu matricu. Kako se polimerna matrica rastvara (obično putem erozije), molekuli leka se oslobađaju u spoljašnju sredinu (Adepu i Ramakrishna, 2021).

U sistemima za oslobađanje koji su kontrolisani difuzijom, lekovi takođe mogu biti zarobljeni u matrici inertne polimerne membrane (sistemi rezervoara) ili polimerne matrice (monolitni sistemi) i oslobađaju se difuzijom. Oslobađanje leka je regulisano Fikovim zakonima difuzije (Siepmann i dr., 2012; Siepmann J. i Siepmann F., 2012). U sistemima kontrolisanim membranom, lek se nalazi u jezgru kao rezervoar i prekriven je tankom polimernom membranom. Oslobađanje lekova se odvija difuzijom kroz membranu a brzina oslobađanja je regulisana debljinom membrane, poroznošću i fizičko-hemijskim karakteristikama lekova. Sistemi za isporuku tipa rezervoara se proizvode

korišćenjem nebiorazgradivih polimera, što omogućava sporu difuziju leka iz sistema. Uobičajene metode za proizvodnju sistema rezervoara kontrolisanih membranom uključuju inkapsulaciju i oblaganje tableta. U monolitnim ili matriksom kontrolisanim sistemima za isporuku, lek se ili rastvori ili disperguje homogeno kroz polimernu matricu. Sloj polimerne matrice upija medijum za rastvaranje, pri čemu se lek rastvara i difunduje iz sistema (Siepmann i dr., 2012).

Sistemi sa kontrolisanim prodiranjem vode se dele na sisteme za isporuku lekova kontrolisanih osmotskim pritiskom i sistemi za isporuku leka sa kontrolisanim bubrenjem. Kontrola brzine isporuke leka svakako zavisi od brzine prodiranja vode u sistem (Patil i dr., 2018; Siepmann J. i Siepmann F., 2012). Kod sistema za isporuku lekova koji su kontrolisani osmotskim pritiskom isporuka leka je regulisana razlikom u osmotskom pritisku u sistemu za isporuku i okolnom tkivu. Kada sistem dođe u kontakt sa vodenim okruženjem, voda difunduje u jezgro sistema kroz polupropusnu membranu. Komponenta rastvorljiva u vodi se rastvara u sistemu i nastaje gradijent osmotskog pritiska zbog kog se lek transportuje kroz fine perforacije na polimernom materijalu sistema za kontrolisanu dostavu leka. U sistemima za isporuku leka sa kontrolisanim bubrenjem, lek se disperguje ili rastvara u hidrofилnom polimeru kada je u staklastom (tvrdom i krutom) stanju. U vodenom rastvoru, voda prodire u matriks i temperatura staklastog prelaza polimera se snižava ispod temperature okoline. Ovo dovodi do bubrenja i gumolikog stanja matriksa, što rezultira sporom difuzijom leka iz nabubrele gumene polimerne matrice.

Hemijski kontrolisani sistemi za isporuku lekova menjaju svoju hemijsku strukturu kada su izloženi biološkom medijumu. Oni su napravljeni od biorazgradivih polimera koji se razgrađuju u telu kao rezultat prirodnih bioloških procesa, eliminišući potrebu za uklanjanjem sistema za isporuku nakon isporučenog aktivnog agensa iz sistema. Oni su klasifikovani u dva tipa: sistem disperzije polimer-lek i sistem konjugata polimer-lek. U sistemima disperzije polimer-lek, lek je homogeno dispergovan ili rastvoren u biorazgradivom polimeru i oslobađa se degradacijom polimera u fiziološkim uslovima. Postoje dve vrste biodegradacije: zapreminska erozija, koja nastaje zapreminskom razgradnjom polimera i površinska erozija koja je posledica razgradnje polimera sa površine ili rastvaranja polimera sa površine. Različiti faktori koji utiču na degradaciju uključuju hemijsku strukturu i sastav, konfiguraciju i molekulsku masu polimera (Kopeček, 2013). U sistemima konjugata polimer-lek, lek je vezan sa polimerom hemijskim (npr. kovalentnim) vezama ili adsorbovan na površinu polimera. Lek se oslobađa usled raskidanja veza polimer-lek u fiziološkim uslovima.

2.3.2. Biomaterijali kao nanonosai u kontrolisanoj isporuci lekova

Biomaterijali u sistemima za isporuku lekova omogućavaju da se podešava farmakokinetika leka. Biomaterijal je materijal koji je napravljen za interakciju sa biološkim sistemima i može se koristiti u medicinske svrhe, bilo terapijske ili dijagnostičke. Izbor polimera ili biomaterijala igra važnu ulogu u dizajniranju sistema za dostavu lekova sa definisanim fizičko-hemijskim svojstvima i profilima oslobađanja leka. Različiti tipovi biomaterijala kao što su polimeri, polisaharidi, proteini, peptidi i lipidi se koriste u sistemima za dostavu lekova. Biomaterijal treba da bude biokompatibilan, biorazgradiv, netoksičan i zadovoljavajućih mehaničkih svojstava. U kontrolisanoj isporuci lekova se koriste i nerazgradivi i biorazgradivi biomaterijali, pri čemu su poželjniji biorazgradivi polimeri, pošto se svojom razgradnjom uklanjaju iz tela, čime se sprečava eventualno nakupljanje toksičnih materija (Fenton i dr., 2018).

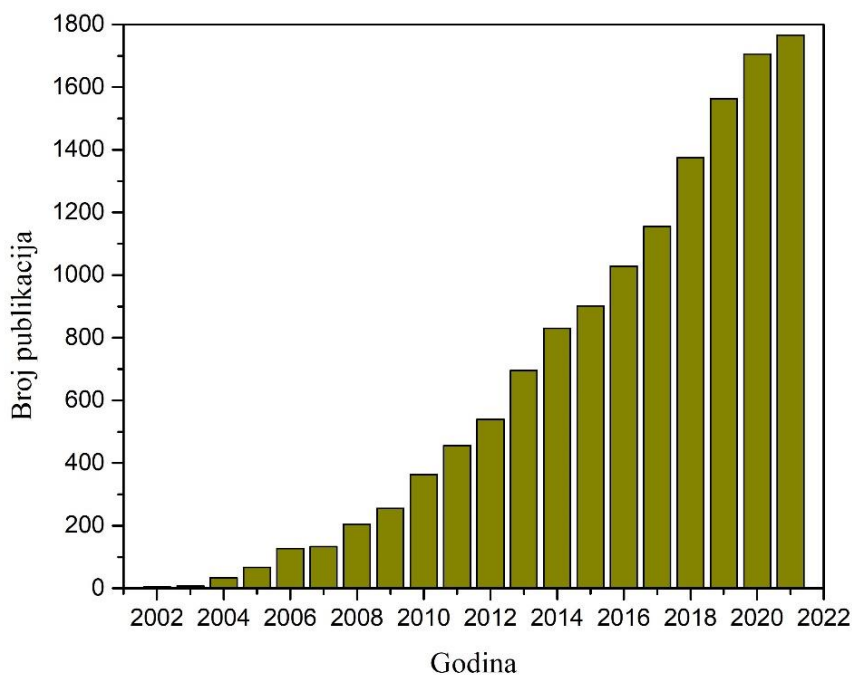
Postoje različiti nosai lekova čije su dimenzije na nano nivou tzv. nanonosai, a koji se koriste u sistemima za kontrolisanu isporuku lekova. Nanonosai lekova uključuju liposome, dendrimere, nanočestice, nanosfere ili nanokapsule, nanotube i nanovlakna koja su u fokusu ove doktorske disertacije.

Nanovlakna su čvrsta vlakna prečnika od nekoliko nanometara do 1000 nm koja imaju veći odnos površine prema zapremini što ih čini dobrim kandidatom za nosače lekova (Rošic i dr., 2013).

Svojstva nanovlakana, poput prečnika, morfologije i poroznosti, mogu se podešavati tokom procesiranja, kako bi se dobio širok spektar kinetike oslobađanja leka (Kajdič i dr., 2019). Sistemi za isporuku lekova zasnovani na nanovlaknima su široko primenljivi za specifično oslobađanje leka, u skladu sa ciljanom lokacijom i vremenom, kako bi se postigli željeni terapijski efekti. Visoka efikasnost punjenja lekom i prostorna distribucija lekova mogu se postići korišćenjem nanovlakana kao sistema za isporuku lekova (Zare i Ramakrishna, 2020). Nanovlakna dizajnirana za trenutno oslobađanje leka imaju generalno jednostavne strukture. Odgovarajući polimer, veliki odnos površine i zapremine i visoka poroznost nanovlaknastih matova se koriste da bi se postiglo trenutno oslobađanje leka. Oslobađanje leka iz nanovlakana može se modifikovati kako bi bilo produženo, aktivirano stimulacijom ili dvofazno (Torres-Martinez i dr., 2018). Uglavnom se za modifikovanje oslobađanja leka koriste biorazgradivi ili polimeri koji bubre. Fizičko-hemijska svojstva polimera, parametri procesa i uslovi medijuma mogu značajno uticati na kinetiku oslobađanja leka iz nanovlakana. Formulacija nanovlakana je veoma složena i podložna je mnogim varijablama, dok u isto vreme pomaže da se postigne željena kinetika oslobađanja leka na ciljanom mestu (Kajdič i dr., 2019). Nanovlakna se mogu procesirati metodom elektropredenja pri čemu se može podešavati struktura i morfologija nanovlakana (Adepu i dr., 2017).

2.4. Geneza i razvoj elektropredenja kao metode procesiranja nanovlakana

Džon Kuli (John Francis Cooley), prvi autor patenata o elektropredenju, prijavio je tri patenta 1900., 1902. i 1903. godine (Tucker i dr., 2012). Vilijam Morton (William James Morton) je opisao i 1902. godine patentirao metodu pripreme vlakana koja se mogu koristiti u tekstilnoj industriji ili u druge svrhe (Morton, 1902). Godine 1934. Antonin Formhals (Antonin Formhals) je izumeo postupak za izradu tekstilnih vlakana od celuloznog acetata (Formhals, 1934). U narednih nekoliko godina Formhals dalje unapređuje oblast elektropredenja, uvodeći postupak pripreme vlakana uvlačenjem rastvora za predenje kroz mlaznicu korišćenjem visokog napona električne struje (Formhals, 1937). Ovim postupkom omogućen je uticaj na dužinu nanovlakna, a time i proces pripreme kontinualnog vlakna i postupak pripreme kompozitnog vlakna (Formhals, 1940). Godine 1936. Čarls Norton (Charles L. Norton) je izumeo proces predenja iz rastopa uz pomoć električne struje i strujanja vazduha za proizvodnju vlakana iz viskoznog rastvora (Norton, 1936). Godine 1952. Džefri Tejlor (Geoffrey Ingram Taylor) je 1964. predložio matematičko modelovanje kapljice tečnosti oblika konusa koja nastaje tokom procesa elektropredenja pri uticaju električnog polja (Taylor, 1964) i 1969. godine ispitaio oblik polimerne kapljice koja se formira tokom procesa elektropredenja na vrhu igle uređaja (Taylor, 1969). Piter Baumgarten (Peter K. Baumgarten) je 1971. godine osmislio postupak proizvodnje akrilnih vlakana elektropredenjem rastvora akrilne smole u dimetilformamidu (Baumgarten, 1971). Godine 1987. pokazano je da provodljivost tečnosti u kojoj je rastvoren polimer značajno utiče na postupak elektropredenja jer se relativno stabilan mlaz dobija korišćenjem poluprovodnih i izolatorskih tečnosti u odnosu na visoko provodne tečnosti (Hayati i dr., 1987). Na osnovu ovih saznanja definisani su postupci za izvođenje procesa elektropredenja koje se od kraja 20. veka primenjuje u istraživanjima kao jednostavna i atraktivna metoda za procesiranje nanovlakana. Danas veliki broj univerziteta i istraživačkih instituta širom sveta proučava proces elektropredenja i svake godine se povećava broj istraživačkih radova o procesu elektropredenja. Rezultati pretraživanja PubMed baze naučnih publikacija sa ključnom reči “elecrospinning”, ukazuje na rastuće interesovanje za izučavanjem elektropredenja, jer je broj naučnih publikacija povećan sa samo dve objavljene publikacije u 2001. godini na više od 1700 objavljenih u 2021. godini (slika 2.10.) (PubMed).



Slika 2.10. Rezultati pretraživanja broja naučnih publikacija sa ključnom reči “electrospinning” u PubMed bazi u periodu 2001-2021.

Na aktuelnoast elektropredenja za proizvodnju nanovlakana, ukazuje i procena da bi globalno tržište nanovlakana trebalo da poraste sa 2,2 milijarde dolara u 2021. na 6,7 milijardi dolara do 2026. godine sa kombinovanom godišnjom stopom rasta od 25,1 % za period 2021-2026. godine (BCC Research nanotechnology).

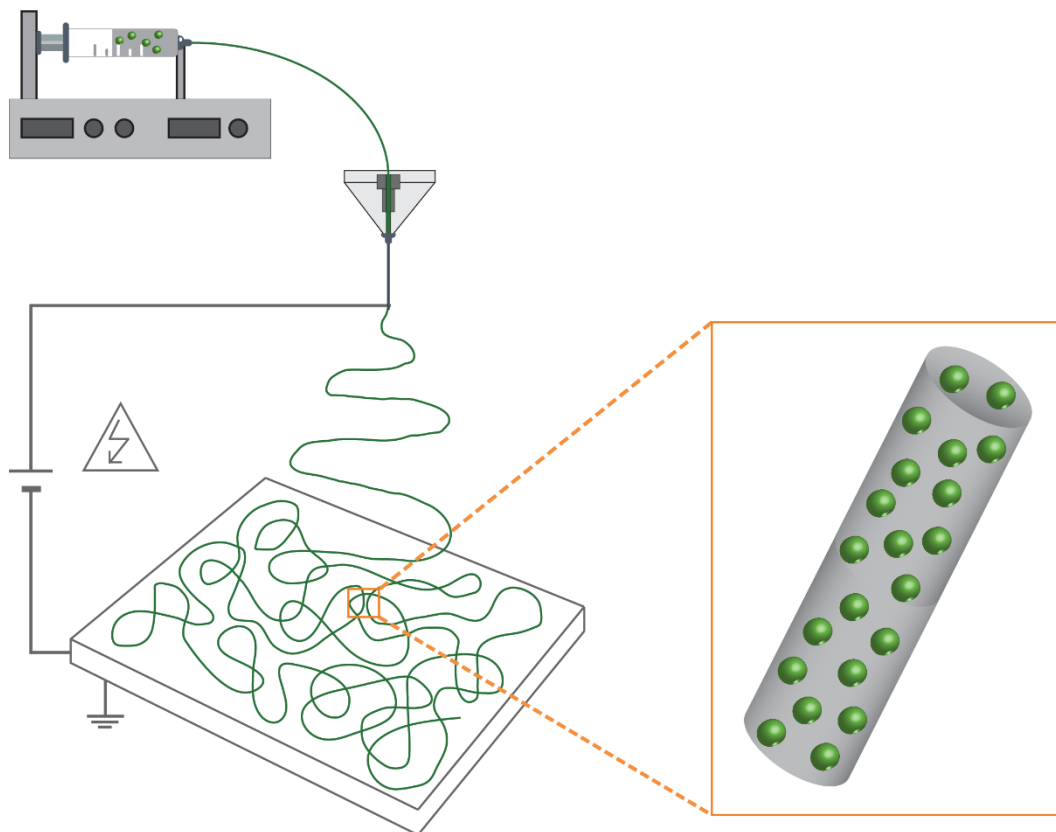
2.4.1. Osnove i vrste procesa elektropredenja

Tipična postavka uređaja za elektropredenje sastoji se od četiri komponente- šprica koji sadrži rastvor polimera, metalne igle, napajanja i uzemljenog metalnog kolektora. Sam proces elektropredenja odvija se uvođenjem polimernog rastvora u elektrostatičko polje visokog napona. Pumpa se koristi za pokretanje rastvora koji se nalazi u špricu do metalne igle. Jedna visoko naponska elektroda se povezuje na metalnu iglu za pređenje, dok se druga elektroda priključuje na uzemljeni metalni kolektor za prikupljanje nanovlakana. Dok mlaz fluida putuje od metalne igle do uzemljenog kolektora, rastvarač isparava i pod dejstvom električnog polja dolazi do formiranja nanovlakana na kolektoru. Najviše zastupljene metode elektropredenja koje se koriste za procesiranje nanovlakana u naučnim istraživanjima su elektropredenje iz rastvora, koaksijalno i emulziono elektropredenje (Abdullah i dr., 2019).

2.4.1.1. Elektropredenje iz rastvora

Proces elektropredenja iz rastvora započinje kada se električni napon primeni na rastvor polimera (ili rastvor polimera koji sadrži aktivnu supstancu) preko metalne igle. Pumpa pokreće rastvor do metalne igle, što dovodi do formiranja kapljica na vrhu igle. Primenjeni električni napon uzrokuje nestabilnost u polimernom rastvoru usled indukcije naelektrisanja na polimernoj kapljici. Istovremeno, recipročno odbijanje naelektrisanja proizvodi silu koja se suprotstavlja površinskom naponu, zbog čega rastvor polimera teče u pravcu električnog polja. Dalje povećanje napona električnog polja uzrokuje da se sferna kapljica deformiše i poprimi konusni oblik. U ovoj fazi, ultrafina nanovlakna izlaze iz konusne polimerne kapljice (tzv. Tejlorov konus), i sakupljaju se na metalnom uzemljenom kolektoru koji se drži na optimizovanoj udaljenosti. Tokom procesa, unutrašnje i spoljašnje sile naelektrisanja izazivaju pomeranje mlaza tečnosti u pravcu kolektora. Ovo

kretanje omogućava da se polimerni lanci unutar rastvora rastežu i klize jedan pored drugog, pri čemu rastvarač isparava, što rezultira stvaranjem vlakana prečnika dovoljno malih da se nazovu nanovlakna (Haider i dr., 2015). Ukoliko se u rastvoru polimera nalaze i aktivne supstance, u nanovlaknima dobijenim elektropredenjem iz rastvora uspostavljena je homogena distribucija aktivne supstance u nanovlaknu. Slika 2.11. prikazuje tipičnu vertikalnu postavku uređaja za elektropredenje iz rastvora i izgled dobijenog nanovlakna sa aktivnom supstancom.



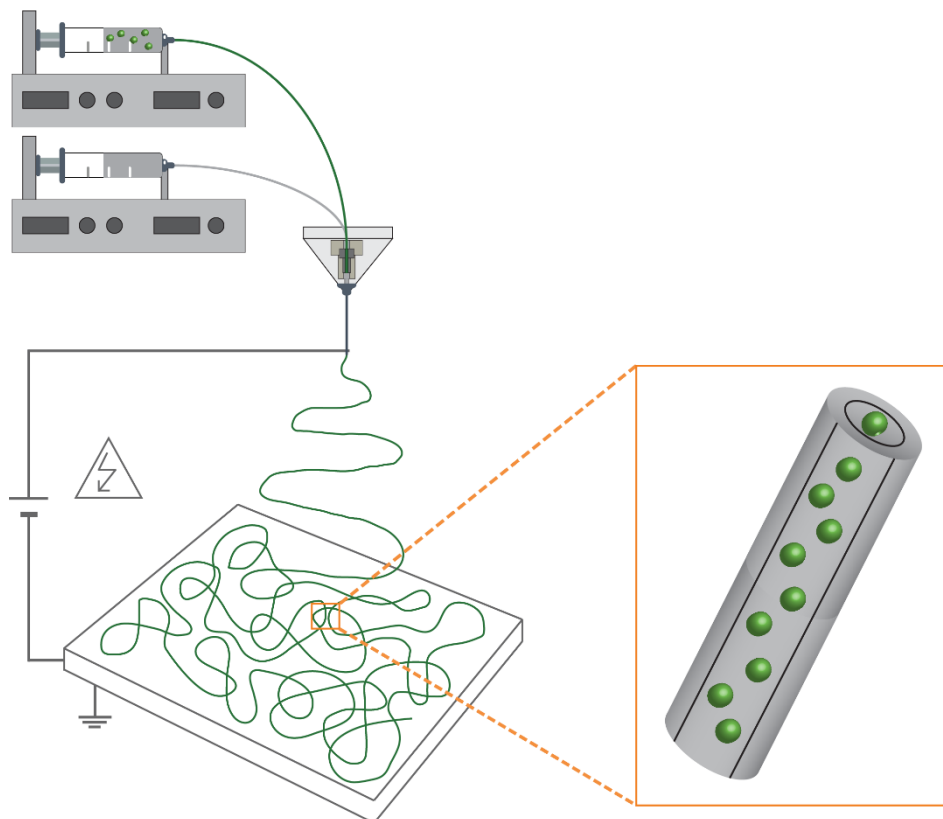
Slika 2.11. Šematski prikaz uređaja za elektropredenje iz rastvora i izgleda dobijenog nanovlakna (sivi cilindrični oblik predstavlja nanovlakno sa homogenom distribucijom aktivne supstance duž nanovlakna koja je predstavljena kao zelena sfera)

2.4.1.2. Koaksijalno elektropredenje

Koaksijanim elektropredenjem se dobijaju nanovlakna koja imaju strukturu jezgro-omotač, gde se hemijski sastav jezgra i omotača međusobno razlikuju. Koaksijalno elektropredenje je razvijeno 2003. godine (Sun i dr., 2003), i pokazano je da je moguće dobijanje nanovlakna jezgro-omotač u kojima su kombinovani isti ili različiti polimerni materijali u jezgru i omotaču. Koaksijalno elektropredenje je široko primenjivano zbog njegovog relativno jednostavnog podešavanja, niske cene, fleksibilnosti dizajna i mogućnosti da se formiraju jezgro-omotač nanovlakna od širokog spektra materijala (Wang i dr., 2018; Xu i dr., 2017; Cheng, Ma i dr., 2018).

Ova tehnika koristi specijalnu mlaznicu, tzv. koaksijalnu diznu. Ova dizna se sastoji od dve mlaznice raspoređene u koncentričnoj orijentaciji. Dve pumpe se koriste za pokretanje dva različita rastvora, uobičajeno rastvora polimera i rastvora polimera koji sadrži aktivnu supstancu, do koaksijalne dizne koja je povezana sa iglom na koju se primenjuje napon. Ovo dovodi do formiranja kapljica jezgra/omotača na vrhu igle. Kada je visoki napon povezan na iglu i uzemljen na kolektor, kapljica je povučena električnim poljem i deformisana u mlaz rastvora. Nakon toga, mlaz se dodatno isteže i stanjuje zbog nestabilnosti savijanja. Kako mlaz fluida putuje od igle do uzemljenog kolektora, rastvarač isparava i to na kraju dovodi do formiranja vlakana sa jezgrom i omotačem na

uzemljenom metalnom kolektoru (Sun i dr., 2019). Kao što je napomenuto, koaksijalnim elektropredenjem dobijaju se nanovlakna strukture jezgro-omotač, pri čemu je obično aktivna supstanca homogeno distribuirana u jezgu nanovlakna i obavijena inertnim polimernim omotačem. Struktura nanovlakna jezgro-omotač omogućava prolongirano otpuštanje inkorporirane aktivne supstance iz nanovlakana. Slika 2.12. prikazuje postavku uređaja za koaksijalno elektropredenje i izgled dobijenog nanovlakna sa aktivnom supstancom.



Slika 2.12. Šematski prikaz uređaja za koaksijalno elektropredenje i izgled dobijenog nanovlakna (sivi cilindrični oblik predstavlja „jezgro-omotač“ nanovlakno sa inkorporiranom aktivnom supstancom u jezgri koja je predstavljena kao zelena sfera)

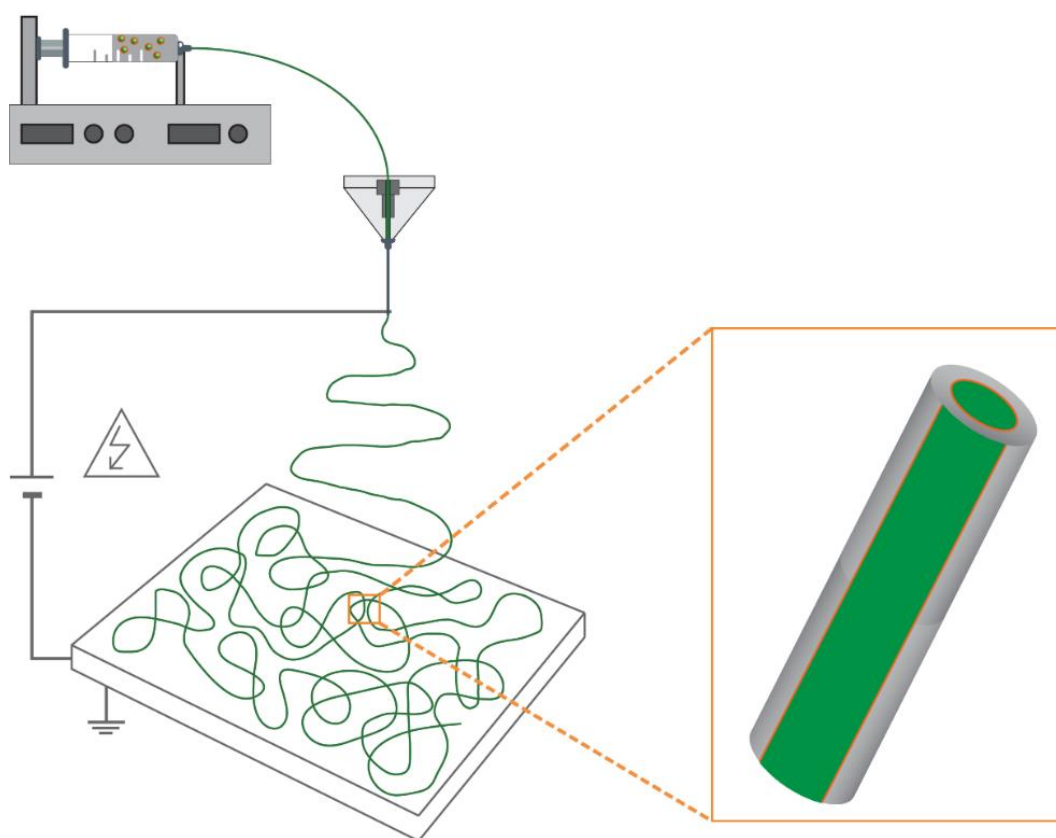
2.4.1.3. Emulziono elektropredenje

Emulziono elektropredenje je tehnički manje zahtena alternativa koaksijalnom elektropredenju za proizvodnju vlakana jezgro-omotač, jer se izvodi uz pomoć konvencionalne metalne igle za elektropredenje. Emulzija tipa voda u ulju (V/U) se priprema dispergovanjem kapljica vodenog rastvora koji sadrži aktivnu supstancu (vodena faza ili dispergovana faza) u mešavini rastvora polimera (uljna faza ili kontinualna faza) i surfaktanta (npr. Span-80, Tween-80, Pluronic F-68, itd.), uz mešanje tokom dužeg vremenskog perioda ili tretmanom ultrazvukom da bi se dobila ujednačena V/U emulzija. Emulzija tipa ulje u vodi (U/V) se priprema analogno suspendovanjem kapljica ulja (dispergovana faza) u rastvoru vodene faze (kontinualna faza). Izbor sistema emulzije (V/U ili U/V) uglavnom zavisi od karakteristika aktivnih molekula koji se inkorporiraju u nanovlakno (hidrofobnih ili hidrofilnih). V/U emulzija se koristi za dispergovanje hidrofilnih molekula, dok se U/V emulzija koristi za suspendovanje hidrofobnih molekula ili lekova.

Surfaktant igra važnu ulogu u emulzionom elektropredenju. Surfaktant je amfifilna supstanca koja sadrži hidrofilni deo molekula koji je usmeren ka polarnoj ili vodenoj fazi i hidrofobni deo molekula (ugljovodonik ili fluorougljenik) koji je usmeren ka uljnoj fazi i u primenjenom sistemu ima ulogu emulgatora (Vaidya i Ganguli, 2019). Surfaktant poboljšava stabilnost emulzije smanjenjem površinskog napona između vodene i uljne faze (Nikmaram i dr., 2017). Odgovarajući

izbor surfaktanta i njegove koncentracije je od značaja za dobijanje željene veličine kapljica u emulziji (makroemulzija, mikroemulzija ili nanoemulzija) a time i prečnika nanovlakana koji se dobija iz tako pripremljene emulzije. Izbor surfakanta tj. emulgatora uz izbor električnog napona od kritičnog su značaja za kvalitet dobijenog jezgro-omotač vlakna (Cheng i dr., 2018; Pelipenko i dr., 2015).

Elektropredenje iz emulzije se odvija na način identičan elektropredenju iz rastvora, a formiranje strukture jezgro-omotač tokom emulzionog elektropredenja se inicira bržim isparavanjem kontinualne faze (uljane faze na primeru V/U emulzije). Ovo dovodi do povećanja viskoziteta kontinualne faze, što podstiče dispergovanu fazu (vodene kapljice) da migriraju ka centru mlaza rastvora. Pod uticajem električnog polja, mlaz se rasteže od metalne igle prema uzemljenom kolektoru, a vlakna jezgro-omotač se sakupljaju kada ispare oba rastvarača. Pri emulzionom elektropredenju omotač nastaje od rastvora kontinualne faze a jezgro od rastvora dispergovane faze. Slika 2.13. prikazuje postavku uređaja za emulziono elektropredenje i izgled dobijenog nanovlakna sa aktivnom supstancom.



Slika 2.13. Šematski prikaz uređaja za emulziono elektropredenje i izgled dobijenog nanovlakna (sivi cilindrični oblik predstavlja nanovlakno sa aktivnom supstancom naznačenom zelenom bojom u jezgrou koja je obavijena surfaktantom u tankom sloju, na slici predstavljeno narandzastom bojom)

2.4.2. Faktori koji utiču na proces elektropredenja

Struktura i morfologija nanovlakana u velikoj meri zavise od parametara pri kojima se izvodi elektropredenje. Na morfologiju nanovlakana utiču parametri rastvora, procesni parametri i ambijentalni parametri (Li i Xia, 2004). Elektropredena nanovlakna često nisu potpuno glatka već sadrže nakupine sfernog ili sličnog oblika (tzv. perle), koje nastaju kao posledica primene neadekvatnih parametara u procesu elektropredenja. Ustanovljeno je da su vodeći faktori koji utiču na formiranje perli tokom procesa elektropredenja viskoznost rastvora, gustina naelektrisanja koju nosi mlaz rastvora i površinski napon rastvora. Veći viskozitet rastvora favorizuje formiranje nanovlakana bez perli. Veća gustina naelektrisanja ne samo da favorizuje formiranje nanovlakana bez perli, već takođe favorizuje formiranje tanjih nanovlakana. Veći površinski napon rastvora vodi ka formiranju perli, dok manji površinski napon favorizuje formiranje nanovlakana bez perli (Fong i dr., 1999). Takođe, može doći do prekida u nanovlaknu ili stvaranja kapljica tokom procesa elektropredenja. Tako npr. pri niskoj koncentraciji rastvora zbog niskog viskoziteta i visokog površinskog napona, u naelektrisanim mlazovima se gube međumolekularna privlačenja polimera i izdvajaju se u kapljice iz Tejlorovog konusa (Greiner i Wendorf, 2007). Iz svega navedenog može se zaključiti da na formiranje glatkih neprekidnih nanovlakana bez perli, utiče više faktora, te će u narednim pasusima biti diskutovani efekti različitih parametara na proces elektropredenja i na karakteristike dobijenih nanovlakana.

2.4.2.1. Uticaj karakteristika rastvora na proces elektropredenja nanovlakana

Dielektrična svojstva rastvarača se odnose na dielektričnu konstantu rastvarača koja predstavlja meru njegove polarnosti. Što je rastvarač polarniji, veća je dielektrična konstanta rastvarača. Tokom elektropredenja tendencija za formiranje perli i prečnik proizvedenog vlakna se smanjuju korišćenjem rastvora koji ima veća dielektrična svojstva (Son i dr., 2004). Da bi se poboljšala dielektrična svojstva rastvora za elektropredenje, koriste se polarni rastvarači kao što su: acetonitril, sirćetna kiselina, m-krezol, tetrahidrofuran, toluen, aceton, hloroform, etil acetat, dihlormetan, dimetilformamid, etanol, itd. (Berkland i dr., 2004; Yang i dr., 2004). Viša dielektrična konstanta rastvarača dovodi do veće nestabilnosti savijanja elektropredenog mlaza, što uzrokuje povećanje površine na kojoj se vlakna deponuju. Zbog povećane putanje mlaza, dobijaju se vlakna manjih dimenzija (Hsu i Shivkumar, 2004). Rastvarač koji ima visoku dielektričnu konstantu obično poseduje veću gustinu naelektrisanja u električnom polju pa tokom elektropredenja veće sile elongacije se primenjuju na naelektrisani mlaz što je dodatni faktor zbog kog dolazi do smanjenja stvaranja perli i stvaranja nanovlakana manjeg prečnika (Son i dr., 2004).

Površinska gustina naelektrisanja je količina naelektrisanja po jedinici dvodimenzionalne površine, odnosno mera količine električnog naboja koja je akumulirana na površini. Veća površinska gustina naelektrisanja utiče na to da elektropredeni mlaz nosi više naelektrisanja, što dovodi do stvaranja tanjih vlakana. Do formiranja perli u nanovlaknima dolazi kada mlaz rastvora ima malu površinsku gustinu naelektrisanja jer ima manju pokretljivost (Hayati i dr., 1987), a vlakna se uopšte ne formiraju ukoliko se koristi rastvor sa nultom površinskom gustinom naelektrisanja jer nema nikakav dipolni momenat za formiranje mlaza (Angamma i Jayaram, 2011; Jarusuwannapoom i dr., 2005). Pored korišćenja rastvarača sa velikom dielektričnom konstantnom, povećanje gustine naelektrisanja može se postići dodavanjem jona u rastvor polimera (Bhardwaj i Kundu, 2010). Ispitan je efekat dodatka soli NaCl, NaH₂PO₄ i KH₂PO₄ na morfologiju vlakana poli(D, L-laktidne) kiseline i utvrđeno je da su vlakna proizvedena pri dodatku NaCl u rastvor imala najmanji prečnik, dok je dodavanje KH₂PO₄ rezultiralo vlaknima najvećeg prečnika. Ovo je objašnjeno činjenicom da natrijum i hloridni joni poseduju manji atomski poluprečnik od jona kalijuma i fosfatnih jona, zbog čega imaju veću pokretljivost pod primenjenim naponom što povećava silu istezanja tokom elektropredenja zbog čega nastaju nanovlakna smanjenog prečnika (Zong i dr., 2002).

Površinski napon se može definisati kao svojstvo površine tečnosti koje joj omogućava da se odupre spoljašnjoj sili. Da bi otpočeo proces elektropredenja potrebno je prevazići površinski napon rastvora za elektropredenje. Pri niskom površinskom naponu postoji veća interakcija između polimera i molekula rastvarača i, kao rezultat toga, molekuli rastvarača pokušavaju da se rašire preko upletenih molekula polimera što dovodi do formiranja nanovlakana bez perli, a pri većem površinskom naponu molekuli rastvarača teže da se sklapaju u sferni oblik pa je formiranje perli očekivano. Da bi se smanjio površinski napon, može se koristiti rastvarač sa niskim površinskim naponom ili se u rastvor može dodati surfaktant (Haghi i Akbari, 2007; Zeng i dr., 2003).

Za uspešan postupak elektropredenja, izbor odgovarajuće *viskoznosti rastvora* je jedan od najvažnijih uslova, jer se pri veoma niskoj viskoznosti rastvora ne formiraju kontinualna vlakna, a pri veoma visokoj viskoznosti rastvora teško je pokrenuti rastvor polimera (Pillay i dr., 2013). Viskoznost rastvora polimera je proporcionalna koncentraciji polimera. Pri nižoj viskoznosti rastvora, mobilnost polimernih lanaca se povećava što dovodi do formiranja nanovlakana malog prečnika koji imaju visok stepen orijentacije, kristaliničnosti i čvrstoće. Polimeri visoke koncentracije i većeg viskoziteta formiraju glatka elektropredena nanovlakna, čak i pri nižim vrednostima primenjenog napona (Ibrahim i Klingner, 2020).

Rastvor polimera za elektropredenje mora imati odgovarajuću *molekulsku masu* (Fujihara i dr., 2005). Molekulska masa utiče na druge faktore od značaja za proces elektropredenja kao što su viskoznost, površinski napon, površinska gustina naelektrisanja i dielektrična svojstva rastvora (Haghi i Akbari, 2007). U principu, veća molekulska masa omogućava dobijanje glatkih nanovlakana dok male molekulske mase indukuju stvaranje perli (Gupta i dr., 2005).

Formiranje vlakana tokom procesa elektropredenja nastaje rastezanjem naelektrisanih mlazova u jednoosnim pravcima (Pillay i dr., 2013). Pri niskoj *koncentraciji rastvora* zbog niskog viskoziteta i visokog površinskog napona, naelektrisani mlazovi gube svoja međumolekularna privlačenja i tako se diskretno izdvajaju u kapljice iz Tejlorovog konusa (Greiner i Wendorf, 2007). Pri većim koncentracijama rastvora, dobijaju se vlakna sa perlama. Najpoželjnija glatka vlakna se mogu dobiti kada se koristi optimalna koncentracija rastvora (Yang i dr., 2004).

2.4.2.2. Uticaj procesnih parametara elektropredenja na karakteristike nanovlakana

Elektropredenje je proces koji je direktno pod uticajem jačine električnog polja tj. primenjenog *električnog napona*. Generalno, za pokretanje mlaza rastvora polimera preko vrha metalne igle tokom procesa elektropredenja potrebno je primeniti napon viši od 6 kV (Taylor, 1964). Primenom previsokog napona postoji mogućnost izbacivanja veće zapremine polimernog rastvora (Demir i dr., 2002) i zbog veće elektrostatičke interakcije u naelektrisanom rastvoru dolazi do većeg istežanja i stvaranja veće odbojne sile u mlazu fluida što dovodi do stvaranja vlakana malog prečnika (Buchko i dr., 1999). Primenjeni napon takođe utiče na raspored molekula polimera unutar nanovlakana. Pri visokom naponu, zbog elektrostatičkog slabljenja molekula polimera, oni postaju uređeniji i tako poboljšavaju kristaliničnost vlakana, međutim nakon određenog indukovanog napona zbog kraćeg vremena „putovanja“ mlaza kristaliničnost se može smanjiti (Zhao i dr., 2004).

Prečnik, poroznost i geometrija elektropredenih nanovlakna u velikoj meri zavise od *brzine protoka* rastvora za elektropredenje. Procesiranju glatkih nanovlakana dobrih karakteristika i bez perli pogoduje spora brzina protoka polimernog rastvora (Yuan i dr., 2004). Povećana brzina protoka utiče na povećanje prečnika i veličine pora u nanovlaknastom matu, dok se daljim povećanjem brzine protoka povećava verovatnoća za formiranje perli u nanovlaknima (Taylor, 1969).

U uobičajenim postavkama za elektropredenje, *provodna uzemljena kolektorska ploča* se koristi kao kolektor za nanovlaknaste matove. Žičana mreža, ploča sa izbočinama, niz paralelnih brazda, rešetki, paralelne šipke ili rotirajući točak su neki od oblika kolektora koji se koriste u procesiranju nanovlakana namenjenih za različite primene (Ki i dr., 2007). U slučaju manje provodnog kolektora, mlaz se brzo kupi na kolektoru i količina deponovanih vlakana se smanjuje uz

stvaranje vlakana sa perlama (Wang i dr., 2005). Rotirajući kolektor favorizuje dobijanje suvih vlakana jer tokom procesa elektropredenja ima više vremena da rastvarač ispari. Rotirajući kolektori takođe pomažu u formiranju jednoosno orijentisanih vlakana (Deitzel i dr., 2001). Kako naelektrisani mlaz putuje velikom brzinom tokom trajanja procesa, kolektor treba da se okreće određenom brzinom koja je poznata kao brzina orijentacije. Ako je brzina kolektora niža od te specifične vrednosti onda se više vlakana skuplja na kolektoru gde sastavljanje naelektrisanja može da odbije dolazna vlakna što rezultira dobijanjem vlakana koja su manje orijentisana.

Variranjem *rastojanja između vrha metalne igle i kolektora* može se uticati na veličinu i morfologiju vlakana. Međutim, uticaj nije tako značajan kao drugi diskutovani parametri. Kratko rastojanje između vrha igle i kolektora ne pogoduje formiranju uniformnih, glatkih nanovlakana. Zbog kraće udaljenosti koju mora da pređe naelektrisani mlaz, formiraju se neke međuslojne i unutar-slojne veze između vlakana na njihovim spojevima, što dovodi do formiranja perli u vlaknima (Buchko i dr., 1999). Sa druge strane, prosečni prečnik vlakana može biti smanjen sa povećanjem udaljenosti između vrha igle i kolektora (Doshi i Reneker, 1993). Međutim, postoje izuzeci, pa je pokazano da se primenom manje elektrostatičke sile i veće udaljenosti dobijaju PVA nanovlakna većeg prečnika (Lee i dr., 2004). Stoga je razumljivo da je za procesiranje vlakana bez perli elektropredjenjem neophodno primeniti optimalnu udaljenost između vrha igle i kolektora (Ki i dr., 2005).

2.4.2.3. Uticaj ambijentalnih parametara pri izvođenju elektropredenja na karakteristike nanovlakana

Ambijentalni uslovi u kojima se izvodi proces elektropredenja moraju biti kontrolisani jer i oni utiču na karakteristike i kvalitet dobijenih nanovlakana. Viša *temperatura* sredine tokom procesa elektropredenja dovodi do niže stope isparavanja rastvarača, tako da će mlazu za elektropredjenje tada biti potrebno duže vreme da očvrsne. Takođe, pri višoj temperaturi smanjuje se i viskozitet rastvora polimera, a usled manjeg viskoziteta dolazi do većeg rastezanja vlakana, što dovodi do stvaranja tanjih vlakana (De Vrieze i dr., 2009). Ukoliko se kao aktivne supstance u nanovlaknima koriste termički osetljive biološke supstance poput enzima i proteina na višim temperaturama ovi molekuli mogu izgubiti svoju funkciju (Fujihara i dr., 2005).

Varijacije u *vlažnosti vazduha* tokom elektropredenja utiču na morfologiju elektropredenih vlakana. Povećanje vlažnosti vazduha tokom elektropredenja dovodi do stvaranja malih kružnih pora na površini vlakana. One se formiraju kao rezultat hlađenja rastvarača isparavanjem koje nastaje tokom puta mlaza rastvora polimera od vrha metalne igle do kolektora. Dalje povećanje vlažnosti vazduha može dovesti do stvaranja vlakana sa neujednačenom strukturom (Casper i dr., 2004). Pri visokoj vlažnosti vazduha, vlakna procesirana iz polimera rastvorenih u isparljivim rastvaračima, mogu imati kondenzovanu vodu na površini (Megelski i dr., 2002). S druge strane, pri niskoj vlažnosti vazduha brzina protoka rastvora sa vrha igle može biti sporija od brzine isparavanja rastvarača, što može dovesti do začepljenja vrha igle i zaustavljanja procesa elektropredenja (Baumgarten, 1971).

2.4.3. Karakterizacija elektropredenih nanovlakna

Geometrijska karakterizacija nanovlakana podrazumeva karakterizaciju geometrijskih svojstava kao što su prečnik vlakana, raspodela prečnika, orijentacija vlakana i morfologija vlakana. Za karakterizaciju ovih geometrijskih svojstava koriste se skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM), skenirajuća elektronska mikroskopija sa emisijom polja (FESEM), transmisiona elektronska mikroskopija (TEM) i mikroskopija atomske sile (AFM) (Demir i dr., 2002). Geometrijska karakterizacija je važna jer se na osnovu nje mogu proučiti svojstva dobijenih nanovlakana u smislu poroznosti ili prečnika nanovlakana, te shodno tome optimizovati uslovi elektropredenja u cilju dobijanja nanovlakana željenih karakteristika. Hemijski sastav elektropredenih nanovlakana može se odrediti tehnikama infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (FTIR) i nuklearne

magnetne rezonance (NMR) (Huang i dr., 2000). Hemijska karakterizacija nanovlakana daje informacije o sastavu nanovlakana i analizira eventualne hemijske reakcije između polimerne matrice i aktivne supstance koja je inkorporirana u nanovlakna. Fizička karakterizacija nanovlakana podrazumeva određivanje svih fizičkih svojstava materijala kao što su termička stabilnost, tačka topljenja, upijanje vode itd. Moguće je izmeriti termička svojstva kao što su tačka topljenja, tačka kristalizacije i staklasti prelaz materijala, korišćenjem diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC). Mehanička karakterizacija elektropredenih vlaknastih matova može se ispitati korišćenjem konvencionalnih tehnika mehaničkog ispitivanja (Matthews i dr., 2002; Huang i dr., 2001). Jungov modul elastičnosti, zatezna čvrstoća i prekidna deformacija se mogu odrediti izvođenjem testova zatezanja sa polimernim nanovlaknima. Jungov modul elastičnosti daje meru krutosti materijala, zatezna čvrstoća materijala predstavlja maksimalan napon kojim se materijal može opteretiti zatezanjem a da pritom ne dođe do loma, dok prekidna deformacija daje informaciju o tome koliko se materijal može istezati pre loma, kao procenat promene njegovih originalnih dimenzija. Takođe postoje i sofisticiranije metode za karakterizaciju nanovlakana kao što su dinamičko-mehanička analiza (DMA) i termo-mehanička analiza (TMA) kod kojih se simultano dobijaju mehanička i termička svojstva nanovlakana u funkciji temperature, frekvencije ili vremena.

2.4.4. PCL nanovlakna u biomedicini – kratak pregled dosadašnjih istraživanja

Elektropredena nanovlakna se intenzivno koriste u isporuci brojnih bioaktivnih supstanci, uključujući antibiotike, lekove protiv kancera, proteine i DNK. Aktivne supstance, tj. lekoviti agensi se mogu zarobiti ili mešanjem leka sa polimerima i njihovom elektroprednjem iz rastvora formirajući tako vlakna sa inkorporiranim lekom ili stvaranjem strukture jezgro/omotač korišćenjem metode koaksijalnog ili emulzionog elektropredenja (Yang i dr., 2009). Kako bi se održao integritet i aktivnost inkorporiranog molekula, lekovito sredstvo se inkorporira unutar elektropredenih nanovlakana, koje se otpušta iz matrice. Kao i bilo koji drugi sistem sa kontrolisanim otpuštanjem lekova, ovakvi sistemi mogu značajno da smanje sistemsku apsorpciju leka i smanje bilo kakve neželjene efekte zahvaljujući lokalnoj i kontrolisanoj isporuci lekova (Cui i dr., 2010).

PCL nanovlakna takođe nalaze svoju primenu u biomedicini kao nosači aktivnih supstanci. PCL poseduje odlična reološka i viskoelastična svojstva, što ga čini dobrim kandidatom za proizvodnju nosača za različite primene u oblasti biomaterijala (Woodruff i Hutmacher, 2010). Postoji više primera primene PCL nanovlaknastih matova kao nosača bioaktivnih molekula. Tako je npr. heparin (antikoagulant) inkorporiran u elektropredena PCL nanovlakna kako bi se postigla lokalna kontinualna isporuka heparina na površinu presađenih krvnih sudova tj. grafta. Ovako kontrolisanom isporukom heparina cilj je bio da se spreči proliferacija vaskularnih glatkih mišićnih ćelija koja može dovesti do okluzije i zapušenja grafta. *In vitro* testom je pokazano da nanovlaknasti mat ne izaziva inflamatorni odgovor u ćelijama makrofaga a da oslobođeni heparin efikasano sprečava proliferaciju vaskularnih glatkih mišićnih ćelija u kulturi (Luong-Van i dr., 2006). Sa ciljem dobijanja potencijalnih vaskularnih implantata, procesirana su PCL nanovlakna sa cilostazolom (vazodilator - lek koji opušta mišiće u krvnim sudovima kako bi im pomogao da se prošire) metodom elektropredenja sa rotirajućim kolektorom. Dobijena su vlakna prečnika adekvatnog za kardiovaskularnu primenu (prečnik vlakana u rasponu od 0,81 do 2,48 μm). Sprovedenim studijama oslobađanja leka *in vitro* pokazano je da je mehanizam oslobađanja cilostazola iz polimerne matrice rastvaranje leka u kombinaciji sa difuzijom i relaksacijom polimera i zaključeno da ovaj materijal predstavlja efikasan sistem isporuke za primenu vaskularnih implantata (Rychter i dr., 2018).

Takođe, ispitana je i mogućnost primene PCL nanovlaknastih matova za isporuku antimikrobnih lekova. Nosači na bazi elektropredenih PCL nanovlakana sa 10 % i 20 % (v/v) inkorporiranog antibiotika rifampicina, pokazali su brzo oslobađanje antibiotika tokom prvog sata, a u narednih 7 sati se iz obe formulacije otpustilo ~50 % ukupnog sadržaja rifampicina. Oba nosača koja su sadržala rifampicin potpuno su inhibirala rast bakterija *P. aeruginosa* i *Staphylococcus epidermidis* i sprečila formiranje biofilma na nosačima tokom prvih 6 h. Ovo ukazuje da bi dobijeni

biomaterijali mogli imati primenu za oblaganje ortopedskih implantata sa ciljem sprečavanja infekcija (Ruckh i dr., 2012). U drugoj studiji je analizirano kontrolisano i kontinualno oslobađanje antibiotika metronidazola inkorporiranog u različitim koncentracijama u elektropredena PCL nanovlakna tokom dve nedelje. Pokazano je da je antibakterijska aktivnost oslobođenog antibiotika zadržana tokom procesa elektropredenja a analizom potkožnih implantata u eksperimentu na životinjskom modelu pokazano je da PCL nanovlaknasti matovi sa metronidazolom izazivaju manji inflamatorni odgovor od PCL nanovlakna bez inkorporiranog antibiotika. Ovi rezultati pokazuju da dobijena PCL nanovlakna sa antibiotikom imaju potencijalnu primenu kao membrane za regeneraciju tkiva sa antibakterijskom i antiinflamatornom funkcijom za široku biomedicinsku primenu (Xue i dr., 2014). Analogno, elektropredena nanovlakna mogu biti nosači i za isporuku antifungalnih sredstava, pa su PCL nanovlakna funkcionalizovana dodatkom ketokonazola (antimikotik). Funkcionalizovana nanovlakna su pokazala antifungalnu aktivnost prema nekoliko sojeva patogenih gljivica iz roda *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium* (Veras i dr., 2016).

PCL nanovlakna mogu se iskoristiti za dobijanje sistema za efikasniju isporuku lekova slabo rastvorljivih u vodi. U jednom radu, procesirana su elektropredena PCL nanovlakna sa ibuprofenom (nesteroidni antiinflamatorni lek) ili karvedilolom (beta blokator) i upoređena je njihova efikasnost pri otpuštanju ovih lekova naspram procesiranih PCL filmova sa istim lekovima. Dobijeni rezultati jasno su pokazali prednosti novog sistema za isporuku jer se za 4 h skoro 100 % inkorporiranog ibuprofena oslobodilo iz PCL nanovlakna, dok se do 77 % karvedilola otpustilo tokom istog vremenskog perioda. Nasuprot tome, procenat otpuštanja ibuprofena i karvedilola iz PCL filmova je iznosio ~83 % i ~43 %, redom, pa dobijeni rezultati ukazuju na to da je dodavanjem oba leka u PCL nanovlakna značajno poboljšana njihova stopa rastvaranja evidentna kroz povećan procenat otpuštanja aktivnih supstanci (Potrč i dr., 2015).

Takođe, postoji primer razvoja materijala na bazi PCL nanovlakna sa inkorporiranim bioaktivnim molekulima koja potpomažu zarastanje rana. Tako su procesirana PCL nanovlakna sa ugrađenim bioaktivnim molekulima dobijenim iz placente koji sadrže faktore rasta adekvatne za primenu za zarastanje kožnih rana. Fizičko-hemijska svojstva i biološki sastav dobijenih nanovlakana pokazala su se netoksična. *In vitro* testom je utvrđeno da ovako dobijeni matovi značajno poboljšavaju adheziju, infiltraciju i proliferaciju ljudskih fibroblasta i keratinocita. Medijumi ekstrahovani iz nanovlakana poboljšali su migracioni potencijal ćelija (fibroblasta i keratinocita) uključenih u zarastanje rana usled oslobađanja faktora rasta koji su inkorporirani u nanovlakna (Rameshbabu i dr., 2018).

Različite metode procesiranja PCL nanovlakana se mogu razmatrati za specifične namene nanovlaknastih matova. Tako se npr. naglo oslobađanje leka iz nanovlakana može postići metodom elektropredenja iz rastvora, dok se koaksijalno i emulziono elektropredenje koristi za kontrolisano i prolongirano oslobađanje leka. Prilikom emulzionog elektropredenja, na karakteristike dobijenog materijala pri oslobađanju aktivne supstance uticaj ima proces pripreme i sastav emulzije (polimer/lek/surfaktant). Tako su npr. nanovlaknasti nosači dobijeni emulzionim elektropredenjem PCL sa dodatkom metoprolol tartrata (beta blokator) i surfaktanta Span-80 pokazali da emulziona elektropredena nanovlakna značajno ublažavaju naglo oslobađanje leka i omogućavaju produženo oslobađanje lekova u poređenju sa vlaknima dobijenim metodom elektropredenja iz rastvora. Rezultati *in vitro* testa citotoksičnosti su pokazali da emulziono elektropreden PCL nosač sa metoprolol tartratom favorizuje rast humanih matičnih ćelija u poređenju sa drugim testiranim nosačima. Ova studija sugerise da je tehnologija emulzionog elektropredenja obećavajuća metoda za procesiranje jezgro/omotač nanovlakana za dizajn sistema za isporuku lekova sa kontrolisanim oslobađanjem i da se brzina oslobađanja leka može modifikovati podešavanjem uljane i vodene faze (Hu i dr., 2015).

Slične karakteristike se mogu dobiti i koaksijalnim elektropredenjem materijala. Tako su npr. dobijeni vlaknasti matovi osetljivi na pH iz blende dva polimera polivinil alkohola i PCL. Vlakna su procesirana metodom koaksijalnog elektropredenja, u kojoj je polivinil alkohol formirao jezgro a PCL omotač vlakna. Dobijena vlakna se mogu koristiti kao nosač za produženo oslobađanje leka u

zavisnosti od pH vrednosti, što je u konkretnoj studiji pokazano za antikancerogeno sredstvo doksorubicin. *In vitro* testom je pokazano da su dobijeni matovi sa doksorubicinom efikasni u suzbijanju vezivanja i proliferacije Hela ćelija raka grlića materice (Yan i dr., 2020).

Modulacija inicijalnog brzog otpuštanja i dugotrajno oslobađanje leka iz elektropredanih nanovlakana može se postići i stavljanjem sloja vlakana sa lekom između slojeva vlaknastog PCL bez leka. Procesiran je PCL vlaknasti mat sa ibuprofenom (nesteroidni antiinflamatorni lek) bez i u sendvič sloju vlaknastog PCL, variranjem koncentracije polimera i zapremine premaza. PCL nanovlakna sa ibuprofenom bez sendvič sloja pokazala su naglo oslobađanje od 66,43 % prvog dana i kumulativno oslobađanje do 86,08 %, dok su sendvič grupe pokazale kontrolisano početno oslobađanje i kumulativno oslobađanje nakon 62 dana. Analizom citotoksičnosti pokazano je da sendvič nanovlakna nisu citotoksična (Kamath i dr., 2020). Citotoksin 6-merkaptopurin je potencijalno sredstvo protiv karcinoma čija je primenljivost u terapiji ograničena zbog visoke toksičnosti. Inkorporiranje 6-merkaptopurina u troslojni sendvič nanovlaknastog nosača (gornji sloj sastavljen od poli(metilmetakrilata) (PMMA)/PCL, srednji sloj je bio PCL/PMMA/6-merkaptopurin, a donji sloj je bio PCL/PMMA) omogućio je prilagođavanje brzine oslobađanja i smanjenje toksičnosti bioaktivne supstance. Proizvedeni PCL/PMMA nosači sa 6-merkaptopurinom su pokazali antimikrobna svojstva na bakterije i gljivice, bez citotoksičnosti prema humanim ćelijama, čak i pri relativno visokim oslobođenim koncentracijama. Antikancerogena aktivnost proizvedenih nosača je takođe ispitana korišćenjem različitih ćelijskih linija kancera (npr. Caco-2, MDA i HepG-2) i rezultati su pokazali da nanovlaknasti matovi sa 6-merkaptopurinom imaju dejstvo na ćelije kancera, sa visokim selektivnim indeksom za kancer dojke (Salim i dr., 2021).

PCL matovi takođe imaju prihvatljiva mehanička svojstva za tehnologiju ćelijske kulture i inženjerstvo tkiva. Tako su u jednoj nedavno objavljenoj studiji variranjem koncentracije PCL rastvora, korišćenog rastvarača i primenjenog napona tokom procesa elektropredenja, dobijeni 2D mikro- i nanovlaknasti PCL nosači ujednačenog prečnika vlakana u rasponu od 200 nm do 1,4 μm čija poroznost dostiže 66 %. Na ovako dobijene matove ćelije su i pričvršćene i integrisane, što je krajnji cilj i benefit korišćenja ovih vrsta materijala na bazi PCL u inženjerstvu tkiva (Al Rez i dr., 2015). Svojstva materijala se dodatno mogu unaprediti tehnikom ko-elektropredenja kombinovanjem različitih polimera, koji se međusobno dopunjuju svojim komplementarnim svojstvima. Metoda ko-elektropredenja se zasniva na procesiranju vlakana iz dva polimerna rastvora koja pokreću dve pumpe, korišćenjem jednog kolektora. U jednom istraživanju dobijeni su PCL/želatin nanovlaknasti matovi procesirani ko-elektropredanjem za primenu u regeneraciji kostiju. U dobijenim matovima želatin je značajno poboljšao adheziju i diferencijaciju ćelija kosti, dok je PCL značajno poboljšao mehanička svojstva dobijenog materijala (Al-Baadani i dr., 2021). U drugoj studiji su biokompatibilna i biorazgradiva nanovlakna na bazi PCL/polietilen oksida sa inkorporiranim antibiotikom vankomicinom pokazala kontrolisano i kontinualno oslobađanje vankomicina iz nanovlakana. *In vitro* ispitivanjem je zaključeno da je dobijeni nanovlaknasti mat može da spreči stvaranje biofilma izuzetno rezistentnog soja patogene bakterije *S. aureus* (multi resistant *S. aureus* – MRSA) na površini ugrađenog implantata (Jang i dr., 2015).

Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da se izborom adekvatnih rastvarača, koncentracije rastvora PCL, kao i odabirom optimalnih parametara tokom procesa elektropredenja mogu procesirati kontinualna, glatka PCL nanovlakna. Takođe, otpuštanje lekovitih agensa različitom dinamikom iz PCL nanovlakana moguće je postići primenom različitih metoda elektropredenja. Dostupna literatura i pregledni radovi ukazuju na veliku upotrebu PCL nanovlaknastih matova kao nosača različitih biomolekula sa potencijalnom primenom u različitim oblastima medicine.

2.4.5. Primena lekovitog bilja u nanovlaknima

Lekovito bilje nalazi primenu u tradicionalnoj ali sve više i u konvencionalnoj medicini. Pored uobičajenih farmaceutskih formi poput tinktura, kapsula i krema lekovito bilje se u poslednje vreme koristi i u kombinaciji sa modernim materijalima kakva su nanovlakna. Lekovite biljke pokazuju veliki potencijal za uspešnu primenu u biomaterijalima zbog svoje netoksičnosti i visoke kompatibilnosti u fiziološkim i biološkim sredinama (Ramalingam i dr., 2019). Veliki broj studija analizirao je mogućnost dodatka biljnih ekstrakata u različite polimere (Fatehi i Abbasi, 2020). Nanovlakna se koriste za dobijanje biomaterijala u kojima su kombinovana sa lekovima kao čistim supstancama ali i lekovitim biljnim proizvodima ili ekstraktima, kao alternativni sintetičkim lekovima (Fallah i dr., 2016). Postoji više uspešnih primera kombinacija preparata od lekovitog bilja sa nanovlaknima za različite medicinske namene koji su objavljeni u naučnoj literaturi. Interesantno je da dodatak lekovitog bilja u nanovlakna pored biološke aktivnosti doprinosi i poboljšanju mehaničkih svojstava materijala. Tako je npr. dodatak metanolnog ekstrakta *Inula graveolens* L. u elektropredena nanovlakna na bazi PCL omogućio dobijanje materijala povoljnih mehaničkih svojstava, koji nije citotoksičan i može biti primenjen za regeneraciju tkiva i primenu za zarastanje rana (Al-Kaabi i dr., 2021). Veliki broj radova se bavio razvojem materijala na bazi nanovlakana u kombinaciji sa lekovitim biljem koje ima antimikrobno dejstvo i potpomaže zarastanje rana. Više različitih kombinacija polimernih materijala i preparata lekovitog bilja je razvijeno u ovu namenu. Jedan od primera ovakvih materijala dobijen je inkorporiranjem sirovog ekstrakta kore *Tecomella undulata* u PCL/poli(vinilpirolidon) nanovlakna. Dobijeni materijal je inhibirao rast *S. aureus*, *E. coli* i *P. aeruginosa* što ukazuje na to da može delovati ne samo kao sistem za isporuku leka, već i u lečenju zarastanja rana ili dermalnih bakterijskih infekcija, čime se dokazuje potencijalna primena za upotrebu kao zavoj za ranu (Suganya i dr., 2011). Takođe, razvijeni su i nanovlaknasti matovi na bazi PCL/polistirena koji sadrže 15 % ekstrakt kamilice, lekovite biljke sa antibakterijskim dejstvom. I ovaj materijal je imao povoljan efekat na zarastanje rana testiran u *in vivo* sistemu na ranama pacova (Motealleh i dr., 2014).

Nanovlakna na bazi svilenog fibroina-kurkumina u kombinaciji sa PCL i polivinil alkoholom su procesirana u cilju poboljšanja svojstva zaceljivanja rana nanovlaknima. Primena ovih nanovlakana u *in vivo* testu zarastanja rana kod miševa sa dijabetesom pokazala su brže zarastanje u poređenju sa konvencionalnim lekom. Ovakav biomaterijal je omogućio obnavljanje normalne strukture kože i histološkog stanja tkiva. Stoga je zaključeno da nanovlakna na bazi svilenog fibroina sa kurkuminom imaju veliki potencijal kod zarastanja dijabetičkih rana, jer se kombinuju antioksidativna i antiinflamatorna svojstva kurkumina (Agarwal i dr., 2021). Kurkumin je sa sličnom namenom kombinovan i sa elektroprednim PCL nanovlaknima. Pored smanjenja indukcije zapaljenjskog procesa zavoja za ranu, razvijena elektropredena PCL nanovlakna su pokazala poboljšanja mehaničkih svojstava (Merrell i dr., 2009).

Iako je najčešće korišćeno u biomaterijalima za stimulaciju zarastanja rana, pored ove indikacije lekovito bilje se može koristiti u biomaterijalima namenjenom tretmanu i drugih patologija. Tako je npr. analizirana efikasnost PCL nanovlakana dobijenih elektroprednjem kao nosača biljnog leka koji omogućava terapiju kancera. Kao aktivne komponente korišćeni su biljni polifenoli (–)-epigalokatehin-3-O-galat, najzastupljeniji polifenol zelenog čaja i kafeinska kiselina. Oslobođeni biljni polifenoli su mogli da generišu H₂O₂, zahvaljujući čemu su pokazali citotoksičnost, a generisani H₂O₂ je stimulisao i apoptozu ćelija raka želuca (Kim i dr., 2012). Karakteristike i performanse elektropredenih nanovlakana PLA sa ekstraktom *Achillea licaonica* ispitane su za primenu u inženjerstvu tkiva kože. Ova nanovlakna su pokazala odličnu kompatibilnost sa ćelijama kože i povećale preživljavanje ćelija NIH/3T3 (fibroblast embriona miša) u roku od 72 sata (Cam i dr., 2019).

S obzirom da veliki broj lekovitih biljaka ima antimikrobna svojstva i ova karakteristika je iskorišćena za pravljenje novih funkcionalnih biomaterijala. Tako je npr. nanovlaknasti-porozni zavoj za ranu sa antibakterijskim dejstvom napravljen od rastvora PCL koji sadrži sirovi ekstrakt *Biophitum*

sensitivum kao antibakterijski biljni lek. Antibakterijska aktivnost membrane je testirana na patogene bakterije *S. aureus* i *E. coli* i inhibirala je rast bakterijskih sojeva, što je ukazivalo da ova nanovlaknasta-porozna membrana može delovati kao zavoj koji sprečava infekciju različitih rana (Namboodiri i Parameswaran, 2013).

Na osnovu svih dostupnih studija može se zaključiti da lekoviti biljni proizvodi ili ekstrakti pokazuju veliki potencijal za uspešnu primenu u biomaterijalima zbog svoje netoksičnosti i visoke kompatibilnosti u fiziološkim i biološkim sredinama, a naročito u tretmanima zarastanja rana. Sve ovo ukazuje da bi ovakvi sistemi, odnosno nanovlaknasti matovi sa inkorporiranim biljnim ekstraktom koji poseduje antibakterijska i antioksidativna svojstva, mogli naći primenu u oblaganju urinarnih katetera, pri čemu takav način zaštite od infekcija prilikom urinarne kateterizacije do sada niko nije istraživao. Dodatni benefit ovakvog sistema je da bi potencijalno mogli da ubrzaju zarastanje mikro oštećenja tkiva koja nastaju prilikom kateterizacije urinarnog trakta.

2.5. Lekovito bilje

2.5.1. Upotreba lekovitog bilja

Lekovite biljke se koriste u medicini, kozmetici i ishrani ljudi. Prema definiciji Svetske zdravstvene organizacije (SZO) u lekovito bilje spadaju biljne vrste čiji jedan ili više biljnih delova sadrže biološki aktivnu materiju koja se može koristiti u terapijske svrhe. SZO procenjuje da 65 do 80 % svetske populacije koristi lekovito bilje kao primarni oblik zdravstvene zaštite (Palhares i dr., 2015). Brojna pisana dokumenta potvrđuju upotrebu lekovitog bilja u lečenju različitih oboljenja (Petrovska, 2012). Pozitivno dejstvo lekovitog bilja objašnjava se prisustvom bioaktivnih jedinjenja, sekundarnih metabolita u biljkama, koji mogu da ispolje različite biološke aktivnosti, kao što su antimikrobna, antioksidativna, antiinflamatorna, citotoksična, diuretička, spazmolitička i mnoga druga (Popovic i dr., 2016). Pored višestrukog delovanja biljnih preparata još jedna važna prednost je to što su štetni neželjeni efekti značajno manji u poređenju sa sintetičkim lekovima (Alqahtani i dr., 2021). Biljni organizmi sadrže farmakološki aktivna jedinjenja koja se pacijentu dostavljaju u različitim formama biljnih preparata uključujući etarska ulja, tinkture, čajeve, tabletirane ili kapsulirane suve ekstrakte itd. Efikasnost različitih biljnih preparata zavisi od načina pripreme i može dramatično uticati na kvalitet finalnog proizvoda. Zbog velike varijabilnosti u sastavu, često se biljni preparati standardizuju prema količini bioaktivne supstance od značaja za terapijsku indikaciju. Na tržištu retko postoje preparati čistih aktivnih supstanci iz biljaka zbog dva razloga: prvi je da izolovanje čiste supstance značajno usložnjava i poskupljuje tehnološki postupak dobijanja ekstrakta a drugi i verovatno važniji je taj da aktivne komponente u biljnim ekstraktima često deluju sinergistički, pa je biološka aktivnost ekstrakta veća od aktivnosti izolovanih komponenata (Guil-Guerrero i dr., 2016).

2.5.2. Hajdučka trava (*Achillea millefolium* L.)

Achillea millefolium L. (hajdučka trava) spada među najčešće korišćene lekovite biljke iz porodice *Asteraceae*. Hajdučka trava raste u Evropi, Severnoj Africi, Severnoj Americi i Aziji (Lakshmi i dr., 2011) i različiti narodi je tradicionalno koriste u medicinske svrhe stotinama godina (Hemmati i dr., 2002). Biljka se koristi u narodnoj medicini za lečenje infekcija respiratornog trakta, dijabetesa, poremećaja rada bubrega, za poboljšanje varenja i za povećanje apetita (Lakshmi i dr., 2011; Cavalcanti i dr., 2006). Koristi se i za lečenje posekotina i rana, reumatizma i bolova u mišićima (Lakshmi i dr., 2011). Hajdučka trava ima dokazana antimikrobna, antitumorska, antioksidativna i antiinflamatorna svojstva zbog prisustva bioaktivnih jedinjenja koja prvenstveno pripadaju grupi polifenola (Benedek i Kopp, 2007; Saeidnia i dr., 2011; Othman i dr., 2019). Najzastupljeniji polifenoli hajdučke trave su fenolne kiseline i flavonoidi (Benedek i Kopp, 2007; Milutinovic i dr., 2015).

Hajdučka trava je višegodišnja aromatična zeljasta biljka, visine 20-100 cm, sa uspravnom čvrstom stabljikom. Listovi su ravnomerno raspoređeni duž stabljike i perasto su deljeni, a mogu da budu veličine od 5 do 20 cm. Glavice su u štitolikim cvastima, uglavnom sa prljavo belim centralnim i belim obodnim cvetovima (slika 2.14.), a postoje tipovi i sa ružičastim, svetlo ljubičastim ili žutim cvetovima u planinskim krajevima. Raste na toplim i sunčanim staništima, na livadama, poljima, uz puteve i na suvim osunčanim padinama (Milutinovic, 2017).



Slika 2.14. Izgled biljne vrste *Achillea millefolium* L. (preuzeto iz Basta Balkana)

Hajdučka trava je svrstana u sledeće taksonomske kategorije - carstvo: *Plantae*, razdeo: *Magnoliophyta*, klasa: *Magnoliopsida*, potklasa: *Asteridae*, red: *Asterales*, porodica: *Asteraceae*, rod: *Achillea*, vrsta: *Achillea millefolium* L.

U hajdučkoj travi je zastupljeno više vrsta bioaktivnih jedinjenja, a ispitivanjem četrdeset komercijalno dostupnih uzoraka hajdučke trave se pokazalo da je sadržaj polifenola visok i da u proseku u hajdučkoj travi ima 0,60 % flavonoida i 1,48 % fenolnih kiselina (Benedek i Kopp, 2007). Glavni predstavnici bioaktivnih jedinjenja su:

- Fenolne kiseline, od kojih su najzastupljenije hlorogenska i 3,5-O-dikafeoilhinska kiselina (eng. 3,5- dicaffeoylquinic acid 3,5-DCQA), a prisutni su i 1,3-DCQA, 1,4-DCQA, 3,4-DCQA,
- Flavonoidi, od kojih su najprisutniji apigenin-7-O-glukozid, luteolin-7-O-glukozid i rutin. U manjim koncentracijama su prisutni apigenin, luteolin, apigenin-4'-O-glukozid, luteolin-4'-O-glukozid,
- Alkaloidi betonicin, stahidrin i trigonelin,
- Kumarini, salicilna kiselina, seskviterpeni (ahilin i ahilicin), poliacetileni, triterpeni, tanini i steroli (Lakshmi i dr., 2011; Benedek i dr., 2007).

Veliki broj publikacija pokazuje da preparati u vidu ekstrakata dobijenih pomoću različitih rastvarača i etarsko ulje hajdučke trave imaju značajno biološko dejstvo. Etarsko ulje i metanolni ekstrakt hajdučke trave poseduju antioksidativnu aktivnost (Candan i dr., 2003), dok metanolni ekstrakt deluje i na *Helicobacter pylori*, bakteriju koja može da izazove gastritis i čir na želucu i dvanaestopalačnom crevu i koja je prepoznata kao kancerogen I reda (Applequist i Moerman, 2011). Antimikrobna aktivnost ekstrakta hajdučke trave zavisi od hemijskog sastava same biljke, koji

varirira usled klimatskih uslova, ali prvenstveno zavisi od uslova ekstrakcije i od odabranog rastvarača. Ekstrakti dobijeni ekstrakcijom heksanom, etrom i metanolom (v:v=1:1:1), deluju antimikrobno na *Escherichia coli*, *Klebsiela pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Salmonella enteritidis* (Stojanović i dr., 2005). Antiinflamatorno dejstvo hajdučka trava ispoljava zahvaljujući flavonoidima i azulenu, a antispazmolitičku aktivnost ima zbog prisustva kvercetina, luteolina i apigenina (Benedek i Kopp, 2007). Hajdučka trava pokazuje i antikancerogenu aktivnost zahvaljujući prisustvu flavonoida i seskviterpena (Lakshmi i dr., 2011). Povoljni rezultati istraživanja ukazuju da se hajdučka trava ili polifenolne komponente hajdučke trave sa antiradikalnom aktivnošću mogu smatrati potencijalnim izvorom prirodnih antioksidanasa za medicinsku i prehrambenu primenu (Trumbeckaite i dr., 2011).

2.5.2.1. Primena hajdučke trave u tretmanu zarastanja rana

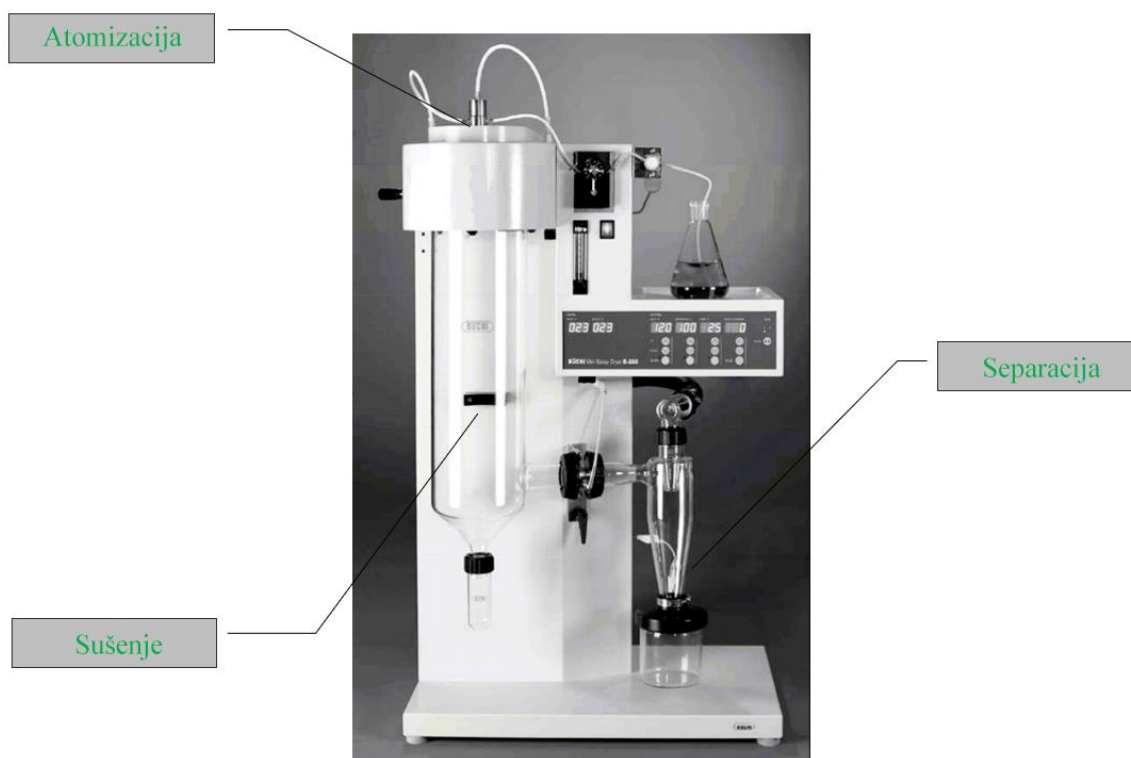
Evropska medicinska agencija prepoznaje hajdučku travu kao biljku kojom se mogu lečiti male rane (European medicines agency, 2020). Proučavan je efekat alkoholnih i vodenih ekstrakata listova *Achillea millefolium* L. na zarastanje rana kod eksperimentalnih pacova. Alkoholni i vodeni ekstrakti pokazali su pozitivan efekat na zarastanje rana sa značajnim povećanjem brzine kontrakcije rane, jačine lomljenja kože, suve mase granulacionog tkiva i sadržaja vlažne mase. Moguće je zaključiti da ova biljka ima dejstvo zaceljivanja rana i time opravdava tradicionalnu upotrebu u ovu namenu (Nirmala i Karthiyayini, 2011). Takođe, naučno je dokazano da ekstrakt hajdučke trave u bazi eucerina može da ubrza zarastanje rana ispitivano na zečevima (Hemmati i dr., 2002). Nekoliko preparata koji sadrže ekstrakt *A. millefolium* prilično su uspešno zalečili rane i ožiljke. Patentiran je preparat kombinacije ulja hiperizina i ekstrakta *A. millefolium* koji ubrzava zarastanje rana i smanjuje vidljive ožiljke. Aktivnost najverovatnije potiče od sinergističkog dejstva jedinjenja prisutnih u ekstraktu i aditivnog dejstva hiperizina (Akkol i dr., 2011). Cvetni vrhovi hajdučke trave mogu biti veoma korisni za proces zarastanja rana, konkretno kada se primene na rane nastale usled opekotina, gde dolazi do pojačane kontrakcije, granulacije, epitelizacije i rasporeda kolagenih vlakana. Ovo je ilustrovano u studiji sprovedenoj na zečevima kojima je tretirana manja opekotina na leđnoj strani. Rane na kontrolnoj grupi zečeva su svakodnevno ispirane fiziološkim rastvorom, dok su rane ostalih zečeva svakodnevno ispirane vodenim ekstraktom hajdučke trave. Histopatološkom evaluacijom i softverskom analizom utvrđeno je da su granulacija i epitelizacija očiglednije i da su kolagena vlakna bolje raspoređena kod rana tretiranih vodenim ekstraktom hajdučke trave (Sanchez i Watson, 2016). Nijedna ranija studija nije analizirala primenu hajdučke trave u biomaterijalima, iako ova biljka ima značajne zdravstvene efekte uključujući pozitivan efekat na zarastanje rana (Akkol i dr., 2011).

2.5.3. Postupak prerade i dobijanja suvih biljnih ekstrakata

Za pripremu biljnih proizvoda, lekovito bilje se podvrgava različitim procesima uključujući sušenje, mehaničku obradu (mlevenje, prosejavanje i odvajanje), destilaciju i ekstrakciju u različitim rastvaračima. Ekstrakcija predstavlja izdvajanje i koncentrisanje određenih sastojaka iz biljnih tkiva pomoću selektivnih rastvarača primenom standardnih procedura (Savić, 2014). Biljni ekstrakti sadrže smešu aktivnih jedinjenja, za razliku od sintetičkih lekova, koji uglavnom sadrže jednu aktivnu komponentu. Tradicionalnim tehnikama ekstrakcije postižu se dobri prinosi bioaktivnih supstanci, ali se prinosi kao i kvalitet dobijenih ekstrakata može unaprediti primenom modernih metoda ekstrakcije, poput ultrazvučne i mikrotalasne ekstrakcije. Primenom ovakvih metoda smanjuje se vreme potrebno za ekstrakciju aktivnih jedinjenja, količina potrebnog rastvarača, a postiže se bolji prinos i kvalitet ekstrakta. Ekstrakcija farmakološki i biološki aktivnih sastojaka iz biljnog materijala daje tečne ekstrakte, koji se sušenjem mogu prevesti u polučvrste ili čvrste preparate (Zhang i dr., 2018; Sasidharan i dr., 2011). Prah osušenog biljnog ekstrakta je najčešći i najšire korišćeni oblik lekovitih biljnih proizvoda, jer čvrsti oblik nudi veću fizičko-hemijsku i mikrobiološku stabilnost od odgovarajućeg tečnog oblika, dok transport i skladištenje postaju lakši (Oliveira i dr., 2006; Rocha i dr., 2012). Nekoliko tehnika, uključujući sušenje raspršivanjem, sušenje zamrzavanjem, sušenje u

fluidizovanom sloju, može se koristiti za dobijanje suvog ekstrakta (Souza i dr., 2006; Cortes-Rojas i Oliveira, 2012). I danas su aktuelna istraživanja kojima se omogućava unapređenje kvaliteta biljnih proizvoda primenom različitih metoda ekstrakcije, upotrebe različitih rastvarača i uslova sušenja (Pham i dr., 2015; Azmin i dr., 2016; Zhang i dr., 2018).

Sušenje raspršivanjem je široko primenjivana tehnika koja se koristi za sušenje bioloških materijala i tipičan je tehnološki postupak kojim se npr. dobija mleko u prahu. Ova metoda se može koristiti i za sušenje tečnih preparata lekovitog bilja čime je omogućena proizvodnja finih prahova sa većim koncentracijama i stabilnošću aktivnih supstanci (Amaro i dr., 2011; Nedovic i dr., 2013). Ova tehnologija nudi visoke stope proizvodnje i niže operativne troškove u poređenju sa alternativama u kojoj se proces sušenja odvija u jednom koraku kroz tri faze sušenja (Chegini i Ghobadian, 2007; Patel i dr., 2009). Prva faza sušenja raspršivanjem je atomizacija i to je proces kojim se tečnost raspršuje/dezintegriše u veliki broj finih kapljica. Obrazovanje raspršene tečnosti sa visokim odnosom površina/masa (velikom specifičnom površinom) je ključno za brzo isparavanje tečnosti, a odatle i za postizanje željenih svojstava konačnog proizvoda. U idealnom slučaju, veličina svih kapljica trebalo bi da bude jednaka, dok je u praktičnim uslovima prisutno određeno odstupanje u raspodeli veličine manjeg broja kapljica. U drugoj fazi raspršena (atomizirana) tečnost se dovodi u blizak kontakt sa strujom zagrejanog gasa, da bi tečnost jednako isparavala sa površine svih kapljica. Ovaj kontakt ostvaruje se u posudi koja se naziva komora za sušenje. Zagrejani gas uvodi se u komoru kroz raspodeljivač vazduha i suve čestice nastaju isparavanjem tečnosti sa kapljica. Završna faza podrazumeva odvajanje (separaciju) suvog praha iz struje gasa i sakupljanje praha u komori za sakupljanje. Gotovo sve komore sušnica raspršivanjem imaju konusno dno, što pomaže sakupljanje osušenog praha (slika 2.15.) (Amaro i dr., 2011; Andrea i dr., 2016).



Slika 2.15. Uređaj za sušenje raspršivanjem sa naznačenim pozicijama u kojima sa odvijaju faze sušenja raspršivanjem (adaptirano iz Seville i dr., 2007)

Da bi se unapredio proces sušenja raspršivanjem i izbegli problemi kao što su mali prinosi, lepljenje i visok sadržaj vlage u dobijenom suvom prahu, za različite vrste materijala koji se suši potrebno je da se optimizuju uslovi sušenja (temperatura ulaznog vazduha, brzina protoka gasa za sušenje i brzina protoka tečnosti, kao i uslovi atomizacije) (Chegini i Ghobadian, 2007; Ozmen i

Langrish, 2003; Kudra 2003). Proces sušenja treba voditi tako da se uz visok prinos i efikasno sušenje tokom procesa spreči degradacija bioaktivnih jedinjenja.

2.5.4. Optimizacija procesnih promenljivih metodom odzivnih površina

Optimizacija procesa omogućava racionalno korišćenje resursa sa ciljem dobijanja proizvoda željenih karakteristika. Uobičajen pristup optimizaciji odvija se praćenjem odgovora sistema na promene pojedinačnih parametara procesa, ali ovakav pristup onemogućava uvid u složene međusobne interakcije različitih parametara. Zbog toga je planiranje eksperimenta koje omogućava simultano variranje procesnih promenljivih i dobijanje velikog broja informacija o ispitivanom procesu uz relativno mali broj eksperimentalnih pokušaja, poželjno prilikom optimizacije procesa.

Metoda odzivnih površina (eng. *Responce surface methodology*, RSM) je najčešće korišćena matematička i statistička metoda za modelovanje i analizu procesa kojom se prati uticaj više promenljivih tj. varijabli na odgovor od interesa. Cilj metode je da sagleda pojedinačne i međusobne uticaje različitih faktora na proces i da ih opiše matematičkom jednačinom koja omogućava da se optimizuje proces (Montgomery, 2005). Prednosti koje nudi RSM mogu se sumirati kao određivanje interakcije između nezavisnih varijabli, matematičko modelovanje procesa i ušteda vremena i troškova smanjenjem broja eksperimenata (Boyaci, 2005). Parametri koji utiču na proces se tretiraju kao nezavisne varijable, dok se odgovori tretiraju kao zavisne varijable (Koç i Kaymak-Ertekin, 2010). Pomoću RSM se ispituje/aproksimira odnos između ulaznih i izlaznih varijabli korišćenjem matematičkih modela koji omogućavaju identifikaciju optimalnih uslova rada za sistem koji se proučava (Farooq i dr., 2013; Pishgar-Komleh i dr., 2012). Box-Behnken dizajn (BBD) i centralni kompozitni dizajn (CCD) su dva najčešće korišćena eksperimentalna dizajna koja u metodi odzivnih površina (Koç i Kaymak-Ertekin, 2010). Kod centralnog kompozitnog dizajna, u model se uključuju i tačke koje se nalaze van eksperimentalnog prostora koju formiraju ugaone tačke potpunog faktorijalnog dizajna sa tri promenljive (Del Castillo, 2007). CCD se sastoji iz punog faktorijalnog dizajna sa 2^k eksperimenata, aksijalnog (zvezdastog) dizajna sa $2k$ eksperimenata i ponavljanja u centralnoj tački, gde je k broj procesnih promenljivih. Aksijalne tačke se nalaze na rastojanju α ($\pm\alpha = \pm\sqrt{k}$) od centralne tačke. U CCD se procesne promenljive ispituju na pet nivoa: $-\alpha$, -1 , 0 , $+1$ i $+\alpha$. Ponavljanjem centralne tačke omogućava se procena eksperimentalne greške. Ukupni broj eksperimentalnih ponavljanja kod CCD iznosi

$$N = 2^k + 2k + n_0$$

gde je N ukupan broj eksperimenata, k je broj promenljivih, a n_0 je broj ponavljanja u centralnoj tački.

Eksperimentalni podaci dobijeni variranjem procesnih varijabli u skladu sa odabranim eksperimentalnim dizajnom se procenjuju tako da se odnos između zavisnih i nezavisnih varijabli opiše odgovarajućim matematičkim modelom (linearni, kvadratni, kubni ili interakcijom dva faktora). Grafičkim prikazivanjem jednačina se dobijaju odzivne površine po kojima je metoda i dobila ime. Pored trodimenzionalnih odzivnih površina matematički modeli se mogu prikazati i konturnim dvodimenzionalnim dijagramima. Kada se posmatra uticaj više procesnih promenljivih odzivne površine se prikazuju u zavisnosti od dve procesne promenljive, dok ostale promenljive imaju konstantne vrednosti (Milutinovic, 2017).

U razvijenim matematičkim jednačinama definišu se koeficijenti modela, tj. konstantni član, linearni koeficijenti za nezavisne varijable, interaktivni koeficijenti, i ako je potrebno kvadratni i kubni koeficijenti. Adekvatnost modela se određuje na osnovu koeficijenta determinacije, nedostatka fitovanja i vrednosti adekvatne preciznosti; poređenjem modelom predviđenih vrednosti i eksperimentalno dobijenih vrednosti za zavisne varijable. Adekvatnost modela se tumači na osnovu koeficijenta determinacije (r^2), koji je mera odstupanja odzivne funkcije od eksperimentalno dobijenih rezultata. Nedostatak fitovanja poredi rezidualnu grešku (grešku ostatka) sa eksperimentalnom greškom izračunatom na osnovu ponavljanja eksperimenata u centralnoj tački.

Značajan nedostatak fitovanja ukazuje na neadekvatan model. Adekvatna preciznost meri odnos signala i šuma. Razvijeni matematički model se može smatrati adekvatnim kada je vrednost koeficijenta determinacije $r^2 > 0,9$ i adekvatna preciznost veća od 4. Razlike između modelom predviđenih i eksperimentalnih vrednosti mogu se testirati na statističku značajnost korišćenjem analize varijanse (ANOVA) (Aydar i dr., 2017).

Validnost modela, pored matematičkih procena vrši se u validacionom eksperimentu u kom se proces izvodi pri uslovima definisanim modelom tako da daju odgovarajuću vrednost izlazne promenljive. Nakon validacije dobijeni rezultati, tj. vrednosti zavisnih varijabli dobijenih u eksperimentu se porede sa vrednostima zavisnih varijabli (izlaznih promenljivih) koje su predviđene modelom i potrebno je da se uklapaju 95 % interval predviđanja. Jednom razvijeni matematički model može se koristiti za različito predviđanje izlaza sistema (vrednosti zavisno promenljivih) variranjem nezavisno promenljivih u okviru ispitivanog opsega (tzv. faktorsko polje).

Dizajn eksperimenata je najvažniji aspekt RSM. On ima za cilj odabir najpogodnijih tačaka tj. vrednosti ispitivanih nezavisno promenljivih gde odgovor, tj. zavisno promenljive procesa treba precizno ispitati. Izbor dizajna eksperimenta ima veliki efekat u određivanju ispravnosti konstrukcije odzivnih površina. U ovoj doktorskoj disertaciji u cilju određivanja optimalnih uslova za sušenje raspršivanjem tečnog ekstrakta hajdučke trave korišćeni su RSM i CCD pomoću softverskog paketa *Design Expert*. Ispitan je uticaj procesnih parametara sušenja raspršivanjem (temperatura, brzina protoka tečnog ekstrakta i sadržaj suve materije u tečnom ekstraktu) na prinos sušenja, ukupni sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost suvog ekstrakta hajdučke trave.

2.5.5. Polifenoli

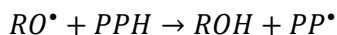
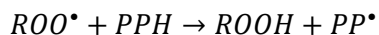
Polifenoli su heterogena grupa bioloških molekula koja spada u sekundarne metabolite biljaka. Ovi metaboliti su uključeni u odbranu biljaka; imaju inherentnu sklonost da doniraju vodonik i/ili elektrone i da deluju kao akceptori slobodnih radikala. Polifenoli štite biljke od patogena i ultraljubičastog zračenja a zbog značajnih razlika u strukturi biološku aktivnost ostvaruju preko više mehanizama delovanja (Moctezuma i dr., 2014). Zdravstveni efekti polifenola su veoma varijabilni i zavise od njihovog unosa i bioraspoloživosti (Han i dr., 2007; Scalbert i Williamson, 2000). Polifenoli pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti - antioksidativnu, antimikrobnu, antiinflamatornu, antifungalnu, anti-alergenu i druge (Bravo, 1998). Polifenoli u svojoj strukturi imaju barem jedan fenol (aromatičan prsten sa hidroksilnom grupom) i prema broju fenolnih jedinica se dele na jednostavne fenole, u koje spadaju fenolne kiseline i složene polifenole, koji se dele na kumarine, flavonoide, stilbene i lignane. Polimerizacijom daju složene polifenole, kao što su tanini i lignini. Dve osnovne strukture fenolnih kiselina ili fenolkarboksilnih kiselina su hidroksibenzoeva kiselina i hidroksicimetna kiselina i fenolne kiseline najčešće predstavljaju derivate ove dve kiseline. Kumarini su derivati benzopirona i široko su rasprostranjeni u prirodi. Flavonoidi su jedinjenja male molekulske mase izgrađeni od dva aromatična prstena koji su povezani sa tri ugljenikova atoma koji čine heterocikličan prsten. Različitim derivatima na heterocikličnom prstenu nastaju osnovne klase flavonoida: flavonoli, flavoni, izoflavoni, flavanoni, antocijanidini i flavanoli. U okviru svake klase flavonoida postoje različita jedinjenja koja se dobijaju supstitucijama na nekoj od pozicija u dva aromatična prstena. Te supstitucije su najčešće alkilovanje, glikozilacija, sulfonovanje ili acilovanje. Stilbeni imaju opštu formulu sličnu flavonoidima, s tim što su aromatični prstenovi povezani nizom od dva ugljenikova atoma. Lignani su bifenolna jedinjenja koja nastaju oksidativnim kuplovanjem dve jedinice monolignola (hidroksicimetnog alkohola) (Hano i Tungmunnithum, 2020).

Antioksidativna aktivnost polifenola je jedna od najznačajnijih bioloških aktivnosti za njihovu primenu u hrani i medicinskim sredstvima. Slobodni radikali su atomi, molekuli ili joni koji su veoma nestabilni i visoko reaktivni prema drugim molekulima, jer imaju jedan ili više nesparenih elektrona u spoljašnjoj orbitali. Slobodni radikali mogu da preuzmu ili daju svoj nespareni elektron drugom molekulu koji tada postaje slobodan radikal (Halliwell, 1989). Na taj način otpočinju lančanu reakciju, koja može da se zaustavi kada se slobodni radikali neutrališu antioksidansima ili kada se

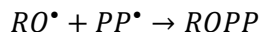
slobodni radikal spari sa drugim slobodnim radikalom (Halliwell, 2006). Slobodni radikali se konstantno proizvode u ćelijama tokom normalnih fizioloških procesa i nastaju tokom ćelijskog disanja i kao posledica odbrane organizma od virusa i bakterija. Ako se ne neutrališu, slobodni radikali oštećuju lipide, nukleinske kiseline, proteine, ugljene hidrate i enzime i tako oštećuju ćelije, pa dolazi do razvoja mnogih bolesti, kao što su kancer, kardiovaskularne bolesti, Alchajmerova, Parkinsonova bolest, inflamatorne bolesti, dijabetes i druge (Carocho i Ferreira, 2013; Fang i dr., 2002). Najznačajniju klasu slobodnih radikalskih vrsta u živim sistemima predstavljaju reaktivne kiseonične vrste, od kojih su najreaktivniji hidroksil radikal ($\bullet\text{OH}$) i alkoksil radikal ($\text{RO}\bullet$).

Antioksidansi su supstance koje neutrališu slobodne radikale, ali u isto vreme ne postaju nestabilni, tako da zaustavljaju lančane radikalske reakcije, jer nakon interakcije sa slobodnim radikalom nisu skloni redukciji. Antioksidansi su veoma značajni za održavanje fizioloških redoks sistema i u čoveku mogu biti endogenog porekla (ljudsko telo ih samo sintetise i mogu biti enzimski i neenzimski antioksidansi) i egzogenog porekla (uzimaju se preko hrane i to su npr. vitamin C, vitamin E i polifenoli).

Polifenoli kao antioksidansi deluju na slobodne radikale, doniranjem elektrona ili vodonikovog atoma, a princip delovanja može biti sledeći: polifenoli (PPH) doniraju vodonikov atom slobodnom radikal (ROO \bullet ili RO \bullet) i pri tome sami postaju radikali (fenoksil radikal PP \bullet). Ovaj radikal je stabilan, pa se prekida lančana reakcija oksidacije.



Nastali fenoksil radikal može da reaguje sa drugim radikalom i da ga na taj način neutrališe (Bravo, 1998).



Pored toga što mogu biti dobri antioksidansi, polifenolna jedinjenja pokazuju i antimikrobnu aktivnost. Tačan mehanizam dejstva polifenolnih jedinjenja kao antimikrobnih agensa nije u potpunosti razjašnjen. Jedno od mogućih objašnjenja bi bilo da polifenoli utiču na propustljivost citoplazmatične membrane ćelije, pa dolazi do gubitka molekula iz unutrašnjosti ćelije (Hayek i dr., 2013). Drugi mogući mehanizam delovanja polifenolnih jedinjenja je interakcija sa membranskim proteinima, pri čemu se narušava struktura ovih proteina, a posledično i funkcionalnost ćelije. Efekat polifenolnih jedinjenja zavisi od koncentracije, tako da pri malim koncentracijama oni utiču na aktivnost enzima, dok pri većim koncentracijama izazivaju denaturaciju proteina (Hayek i dr., 2013). Gram-pozitivne bakterije su osetljivije na delovanje fenolnih kiselina, što je objašnjeno narušavanjem potencijala ćelijske membrane, čime se povećava njena propustljivost. Međutim, Gram-negativne bakterije imaju spoljašnju membranu koja onemogućava difuziju fenolnih kiselina, što ih čini otpornijim od Gram-pozitivnih bakterija (Cueva i dr., 2010).

2.6. Kateterizacija urinarnog trakta

2.6.1. Urinarni kateteri

Urinarni kateteri se koriste za uklanjanje urina iz tela, odnosno u tretmanu urinarne inkontinencije, tj. zadržavanja mokraće i/ili tokom hospitalizacije posle medicinskih intervencija poput hirurških zahvata. Primitivni urinarni kateteri su korišćeni još od trećeg veka pre nove ere, od strane Grka, Egipćana i Kineza, ali prvi zabeleženi savitljivi urinarni kateter napravio je zlatar Bernard tek 1779. godine (Lawrence i Turner, 2005). Za izradu primitivnih urinarnih katetera korišćeni su bakar, kalaj, bronza, zlato, olovo, papirus, stabljike luka, osušena trska i palmino lišće.

U novije vreme, materijali kao što su elastična guma, plastični (poli(vinilhlorid), poliuretani, silikonske i lateks gume) su korišćeni zbog svojih pogodnih svojstava (Nacey i Delahijnt, 1993; Johnson i dr., 2006). Ovi materijali poseduju karakteristike poželjne za kateter: visoku zateznu čvrstoću, mekoću i savitljivost, inherentnu otpornost na hemikalije, kao i biokompatibilnost. Lateks je prvi sintetički polimer koji se koristio za izradu katetera ili sam ili modifikovan sa hidrogelom ili teflonskim premazima. Ipak, njegova relativno loša UV i hemijska otpornost, slabo prijanjanje i moguće alergijske reakcije čine ga nepoželjnim materijalom za izradu katetera (Lawrence i Turner, 2005). Analizom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) je primećeno da hrapava površina lateksa može da podstakne formiranje biofilma što povećava rizik od infekcije pri aplikaciji ovakvog katetera (Siddiq i Darouiche, 2012). Danas se najčešće koriste gumeni i silikonski kateteri jer nemaju nijednu od nepovoljnih karakteristika lateks katetera. U poređenju sa lateks kateterima, silikonski kateteri izazivaju manje povreda prilikom aplikacije i značajno smanjuju iritaciju urinarnu sluzokožu, pa se kod pacijenata kojima je potreban dugotrajan urinarni kateter predlaže upotreba silikonskog katetera (Huang i dr., 2005).

Pored materijala za izradu, i dizajn katetera se menjao tokom godina. Promene u dizajnu uključuju i npr. balon koji se koristi za držanje katetera na mokraćnoj bešici i razvoj modernog unutrašnjeg katetera, takođe nazvanog „Foley“ kateter, koji je dizajnirao dr Frederik Folij (Frederick B. Foley) sredinom 1930-ih (Lawrence i Turner, 2005). Ova evolucija materijala i dizajna je uslovljena potrebom za boljom efikasnošću i udobnošću koju kateter može da pruži pacijentu, zajedno sa dostupnošću materijala i tehnologije.

Trenutno postoji nekoliko vrsta dizajna katetera koji služe u različite svrhe. U zavisnosti od kliničke indikacije, trajanje kateterizacije može biti kratkotrajno ili dugotrajno. Kateteri za jednokratnu upotrebu se menjaju svakodnevno, kateteri povremene ili kratkotrajne upotrebe koriste se nekoliko nedelja, dok se dugotrajni urinarni kateter definiše kao onaj koji se koristi duže od 30 dana (Feneley i dr., 2015). Najveći problem vezan za urinarnu kateterizaciju su infekcije. Uprkos naporima osoblja koji rukuje kateterom da se izbegne kontaminacija i naknadne infekcije, kateteri su i dalje podložni akumulaciji mikroorganizama. Na urinarnim kateterima, mikroorganizmi se mogu akumulirati i formirati biofilmove. Pojedine mikrobne vrste se toliko brzo razmnožavaju da njihovi biofilmovi mogu pokriti čak i kratkoročne katetere u periodu od samo 24 sata. Ukoliko se na kateteru razvije biofilm to predstavlja ozbiljan hazard za razvoj infekcije. Infekcija se javlja kod 10-50 % pacijenata koji su podvrgnuti kratkotrajnoj urinarnoj kateterizaciji (7 dana), ali praktično svi pacijenti podvrgnuti dugotrajnoj kateterizaciji u nekom trenutku budu inficirani (Donlan, 2001).

Infekcije urinarnog trakta povezane sa kateterizacijom imaju godišnju učestalost od milion slučajeva samo u SAD (Tambyah i Maki, 2000), dok je skoro 80 % bolničkih infekcija širom sveta nastalo usled kateterizacije urinarnog trakta (Lo i dr., 2014). Ovako velika incidenca infekcije u vezi sa upotrebom urinarnih katetera je povezana sa činjenicom da 15-25 % svih hospitalizovanih pacijenata koristi urinarnu katetere (Warren, 1997). Infekcija urinarnog trakta se definiše kao invazija bilo kog dela urinarnog sistema bakterijskim ili gljivičnim patogenom (Wagenlehner i Naber, 2006). Infekcija urinarnog trakta se može razviti nezavisno od kateterizacije, a termin „infekcija urinarnog trakta povezana sa kateterizacijom“ se koristi za infekcije nastale kod pacijenata koji su kateterizovani duže od 24 sata i kod kojih simptomi infekcije urinarnog trakta nastanu u roku od 48 sati od kateterizacije. Infekcija urinarnog trakta povezana sa kateterizacijom, kada se ne leči, može izazvati infekcije u bubrežima i krvotoku (Bursle i dr., 2015), što može dovesti do sepse i, u ekstremnim slučajevima, do smrti. Urinarni kateter, delimično implantirani uređaj, povećava sklonost pacijenta infekcijama, uglavnom zbog unakrsne kontaminacije iz drenažne kese i bogate mikrobiote kože. Ova osetljivost se dodatno povećava sa vremenom trajanja kateterizacije, jer omogućava bakterijama da se razmnožavaju i stvaraju biofilm na površini katetera. Neke od najčešćih bakterija koje izazivaju infekciju urinarnog trakta povezanu sa kateterizacijom su *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* i *Klebsiella pneumoniae* (Donlan, 2001).

Infekcija urinarnog trakta povezana sa kateterizacijom je vrlo rasprostranjena i stimulisala je razvoj antimikrobnih materijala pogodnih za proizvodnju ili oblaganje urinarnih katetera. Različiti pristupi mogu pomoći da se spreči infekcija urinarnog trakta povezana sa kateterizacijom, kao što je sterilno rukovanje kateterima, izrada obloga za urinarne katetere, poboljšanje dizajna katetera i naglašavanje kratkoročne upotrebe. Takođe, materijali koji kombinuju poznate i nove antimikrobne agense sa povećanjem efikasnosti omogućili su ogroman napredak. Primeri u istraživanjima i/ili kliničkoj praksi uključuju implementaciju legure srebra, najčešće korišćenog antimikrobnog materijala, modifikovanog plazmom i srebro-nitratom i upotrebu antibiotika kao što su rifampin i sparfloksacin u kombinaciji sa antisepticima kao što je triklosan u materijalu od kog je izrađen kateter (Singha i dr., 2017). Dok lista antimikrobnih agensa zajedno sa novim formulacijama nastavlja da se širi u cilju borbe protiv infekcije urinarnog trakta povezane sa kateterizacijom značajan potencijal imaju i premazi za katetere kao i materijali za oblaganje urinarnih katetera.

2.6.2. Materijali za oblaganje urinarnih katetera

Infekcija urinarnog trakta povezana sa kateterizacijom je vrlo rasprostranjena i najčešće nastaje kolonizacijom bakterija i formiranjem biofilma na kateteru. Primena modifikovanih katetera sa antibakterijskim agensima mogla bi značajno smanjiti rizik za razvoj komplikacija izazvanih infekcijama kod pacijenata koji zahtevaju urinarnu kateterizaciju. Nekoliko agensa/materijala za oblaganje urinarnih katetera sa antimikrobnim svojstvima uključujući nanočestice srebra i komercijalne antibiotike je klinički testirano. Pokazano je da su premazi sa antibioticima efikasniji od premaza legura srebra protiv infekcija uzrokovanih većinom Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (Johnson i dr., 2012). Modifikacije poliuretanskih katetera (poliuretanski akrilatni polimer koji oslobađa salicilnu kiselinu iz obloge na unutrašnjem delu katetera) pokazale su supresiju rasta patogenih bakterija *P. aeruginosa* i *E. coli* (Nowatzki i dr., 2012). Efikasnost premaza napravljenih od antimikrobnih peptida, enzima i modifikacija polimernih prevlaka testirana je samo u laboratorijskim uslovima (Singha i dr., 2017). Oblaganjem komercijalnog urinarnog katetera slojem samopolimerizovanog polidopamina koji deluje kao aktivna platforma za *in situ* formiranje nanočestica srebra na površini katetera, dobijen je obloženi kateter koji ima potencijal da kontinualno oslobađa jone srebra. Stoga ovako obložen kateter ima značajan baktericidni potencijal na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, pri čemu je on izraženiji prema Gram-pozitivnim bakterijama. Za razliku od komercijalnih katetera, kateter obložen nančesticama srebra sprečio je prijanjanje bakterijskih ćelija i stvaranje biofilma na površini (Yassim i dr., 2019). Superhidrofobna prevlaka za katetere je pripremljena tehnikom kontinualnog taloženja „sloj-po-sloj“ polidopamina i nanočestica srebra na površinu katetera, nakon čega je usledila hidrofobna modifikacija sa 1H,1H,2H,2H-perfluorodekalin etiolom. Koristeći sinergistički efekat hijerarhijskih mikro/nanostrukture i antibakterijskih nanočestica srebra, pripremljeni kateteri su pokazali izrazitu superhidrofobnost i produženu antibakterijsku aktivnost na *E. coli* i *Proteus mirabilis*. U poređenju sa komercijalnim silikonskim i hidrogelnim kateterima od legure srebra, superhidrofobni kateter je pokazao najizraženiji efekat protiv stvaranja biofilma i u statičkim i u dinamičkim modelima. U *in vitro* modelu bešike, migracija bakterija duž površine katetera je bila efikasno odložena, smanjujući akumulaciju mikrobine biomase do 55 i 90 % u poređenju sa silikonskim i hidrogelnim kateterima od legure srebra. Superhidrofobni kateter je takođe pokazao dobru biokompatibilnost sa fibroblastima miša, ukazujući na mogućnost primene ovakvih urinarnih katetera (Zhang i dr., 2020). Novodizajnirani antimikrobni peptid „Chain201D“ je proučavan u kontekstu sprečavanja infekcija povezanih sa urinarnom kateterizacijom. „Chain201D“ je pokazao odličnu antimikrobnu aktivnost protiv relevantnih sojeva bakterija i kvasca i pokazao visoku stabilnost u širokom opsegu temperatura, pH i koncentracija soli. Baktericidna aktivnost peptida „Chain201D“ imobilizovanog na površini urinarnog katetera ispitana je na više vrsta patogenih bakterija i gljivica iz roda *Candida* a rezultati su pokazali širok spektar aktivnosti ovog peptida na Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije i gljivice, ukazujući na odličan potencijal ovog bioaktivnog peptida za razvoj antimikrobnih urinarnih katetera (Monteiro i dr., 2019). Polidimetilsiloksan pomešan sa prahom srebra i cinka se lako

primenjuje kao premaz na postojeće silikonske katetere i efikasan je u inhibiciji stvaranja biofilma. U ovom ispitanom sistemu pokazano je da jedinstvena formulacija premaza od cinka i srebra inhibira biofilm i rast *E. coli* tokom 6 dana, što je verovatno povezano sa oslobađanjem jona teških metala (Gotlib i dr., 2021).

Do sada još uvek nije ispitano oblaganje komercijalno dostupnih katetera nanovlaknastim matovima sa biološki aktivnim sustancama ni u kontekstu adhezije između površine katetera i materijala prevlake, kao ni eventualno biološko dejstvo ovakvih sistema. Imajući u vidu veliki broj prednosti nanovlaknastih matova kao nosača biološki aktivnih materija, u ovoj doktorskoj disertaciji ispitana je mogućnost procesiranja nanovlaknastih materijala metodom elektropredenja pogodnih za oblaganje komercijalno dostupnih katetera. Kako postoje dve vrste katetera: kratkoročni kateteri koji se koriste između 1 i 14 dana i dugoročni kateteri koji se obično menjaju svakih 4-8 nedelja (Fisher i dr., 2015), procesiranjem nanovlaknastih struktura cilj je bio da se obezbedi oslobađanje leka za oba zahtevana perioda. U ovoj doktorskoj disertaciji korišćen je komercijalni antibiotik i tri različite strategije elektropredenja i ispitana je antibakterijska aktivnost nanovlaknastih matova sa različitom dinamikom oslobađanja leka. Pored komercijalnog antibiotika testirana je mogućnost inkorporacije prirodnog agensa, osušenog ekstrakta hajdučke trave, sa antibakterijskom, ali i antioksidativnom aktivnošću, u cilju dobijanja multifunkcionalnog biomaterijala. Kao polimerni materijal korišćen je PCL, a testirana je mogućnost primene dobijenih nanovlaknastih matova sa antibakterijskim dejstvom za oblaganje biološki inertnih polimernih urinarnih katetera.

3. CILJEVI RADA

Cilj ove doktorske disertacije je razvoj novih multifunkcionalnih biomaterijala kao nosača lekova pogodnih za oblaganje urinarnih katetera.

Specifični ciljevi se mogu podeliti na četiri grupe:

- procesiranje nanovlakana na bazi PCL sa inkorporiranim komercijalnim antibiotikom cefazolinom, korišćenjem različitih metoda elektropredenja, uključujući elektropredenje iz rastvora, emulziono i koaksijalno elektropredenje;
- optimizacija uslova sušenja raspršivanjem tečnog ekstrakta hajdučke trave pomoću statističke metode odzivne površine, sa ciljem dobijanja ekstrakta sa očuvanim biološkim svojstvima pogodnog za inkorporaciju u biomaterijal;
- procesiranje PCL nanovlakana sa dodatkom suvog ekstrakta hajdučke trave u cilju dobijanja materijala pogodnog za oblaganje katetera sa višestrukom biološkom aktivnošću i poboljšanim mehaničkim svojstvima;
- ispitivanje mogućnosti oblaganja komercijalnih katetera novim multifunkcionalnim biomaterijalima uz evaluaciju očuvanja biološke aktivnosti nanovlakana, kao mere pogodnosti materijala za sprečavanje infekcija izazvanih urinarnom kateterizacijom.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

Eksperimentalni deo doktorske disertacije obuhvata opis procesiranja i karakterizacije biomaterijala na bazi PCL kao i proces optimizacije sušenja ekstrakta hajdučke trave. Eksperimentalna istraživanja izvedena su na Katedri za Konstrukcione i specijalne materijale i na Katedri za Biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju na Tehnološko-metalurškom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.

4.1. Materijali i oprema

4.1.1. Materijali

Hemikalije i reagensi:

- Poli(ϵ -kapolakton) (PCL), $((C_6H_{10}O_2)_n$, $M_n = 80000$ g/mol), granule „Sigma-Aldrich“, Sent Luis, Misuri, SAD
- N, N- dimetilformamid (DMF), (C_3H_7NO) , „Sigma-Aldrich“, Sent Luis, Misuri, SAD
- Dihlorometan (DCM), (CH_2Cl_2) , „Sigma-Aldrich“, Sent Luis, Misuri, SAD
- 2, 2, 2-trifluoroetanol (TFE), „Sigma-Aldrich“, Sent Luis, Misuri, SAD
- Hloroform $(CHCl_3)$, „Sigma-Aldrich“, Sent Luis, Misuri, SAD
- Metanol (CH_3OH) , „Sigma-Aldrich“, Sent Luis, Misuri, SAD, „Zorka farma“, Šabac, Srbija
- Etanol 96 % (C_2H_5OH) , „Zorka farma“, Šabac, Srbija
- Fosfatni pufer (PBS) tablete, vodeni rastvor soli: dinatrijum fosfat (Na_2HPO_4) , natrijum hlorid $(NaCl)$, kalijum hlorid (KCl) i kalijum dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) „Fisher Scientific“, SAD
- Cefazolin $(C_{14}H_{14}N_8O_4S_3)$, „Pharmanova“, Beograd, Srbija
- Otpadni prah hajdučke trave, Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, Beograd, Srbija
- Resazurin $(C_{12}H_7NO_4)$, $M_n = 229,188$ g/mol), „Acros Organics“, Geel, Belgija
- Folin-Ciocalteus reagens, „Merck“, Darmstadt, Nemačka
- Galna kiselina $(C_7H_6O_5)$, „Sigma-Aldrich“, Štajnhajm, Nemačka
- Natrijum-karbonat (Na_2CO_3) , „Lach-Ner“, Neratovice, Češka Republika
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH, $C_{18}H_{12}N_5O_6$), „Sigma-Aldrich“, Štajnhajm, Nemačka
- Adheziv n-butyl-2-cijanoakrilat, $C_8H_{11}NO_2$, „GluStitch“ Kanada

Sve navedene hemikalije i reagensi su upotrebljeni u obliku dobijenom od proizvođača, bez dodatnog prečišćavanja.

Mikrobiološke podloge:

- Tripton soja bujon (TSB), „Torlak“, Beograd, Srbija
- Agar, „Torlak“, Beograd, Srbija
- Kvaščevo ekstrakt, „Torlak“, Beograd, Srbija

Da bi se dobila TSB hranljiva podloga, 30 g gotove podloge je rastvoreno u 1 l destilovane vode i dodato je 6 g kvaščevo ekstrakta (konačna koncentracija je bila 0,6 %). Tripton soja agar (TSA) hranljiva podloga je sadržala 30 g gotove TSB podloge rastvorene u 1 l destilovane vode uz dodatak 6 g kvaščevo ekstrakta (konačna koncentracija 0,6 %) i 15 g agara. Top TSA je pripremljen na isti način kao TSA uz manji procenat agara (0,6 %). Podloge su kuvane 15 minuta, a zatim sterilisane u autoklavu 30 minuta na 120 °C.

Mikroorganizmi:

- Patogeni indikatorski mikroorganizmi: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 i *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

4.1.2. Oprema

- Analitička vaga, Kern ABS, Nemačka
- Magnetna mešalica, Heidolph MR3001, Nemačka
- Uređaj za elektropredenje CH-01, Linari Engineering, Italija
- Skenirajući elektronski mikroskop JSM 5800, Tescan Mira 3, Brno-Kohoutovice, Češka Republika
- Infracrveni spektroskop sa Furijeovom transformacijom BOMEM Michelson, MB-Series, Ontario, Kanada
- Diferencijalni skenirajući kalorimetar Q10 TA Instruments, Krolj, Velika Britanija
- Uređaj za ispitivanje mehaničkih svojstava, Texture Analyzer Shimadzu EZ Test LX, Kyoto, Japan
- UV/Vis spektrofotometar ultrospec 3300 pro, Amersham Bioscience, Švedska
- Rotirajući šejker PSU-10i, Grant-bio, Grant Instruments Ltd., Kembridž, Velika Britanija
- Termostatski inkubator MBIN50 mikrobiološki inkubator, Colo Lab Experts, Novo Mesto, Slovenija
- UV sterilizator, Captair Bio, Erlab, Keln, Nemačka
- Densitometar, DEN-1B, Biosan, Letonija
- Vortex, „IKA“, Nemačka
- Mikrotalasna peč, Samsung Electronics Euro QA Lab, Velika Britanija
- Vakuum pumpa V-700, Büchi, Fanil, Švajcarska
- Vakuum uparivač, Büchi, Fanil, Švajcarska
- Uređaj za sušenje raspršivanjem, Büchi Mini Spray Dryer B-290, Švajcarska
- Vlagomer, Kern DBS, Balingen, Nemačka
- Automatska mikropipeta (10-100 µl), LLG, Nemačka
- Automatska mikropipeta (100-1000 µl), LLG, Nemačka
- Automatska mikropipeta (1-10 ml), Thermo Scientific, Vanta, Finska

4.2. Metode procesiranja nanovlakana

Nanovlaknasti matovi sa i bez cefazolina dobijeni su korišćenjem tri različite metode elektropredenja (tabela 4.1.). Rastvor PCL1 napravljen je rastvaranjem PCL granula u smeši rastvarača DMF/DCM (1:4) i procesiran metodom elektropredenja iz rastvora. Tokom procesa elektropredenja, primenjen je napon od 20 kV, dok je protok rastvora bio 2 ml/h. Emulzioni rastvor PCL2 je pripremljen rastvaranjem PCL u smeši rastvarača hloroform/metanol (4:1) sa dodatkom surfakanta Span-80 (1% v/v) i procesiran elektropredenjem iz rastvora sa primenjenim naponom od 16 kV i protokom rastvora od 8 ml/h. Nanovlakana dobijena koaksijalnim elektropredenjem su napravljena korišćenjem dva rastvora PCL. PCL je rastvoren u TFE (4 mas%) za dobijanje rastvora „omotača“ i PCL rastvoren u TFE (8 mas%) za dobijanje rastvora „jezgra“ koji su procesirani pri korišćenu naponu od 30 kV i protoku rastvora „jezgra“ od 0,6 ml/h i protoku rastvora „omotača“ od 1 ml/h. Rastvori PCL su pripremani, nezavisno od vrste rastvarača, mešanjem tokom 24 h na magnetnoj mešalici pri 200 o/min na sobnoj temperaturi pre procesa elektropredenja.

Pod istim uslovima pod kojima su dobijena PCL nanovlakna pomoću tri metode elektropredenja proizvedena su nanovlakana sa dodatkom 20 % cefazolina. S1 nanovlaknasti mat je dobijen rastvaranjem PCL u smeši rastvarača DMF/DCM (1:4) uz dodatak antibiotika koji je direktno rastvoren u smeši rastvarača DMF/DCM i procesiran metodom elektropredenja iz rastvora pod istim uslovima kao i materijal PCL1. S2 nanovlaknasti mat je dobijen rastvaranjem PCL u smeši rastvarača hloroform/metanol (4:1) sa dodatkom surfakanta Span-80 (1 % v/v). Ovaj rastvor je mešan na magnetnoj mešalici pri 200 o/min na sobnoj temperaturi tokom 24 h. U ovaj polimerni rastvor je polako ukapan vodeni rastvor antibiotika, kako bi se formirala v/u emulzija i smeša je dodatno mešana 2 h, nakon čega je usledilo elektropredenje. S3 nanovlaknasti mat je dobijen koaksijalnim elektropredenjem, pri čemu je rastvor za omotač dobijen rastvaranjem PCL u TFE (4 mas%), a rastvor za jezgro rastvaranjem PCL u TFE (8 mas%) uz dodatak antibiotika (prethodno rastvorenog u vodi).

Tabela 4.1. Formulacije, karakteristike i uslovi elektropredenja PCL nanovlakana sa cefazolinom

Formulacija PCL nanovlakana sa cefazolinom	PCL1/S1	PCL2/S2	PCL3/S3
Sadržaj cefazolina prema polimeru (mas%)		20	
Rastvarači	DMF/DCM (1:4)	hloroform/metanol (4:1)	TFE
Vrsta procesa	Elektropredenje iz rastvora	Emulziono elektropredenje	Koaksijalno elektropredenje
Protok (ml/h)	2	8	0,6/1
Napon (kV)	20	16	30
Rastojanje (cm)	10	10	10

PCL nanovlakna sa ekstraktom hajdučke trave su procesirana metodom elektropredenja iz rastvora sa primenjenim naponom od 29 kV i protocima rastvora od 3 ml/h (tabela 4.2.). Rastvor PCL (8 mas%) je pripremljen rastvaranjem PCL granula u TFE i mešan na magnetnoj mešalici pri 200 o/min na sobnoj temperaturi tokom 24 h. Rastvori suvog ekstrakta hajdučke trave u TFE su pripremljeni odvojeno i mešani na magnetnoj mešalici pri 200 o/min 24 h, na sobnoj temperaturi. Pre mešanja sa rastvorom PCL, rastvor suvog ekstrakta hajdučke trave u TFE je tretiran ultrazvukom u ultrazvučnom kupatilu. Rastvor PCL je pomešan sa rastvorom hajdučke trave u različitim odnosima i dodatno mešan 2 h da bi došlo do homogenizacije rastvora. Suvi ekstrakt hajdučke trave je dodat u PCL rastvor u četiri različite koncentracije: 5 mas%, 10 mas%, 15 mas% i 20 mas% (označeni kao

PCL/HT5, PCL/HT10, PCL/HT15 i PCL/HT20, redom). Procenat suvog ekstrakta hajdučke trave je izračunat kao sadržaj suve materije u odnosu na masu polimera.

Tabela 4.2. Formulacije, karakteristike i uslovi elektropredenja PCL nanovlakana sa ekstraktom hajdučke trave

Formulacija PCL nanovlakana sa suvim ekstraktom hajdučke trave	PCL/HT5	PCL/HT10	PCL/HT15	PCL/HT20
Sadržaj suvog ekstrakta hajdučke trave prema polimeru (mas%)	5	10	15	20
Rastvarač	TFE			
Vrsta procesa	Elektropredenje iz rastvora			
Protok (ml/h)	3			
Napon (kV)	29			
Rastojanje (cm)	10			

Tokom svih eksperimenata, polimerni rastvori sa ili bez cefazolina i suvog ekstrakta hajdučke trave su injektovani iz plastičnog šprica zapremine 20 ml u metalnu iglu (unutrašnjeg prečnika 1 mm) pri udaljenosti 10 cm od vrha igle do kolektora. Nakon procesiranja, nanovlaknasti matovi su ostavljeni da se osuše 24 h na 25 °C u vakuum sušnici. Svi eksperimenti su izvedeni u zatvorenom digestoru, na sobnoj temperaturi i relativnoj vlažnosti vazduha ispod 40 %.

4.3. Metode dobijanja ekstrakta hajdučke trave

4.3.1. Priprema tečnog ekstrakta hajdučke trave

Eksperimentalni materijal je bio fini prah (veličina čestica u opsegu od 0,3 do 1,0 mm) odbačen nakon proizvodnje čaja hajdučke trave (*Achillea millefolium* L.) u Institutu za proizvodnju i ispitivanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“. Prah hajdučke trave čuvan je u mraku, na sobnoj temperaturi u papirnim kesama.

Tečni ekstrakt hajdučke trave je dobijen metodom mikrotalasne ekstrakcije (eng. *Microwave-assisted extraction*, MAE) korišćenjem uslova koji su prethodno optimizovani u cilju dobijanja maksimalnog sadržaja ukupnih polifenola i biološke aktivnosti ekstrakta *A. millefolium* L. (Milutinovic i dr., 2015). Ukratko, otpadni prah hajdučke trave pomešan je sa 70 % etanolom u odnosu tečna/čvrsta faza 40 ml/g u ukupnoj zapremini od 420 ml. Ekstrakcija je izvedena u mikrotalasnoj pećnici u trajanju od 30 s pri snazi od 600 W. Dobijeni tečni ekstrakt je odvojen od čvrste faze filtriranjem pomoću vakuum pumpe i koncentrovan u rotacionom uparivaču pri vakuuomskom pritisku od 150 mbar i temperaturi 60 °C. Nakon procesa isparavanja, sadržaj suve materije u ekstraktima je određen pomoću analizatora vlage (vlagomer). Tečni ekstrakt je čuvan u frižideru (4 °C) i korišćen dalje u eksperimentalnom procesu sušenja raspršivanjem. Proces dobijanja tečnog ekstrakta prikazan je šematki na slici 4.1.



Slika 4.1. Šema procesa dobijanja tečnog ekstrakta hajdučke trave

4.3.2. Sušenje raspršivanjem tečnog ekstrakta hajdučke trave

Sušenje ekstrakta hajdučke trave vršeno je sprej raspršivanjem tečnih ekstrakata (200 ml) različitog sadržaja suve materije. Tečni ekstrakt hajdučke trave je dovođen u komoru za sušenje peristaltičkom pumpom povezanom raspršivačem sa dva fluida koji je povezan sa vazdušnim kompresorom. Kompresor potiskuje vazduh u spoljnu cev mlaznice što dovodi do toga da tečnost izlazi kao fini, raspršeni sprej koji se pod dejstvom zagrejanog vazduha suši. Sistem za dovod gasa za sušenje se sastojao od kompresora i vazdušnog filtera. Osušeni proizvod je sakupljen u ciklonu i čuvan u frižideru na 4 °C za dalje korišćenje.

4.3.3. Optimizacija uslova sušenja raspršivanjem

Da bi se odredili optimalni uslovi sušenja raspršivanjem tečnog ekstrakta hajdučke trave, u cilju dobijanja maksimalnog prinosa, maksimalnog sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti, korišćena je metoda odzivnih površina i CCD dizajn.

Prema eksperimentalnom dizajnu, sušenje raspršivanjem je izvedeno pri promenljivim temperaturama ulaznog vazduha (95-195 °C), brzinama protoka (3-21 ml/min) i sadržaju suve materije u tečnim ekstraktima (0,3-1,5 %) (tabela 4.3.). Izvedeno je 23 eksperimenta sušenja raspršivanjem i praćen je uticaj ovih procesnih promenljivih na tri odziva sistema - prinos, ukupan sadržaj polifenola i antioksidativna aktivnost u osušenom ekstraktu hajdučke trave.

Tabela 4.3. Stvarne i kodirane vrednosti procesnih promenljivih

Procesna promenljiva	Granične vrednosti				
	-1	0	+1	Aksijalne (- α)	Aksijalne (+ α)
A: Tempertura (°C)	120	145	170	95	195
B: Brzina protoka (ml/min)	7,5	12	16,5	3	21
C: Sadržaj suve materije (%)	0,6	0,9	1,2	0,3	1,5

Za analizu eksperimentalnih podataka korišćen je statistički paket *Design-Expert* (Verzija 8, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, SAD). Eksperimentalni podaci su modelovani kubnom jednačinom. Analizom varijanse (ANOVA) ocenjena je adekvatnost i statistička značajnost svih predloženih matematičkih modela. Prilikom analize korišćena je „backward“ regresija, pomoću koje su iz modela eliminisani članovi koji nisu značajno uticali na odziv ($p > 0,1$) a validnost modela u redukovanom

obliku je validirana na osnovu eksperimentalnih podataka. Na kraju je izvršena validacija modela izvođenjem dodatnog eksperimenta koristeći optimalne uslove za dobijanje maksimalnog prinosa i maksimalne antioksidativne aktivnosti ekstrakta predviđene metodom odzivnih površina. Suvi ekstrakt hajdučke trave dobijen pod optimalnim uslovima sušenja korišćen je u ovoj doktorskoj disertaciji za dalje procesiranje materijala.

4.3.3.1. Prinos osušenog ekstrakta

Prinos sušenja ekstrakta hajdučke trave je izračunat kao odnos mase suve materije u osušenom ekstraktu i mase suve materije u tečnom ekstraktu i izražen u procentima u skladu sa jednačinom 4.1:

$$\text{Prinos sušenja} = \frac{m_{se} m_{se}}{m_{te} V_{te}} * 100 \% \quad (4.1)$$

pri čemu je m_{se} sadržaj suve materije u osušenom ekstraktu, m_{se} masa suvog ekstrakta, m_{te} sadržaj suve materije u tečnom ekstraktu hajdučke trave i V_{te} zapremina tečnog ekstrakta. Sadržaj suve materije u ekstraktima je određen pomoću analizatora vlage tj. vlagomera.

4.4. Oblaganje komercijalno dostupnih katetera nanovlaknastim matom

Gumeni i silikonski kateteri isečeni su u cilindrične oblike dužine 6 mm i prečnika 7 mm i sterilisani u 70 % etanolu. Oko svakog katetera nanet je tanak sloj adheziva n-butil-2-cijanoakrilat i preko njih pričvršćeni PCL nanovlaknasti mat sa cefazolinom ili PCL nanovlaknasti mat sa suvim ekstraktom hajdučke trave, koji je prethodno UV sterilisan osvetljavanjem na 10 minuta sa obe strane. Na katetere su naneti nanovlaknasti matovi bez aktivne supstance, sa 20 mas% cefazolina i sa 10 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave dobijeni elektropredenjem iz rastvora pod uslovima definisanim u odeljku 4.2. Obloženi kateteri su ostavljeni tokom noći, na sobnoj temperaturi, u cilju što potpunije adhezije između katetera i nanovlaknastih matova.

4.5. Metode karakterizacije materijala

4.5.1. Morfološka karakterizacija materijala

Mikroskopi kod kojih postoji mogućnost programiranog pomeranja elektronskog snopa (skeniranja) po površini posmatranog objekta i koji formiraju lik objekta na bazi reflektovanog snopa elektrona, nazivaju se skenirajući elektronski mikroskopi sa emisijom polja (eng. *Field Emission Scanning Electron Microscope*, FE-SEM). Da bi bili posmatrani pomoću FE-SEM, uzorci se uparavaju u inertnoj atmosferi zlatom ili legurom zlato-paladijum. Elektroni se oslobađaju iz izvora emisije polja i ubrzavaju u električnom polju velikog gradijenta. Unutar kolone visokog vakuuma primarni elektroni se fokusiraju i odbijaju elektronskim sočivima kako bi se proizveo uski snop skeniranja koji „bombarduje“ objekat. Posledično, sekundarni elektroni se emituju sa svake tačke na objektu. Pravac i brzina kretanja sekundarnih elektrona zavise od oblika i ispitivanog objekta. Detektor hvata sekundarne elektrone i proizvodi elektronski signal. Ovaj signal se pojačava i transformiše u video skeniranu sliku koja se može videti na monitoru ili u formi digitalne slike koja se može sačuvati i dalje obraditi.

Skenirajuća elektronska mikroskopija sa emisijom polja je korišćena kao metoda za vizuelnu evaluaciju kvaliteta nanovlaknastih matova dobijenih u okviru ove doktorske disertacije. Pet FE-SEM slika svakog uzorka je korišćeno za određivanje prosečnog prečnika nanovlakana. Pomoću softvera *Image-Pro Plus* izmereno je oko sto nasumično odabranih nanovlakana sa svake slike i na osnovu merenja je određen srednji prečnik i standardna devijacija prečnika nanovlakana.

4.5.2. Ispitivanje hemijskih interakcija u materijalima

Metoda za identifikaciju hemijskih veza prisutnih u različitim supstancama i materijalima koristi se infracrvena spektroskopija sa Furijevom transformacijom (eng. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR). Tokom procesiranja materijala, ovom metodom ispituje se stabilnost polaznih komponentata kao i eventualno nastajanje novih hemijskih veza u materijalu. Kada se kroz prostor ispunjen nekom supstancom (u bilo kom agregatnom stanju) propusti snop infracrvenog (IC) zračenja, koji se zatim optičkom prizmom (ili rešetkom) razloži na monohromatske komponente, primećuje se, pomoću odgovarajućeg detektora, da na pojedinim frekvencijama dolazi do većeg ili manjeg slabljenja jačine svetlosti zbog selektivne apsorpcije IC zračenja od strane molekula koji sa tim zračenjem dolaze u dodir. Korišćenjem ove metode, može se iz malih pomaka traka u spektru zaključivati o postojanju određenog tipa hemijskih veza.

Hemijske strukture cefazolina, suvog ekstrakta hajdučke trave, PCL nanovlakna, kao i njihove eventualne hemijske interakcije u netkanim nanovlaknastim matovima PCL sa cefazolinom i sa suvim ekstraktom hajdučke trave proučavane su FTIR spektroskopijom. Spektri su snimljeni u opsegu 4000-400 cm^{-1} sa rezolucijom od 4 cm^{-1} , na sobnoj temperaturi i predstavljeni su u transmissionom obliku. Obrada i dalja analiza spektara izvedena je u softverskom paketu *Origin Lab 9.0*.

4.5.3. Ispitivanje termičkih svojstava materijala

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (eng. *Differential Scanning Calorimetry*, DSC) je metoda ispitivanja termičkih svojstava supstanci koja se bazira na merenju razlike toplotnog fluksa ka uzorku i ka termički inertnom etalonu pri njihovom istovremenom zagrevanju. Pomenute razlike toplotnih flukseva nastaju kao posledica različitih fizičkih i hemijskih procesa koji se odvijaju tokom zagrevanja i hlađenja i praćeni su promenom entalpije, kao što su fazne transformacije (topljenje, ključanje, promena kristalne strukture), desorpcija gasova ili para, različite pirolitičke hemijske reakcije, itd.

Termička svojstva cefazolina, suvog ekstrakta hajdučke trave, PCL nanovlaknastih matova bez dodataka i sa dodatkom cefazolina ili suvog ekstrakta hajdučke trave određena su DSC metodom. Uzorci nanovlaknastih matova PCL sa cefazolinom zagrevani su od sobne temperature do 200 °C, dok su uzorci nanovlaknastih matova PCL sa suvim ekstraktom hajdučke trave zagrevani od sobne temperature do 140 °C, brzinom zagrevanja od 10 °C/min. Merenja su izvršena u atmosferi azota pri brzini protoka od 50 ml/min. Toplotni prelazi su detektovani iz prvog ciklusa zagrevanja. Analiza je urađena u triplikatu, za sve uzorke. Stepem kristaliničnosti (χ_m) nanovlaknastih matova sa i bez dodatka bioaktivne supstance određen je na osnovu jednačine 4.2 (Ruckh i dr., 2012):

$$\chi_{m,PCL} (\%) = \frac{\Delta H_{m,uzorka}}{\Delta H^{\circ}_{m,PCL}} * 100 \quad (4.2)$$

gde je $\Delta H_{m,uzorka}$ entalpija topljenja nanovlaknastog mata, dok je $\Delta H^{\circ}_{m,PCL}$ entalpija topljenja 100 % kristalnog PCL (139,5 J/g) za molekulsku masu PCL od 80000 g/mol (Gupta i dr., 2011; Kuzelova Kostakova i dr., 2017).

4.5.4. Ispitivanje mehaničkih svojstava materijala

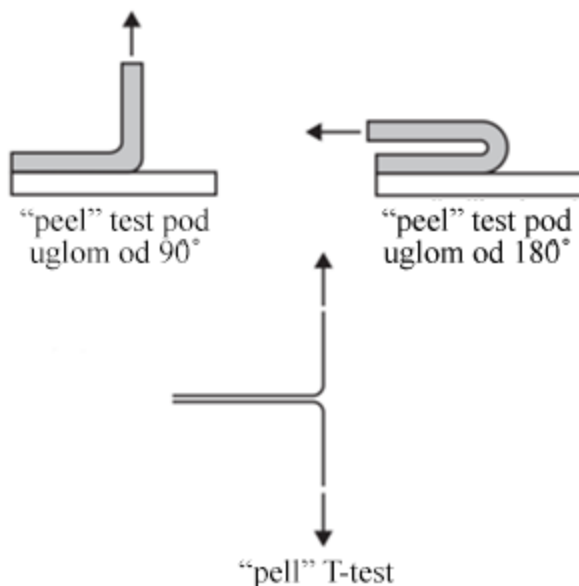
Jedno od osnovnih svojstava materijala koje treba obezbediti je adekvatan otpor spoljašnjim silama. Sprovedeno je ispitivanje na zatezanje PCL nanovlaknastih matova sa i bez dodatka suvog ekstrakta hajdučke trave da bi se odredila zatezna čvrstoća, prekidna deformacija i Jungov modul elastičnosti.

Za mehanička merenja materijala korišćen je univerzalni instrument opremljen sa mernom ćelijom od 500 N. Jungov modul elastičnosti je izračunat kao nagib krive napon-deformacija u

regionu elastične deformacije, koji je eksplicitno određen za svaku krivu, korišćenjem softvera *Trapeziumx* verzija 1.5.2 Shimadzu Corporation, Japan. Za potrebe mehaničkog testa ispitivanja zatezne čvrstoće, prekidne deformacije i Jungovog modula elastičnosti, nanovlaknasti matovi isečeni su u pravougaone oblike i postavljeni između držača na rastojanju od približno 10 mm. Površina poprečnog preseka i aktivna dužina svakog uzorka su precizno određeni pre ispitivanja. Ispitivanje na zatezanje je sprovedeno brzinom od 10 mm/min na sobnoj temperaturi (25 °C). Određene su prosečne vrednosti tri nezavisna merenja zatezne čvrstoće, prekidne deformacije i Jungovog modula elastičnosti i izražene kao srednje vrednosti sa standardnim devijacijama.

4.5.4.1. „Peel“ test

„Peel“ test je tehnika koja se koristi za procenu stepena adhezije između dva materijala tj. za određivanje koliko je adheziv efikasan pri spajanju određenih vrsta materijala. Prilikom „peel“ testa, fleksibilan materijal se odvađa od podloge primenom sile. Rezultati „peel“ testa se daju kao funkcija jačine adhezije (eng. *peel strength*) koja predstavlja odnos prosečne sile potrebne za razdvajanje materijala i širine linije vezivanja na koju sila deluje, pri konstantnoj brzini odvajanja. Postoje različite tehnike „peel“ testa uključujući odvajanje pod uglom odvajanja od 0°, 90° i 180° ili u konfiguraciji T-odvajanje, kao što je prikazano na slici 4.2. (Ashter, 2014; Morris 2017).



Slika 4.2. Šematska ilustracija primene sile pri različitim tehnikama „peel“ testa (adaptirano iz Ashter, 2014)

U ovoj doktorskoj disertaciji primenjen je „peel“ test pod uglom od 180°. U cilju ispitivanja adhezije nanovlaknata na komercijalno dostupne katetere, isečeni su gumeni i silikonski kateteri dužine 4 cm i uzorci PCL nanovlaknastih matova sa cefazolinom ili suvim ekstraktom hajdučke trave dužine 4,5 cm. Vrhovi katetera na dužini od 1 cm su premazani u tankom sloju komercijalnim adhezivom - n-butil-2-cijanoakrilatom koji se koristi kao adheziv u biološkim sistemima. Na kateter je nanosen nanovlaknasti mat, tako da je deo nanovlaknastog mata dužine 1 cm bio spojen a deo ostao slobodan za potrebe „peel“ testa. Širina linije vezivanja svakog uzorka je precizno određena pre ispitivanja. „Peel“ test je sproveden u cilju procene adhezije između komercijalno dostupnih gumenih i silikonskih katetera i obloga od PCL nanovlaknastih matova bez dodataka ili sa dodatkom 20 mas% cefazolina i 10 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave. Primenjena je brzina odvajanja od 5 mm/min na sobnoj temperaturi (25 °C). Jačina adhezije je prikazana kao odnos srednje sile odvajanja i širine linije vezivanja uzorka (Liu i dr., 2017). Dijagrami sile adhezije u zavisnosti od pomeraja (dužine

odvajanja) izračunati su korišćenjem softvera *Trapeziumx* verzija 1.5.2 Shimadzu Corporation, Japan. Ispitivanja su vršena na uređaju za ispitivanje mehaničkih svojstava, kao što je prikazano za slici 4.3.



Slika 4.3. Fotografija postavljenog uzorka za „peel“ test: gumeni kateter sa obloženim PCL nanovlakanastim matom pred početak testa (levo) i silikonski kateter sa obloženim PCL nanovlakanastim matom tokom „peel“ testa (desno)

4.5.5. Određivanje ukupnog sadržaja polifenola

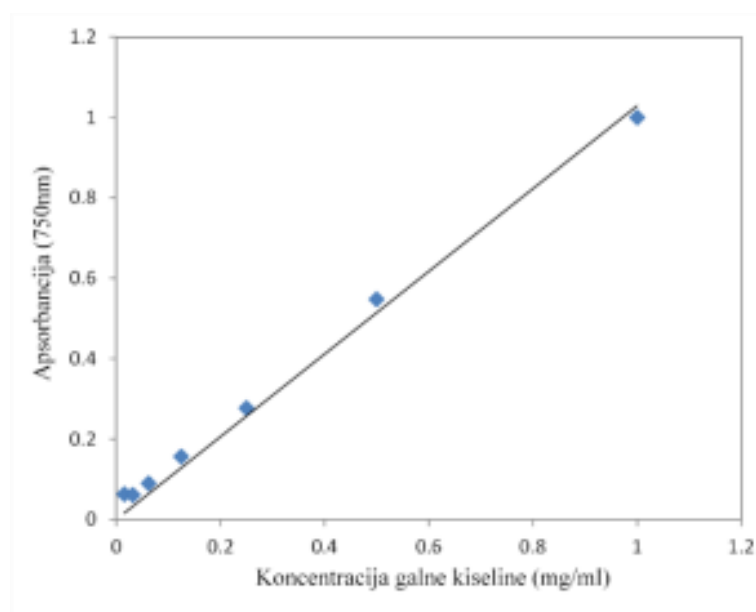
Ukupni sadržaj polifenola je kvantifikovan kolorimetrijski korišćenjem modifikovane Folin-Ciocalteu metode (Singleton i Rossi, 1965) i galne kiseline kao referentnog standarda. Metoda se zasniva na redukovanju Folin-Ciocalteu reagensa (smeša fosfovolframove ($H_3PW_{12}O_{40}$) i fosfomolibdenske kiseline ($H_3PMo_{12}O_{40}$)) u blago alkalnim uslovima u prisustvu polifenolnih jedinjenja. Tada nastaje smeša volfram-oksida (W_8O_{23}) i molibden-oksida (Mo_8O_{23}), koja je intenzivne plave boje, a intenzitet se određuje spektrofotometrijski na 750 nm.

Ukupan sadržaj polifenola određen je za ekstrakte hajdučke trave i za uzorke pufera u koji su bili potopljeni PCL/hajdučka trava nanovlakanasti matovi. U tečnim ekstraktima je podešena koncentracija od 10 mg/ml, dok je osušen ekstrakt rastvoren u 70 % etanolu u konačnoj koncentraciji od 10 mg/ml. Svi eksperimenti sa nanovlakanastim matovima su izvedeni u epruvetama koje su sadržale 7 ml PBS pufera i 150 mg ispitivanog uzorka PCL sa i bez dodatka suvog ekstrakta hajdučke trave. U unapred određenim vremenskim intervalima, uzorkovano je 100 μ l rastvora pufera i zamenjeno istom zapreminom svežeg pufera.

Za određivanje sadržaja polifenola, 100 μ l ispitivanog uzorka pomešano je sa 500 μ l Folin-Ciocalteu reagensa i 6 ml destilovane vode. Smeša je snažno promućkana 60 s, a zatim je dodato 2 ml 15 % Na_2CO_3 i dodatno promućkana još 30 s. Na kraju je dodata destilovana voda da bi se postigla konačna zapremina od 10 ml. Nakon 2 h inkubacije u mraku na sobnoj temperaturi, apsorbcija je merena na 750 nm na spektrofotometru. Slepa proba je pripremljena istovremeno sa uzorcima, korišćenjem 70 % etanola umesto uzorka ekstrakta hajdučke trave, dok je za praćenje sadržaja oslobođenih polifenola iz PCL nanovlakana kao slepa proba korišćen uzorak pufera u koji su potopljeni PCL nanovlakanasti matovi bez dodatka suvog ekstrakta hajdučke trave. Rezultati su izračunati pomoću standardne prave i izraženi su kao miligrami ekvivalenta galne kiseline (eng. *Gallic acid equivalents*, GAE) po gramu suve materije ekstrakta.

Priprema standardne prave

Za pripremu standardne prave korišćen je rastvor galne kiseline (od 0,0156 do 1 mg/ml), koji je korišćen na isti način kao i uzorci u opisanoj Folin-Ciocalteu metodi. Iz određenih vrednosti apsorbanacije merene na 750 nm konstruisana je prava, pomoću softvera *Origin Lab 9.0* (slika 4.4.).



Slika 4.4. Standardna prava za određivanje sadržaja polifenola u ekstraktima

Za proračun koncentracije polifenola u ispitivanim uzorcima korišćena je jednačina standardne prave:

$$Y = 1,03X \quad (4.3)$$

pri čemu je Y - apsorbanacija uzorka (merena na 750 nm), a X - koncentracija polifenola u mgGAE/ml. Jednačina standardne prave je adekvatno predstavljala eksperimentalno dobijene rezultate, na šta ukazuje visoka vrednost koeficijenta determinacije ($r^2 = 0,99$).

4.5.6. *In vitro* studije oslobađanja bioaktivne supstance

Oslobađanje bioaktivne supstance je praćeno merenjem koncentracije bioaktivne supstance oslobođene iz nanovlaknastih matova uronjenih u fosfatni pufer. Svi eksperimenti su izvedeni u epruветama koje su sadržale 150 ml PBS pufera i 25 mg ispitivanog uzorka za PCL nanovlaknaste matove sa cefazolinom, odnosno 7 ml PBS pufera i 150 mg ispitivanog uzorka za PCL nanovlaknaste matove sa suvim ekstraktom hajdučke trave. Kao referentni uzorak korišćen je rastvor bioaktivne supstance koji ogovara ukupnoj masi bioaktivne supstance koja je prisutna u 25 mg procesiranog PCL nanovlaknastog mata sa cefazolinom, odnosno 150 mg procesiranog PCL nanovlaknastog mata sa suvim ekstraktom hajdučke trave. Kinetika oslobađanja cefazolina praćena je u stacionarnim uslovima, a kinetika oslobađanja polifenola hajdučke trave u dinamičkim uslovima pri brzini mešanja od 120 o/min. Tokom eksperimenata sa kontrolisanim oslobađanjem uziman je uzorak od 2 ml za eksperimente sa PCL nanovlaknastim matovima sa cefazolinom odnosno 100 μ l za eksperimente sa PCL nanovlaknastim matovima sa suvim ekstraktom hajdučke trave. Određena je apsorbanca testiranih uzoraka (A_t) i referentnog uzorka koji je sadržao samo rastvorenu bioaktivnu supstancu (A_c). Procenat oslobođene bioaktivne supstance izračunat je korišćenjem date jednačine (4.4). Iako je posle svakog merenja uzorkovana određena zapremina rastvora i zamenjena čistim PBS puferom, u ovoj jednačini nije uzeta u obzir količina uklonjene bioaktivne supstance s obzirom da je identičan postupak primenjen na referentnom uzorku. Primenjenim postupkom anuliran je efekat degradacije

bioaktivne supstance (koja je pokazana za cefazolin u ranijim istraživanjima Vercaigne i dr., 2000). Slično, poznato je da fenolna jedinjenja mogu biti nestabilna u neutralnim i alkalnim vodenim rastvorima (Latos-Brozio i Masek, 2020). Merenje koncentracije oslobođenog cefazolina vršeno je direktnim merenjem apsorbancije na 272 nm. Sadržaj polifenola hajdučke trave oslobođen u medijumu je kvantifikovan kolorimetrijski modifikovanom Folin-Ciocalteu metodom po protokolu opisanom u tački 4.5.5. ovog poglavlja. Procenat oslobođenog cefazolina, odnosno polifenola izračunat je korišćenjem jednačine:

$$\text{Kumulativni procenat oslobađanja leka (\%)} = \frac{A_t}{A_c} * 100 \quad (4.4)$$

gde je A_t vrednost apsorbancije u ispitivanim uzorcima u vremenu t i A_c je vrednost apsorbancije referentnog uzorka u istom vremenu. Praćenje kinetike oslobađanja bioaktivne supstance iz uzoraka je mereno u duplikatu i prikazani rezultati su srednje vrednosti sa naznačenim standardnim devijacijama.

4.5.6.1. Kinetičke studije oslobađanja bioaktivne supstance

U cilju proučavanja kinetike i mehanizma oslobađanja bioaktivne supstance iz nanovlaknastih materijala, rezultati *in vitro* testova su modelovani kinetičkim jednačinama uključujući kinetiku nultog reda (jednačina 4.5), kinetiku prvog reda (jednačina 4.6), Higuči (Higuchi) model (jednačina 4.7) i Korsmejer-Pepas (Korsmeyer-Peppas) model (jednačina 4.8) (Sahoo i dr., 2012; Paarakh i dr., 2018).

Model nultog reda:

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (4.5)$$

gde je Q_t količina bioaktivne supstance oslobođena u vremenu t , Q_0 je početna količina bioaktivne supstance u rastvoru, a K_0 je konstanta oslobađanja.

Model prvog reda:

$$\log Q_t = \log Q_0 - K_1 t/2,303 \quad (4.6)$$

gde je Q_t količina bioaktivne supstance rastvorene u vremenu t , Q_0 je početna količina bioaktivne supstance u rastvoru, a K_1 je konstanta oslobađanja prvog reda.

Higučijev model:

$$Q_t = K_H t^{1/2} \quad (4.7)$$

gde je Q_t količina bioaktivne supstance rastvorene u vremenu t , a K_H je konstanta oslobađanja.

Korsmejer-Pepasov model:

$$Q_t/Q_0 = K_{KP} t^n \quad (4.8)$$

gde je Q_t/Q_0 frakcija bioaktivne supstance koja se oslobađa u trenutku t , K_{KP} je konstanta oslobađanja, a n je eksponent oslobađanja, koji ukazuje na mehanizam otpuštanja bioaktivne supstance kroz polimernu matricu. Tumačenje eksponenta oslobađanja i mehanizma otpuštanja bioaktivne supstance prikazano je u tabeli 4.4. (Korsmeyer i dr., 1983).

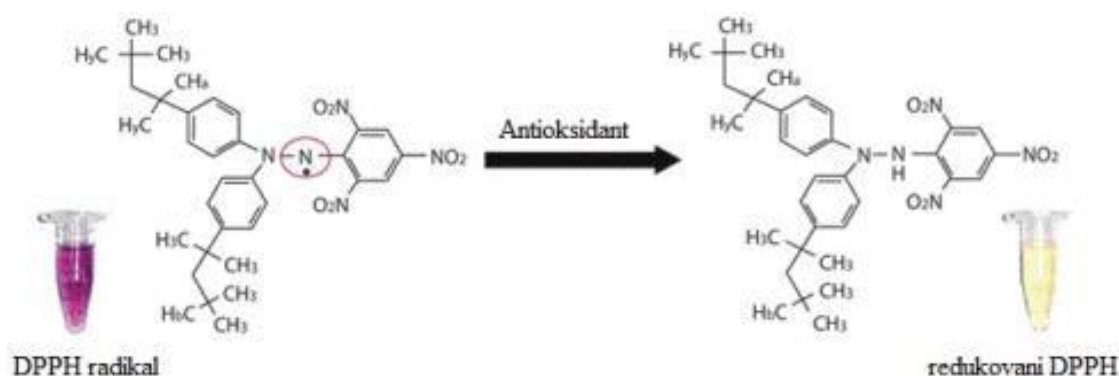
Tabela 4.4. Tumačenje mehanizama difuzionog oslobađanja leka

EkspONENT oslobađanja (n)	Mehanizam transporta leka
$n < 0,5$ (0,45)	Pseudo-Fikova difuzija
$n = 0,5$ (0,45)	Fikova difuzija (tip I)
$0,5 < n < 1$ (0,89)	Fikova difuzija i erozija
$n = 1$	Transport tipa 2 (otpuštanje nultog reda)
$n > 1$ (0,89)	Super transport tipa 2 (erozija ili relaksacija)

Npr. za cilindrične strukture koje odgovaraju morfologiji nanovlakana vrednost eksponenta oslobađanja je ispod 0,5, što ukazuje na Pseudo-Fikovu difuziju bioaktivne supstance (Grkovic i dr., 2017). Fikova difuzija (tip I) se često primećuje u polimernim sistemima kada je eksperimentalna temperatura znatno iznad temperature staklastog prelaza polimera (T_g). Tada se očekuje da je odnos Q_t/Q_0 proporcionalan kvadratnom korenu vremena odnosno $n = 0,5$. Difuzija tip II je drugi najvažniji mehanizam difuzije za polimerne strukture. Ovo je proces pomeranja granica i linearne kinetike sorpcije, koji je suprotan Fikovoj difuziji. Detaljnije karakteristike procesa, kao što su period indukcije i frontalno ubrzanje u poslednjoj fazi, dokumentovane su u literaturi. Vrednost eksponenta n između 0,5 i 1 označava Fikovu difuziju i eroziju (anomalnu difuziju). Difuzija tipa II i anomalna difuzija se obično primećuju kod polimera čija je temperatura staklastog prelaza viša od eksperimentalne temperature. Glavna razlika između ova dva načina difuzije tiče se brzine difuzije rastvarača (Karimi, 2011).

4.5.7. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Sposobnost neutralizacije DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala je određena po prethodno opisanoj metodi (Lee i dr., 1998). DPPH je stabilni azotni radikal, koji ima nesparen valentni elektron na jednom azotovom atomu. DPPH radikal se prilikom reakcije sa donatorom vodonika redukuje do DPPH-H što dovodi do promene boje iz ljubičaste u žutu (slika 4.5.). Intenzitet promene boje se određuje spektrofotometrijski na 517 nm. Rezultati u ovoj metodi se izražavaju kao procenat inhibicije DPPH radikala.



Slika 4.5. Redukcija DPPH stabilnog radikala sa donatorom vodonikovog atoma do DPPH-H (preuzeto od Milutinovic, 2017)

DPPH rastvor (0,2 mM) je pripremljen rastvaranjem 0,0078 g DPPH ($M = 349,32$ g/mol) u 100 ml metanola. Antioksidativna sposobnost je merena za ekstrakte hajdučke trave i za uzorke pufera u koji su bili potopljeni PCL nanovlaknasti matovi sa suvim ekstraktom hajdučke trave. U tečnim ekstraktima je podešen sadržaj suve materije na 1 mg/ml, dok je osušen ekstrakt rastvoren u 70 % etanolu u konačnoj koncentraciji od 1 mg/ml. Svi eksperimenti sa uzorcima pufera u koje su potopljeni nanovlaknasti matovi su izvedeni u epruvetama koje su sadržale 200 μ l PBS pufera i 4 mg ispitivanog uzorka PCL sa i bez dodatka suvog ekstrakta hajdučke trave. U unapred određenim

vremenskim intervalima, uzorkovano je 50 µl rastvora pufera i zamenjeno istom zapreminom svežeg pufera.

Da bi se izmerio kapacitet neutralizacije DPPH, ukupno 50 µl uzorka pomešano je sa 3,95 ml metanola i 1 ml rastvora DPPH koncentracije 0,2 mM u metanolu i reakcione smeše su snažno promućkane. Nakon 30 min inkubacije u mraku, na sobnoj temperaturi, izmerena je apsorbanacija na 517 nm uz čist metanol kao slepu probu. Kontrolni uzorak je pripremljen korišćenjem 70 % etanola umesto uzorka ekstrakata hajdučke trave, odnosno korišćen je uzorak pufera u koje su bila potopljena PCL nanovlakna bez dodatka suvog ekstrakta hajdučke trave. Rezultati su izraženi kao procenat inhibicije, odnosno kao procenat neutralizacije slobodnih DPPH radikala u odnosu na kontrolni uzorak i izračunati su prema sledećoj jednačini:

$$\text{Inhibicija (\%)} = \frac{A_k - A_u}{A_k} * 100 \quad (4.9)$$

gde su A_k - apsorbanacija kontrolnog uzorka i A_u - apsorbanacija uzorka.

Test je urađen u tri ponavljanja i rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom.

4.5.8. Određivanje antibakterijske aktivnosti

Antibakterijska aktivnost materijala analizirana je prema indikatorskim sojevima patogenih mikroorganizama korišćenjem nekoliko različitih metoda, i to: određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije mikrodilucionom metodom, metodom razblaženja tj. brojanja poraslih kolonija i metodom zone inhibicije.

4.5.8.1. *Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije mikrodilucionom metodom sa resazurinom kao indikatorom*

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je koncentracija ispitivanog uzorka koja je dovoljna da inhibira rast ispitivanog mikroorganizma. Metoda određivanja MIK sa resazurinom kao indikatorom se zasniva na promeni boje iz ljubičaste u roze ili bezbojnu. Promena boje se dešava jer resazurin, koji je ljubičasto obojen, redukuje u prisustvu metabolički aktivnih ćelija do resorufina, koji je roze boje. Dalje resorufin može da se redukuje do hidroresorufina koji je bezbojan. Svaka promena boje iz ljubičaste u roze ili bezbojnu ukazuje na rast testiranog mikroorganizma. Najniža koncentracija pri kojoj ne dolazi do promene boje uzima se za MIK vrednost (Sarker i dr., 2007). Ova metoda je primenjena za određivanje MIK tečnih i suvih ekstrakata hajdučke trave. Kao patogeni mikroorganizmi korišćeni su *S. aureus* i *P. aeruginosa*.

Resazurin rastvor je napravljen rastvaranjem 270 mg resazurina u 40 ml destilovane vode, vorteksiran i profiltriran kroz 0,45 µm sterilni membranski filter. Osušeni ekstrakt hajdučke trave je rastvoren u konačnoj koncentraciji od 40 mg/ml u 20 % etanolu.

U bunarčice mikrotitarske ploče je sipano 100 µl hranljive podloge (TSB), a zatim je u prvu kolonu dodato 100 µl ispitivanog uzorka. Serija dvostrukih razblaženja je postignuta prenošenjem 100 µl smeše podloge i ekstrakta hajdučke trave u sledeću kolonu, tako da je konačna zapremina u svakom bunarčiću bila 100 µl. Napravljeno je osam serija razblaženja tako da je koncentracija hajdučke trave varirala u opsegu od 0,16 do 20 mg s.m./ml. U svaki bunarčić je dodato 10 µl bakterijske suspenzije, tako da konačna koncentracija bude 5×10^6 CFU/ml. Nakon toga je dodato 10 µl rastvora resazurina. Kontrole su pripremane paralelno sa uzorcima. Jedna kontrola je sadržala 100 µl TSB podloge, 10 µl resazurina i 10 µl bakterijske suspenzije, druga kontrola je sadržala 50 µl TSB podloge, 50 µl ekstrakta i 10 µl resazurina i treća kontrola je sadržala 50 µl TSB podloge, 50 µl 20 % etanola, 10 µl resazurina i 10 µl bakterijske suspenzije. Mikrotitarske ploče su inkubirane 24 h na 37 °C. Nakon inkubacije, vizuelno na osnovu boje, određen je MIK.

4.5.8.2. Određivanje antibakterijske aktivnosti metodom razblaženja

Metoda brojanja poraslih kolonija metodom razblaženja je široko primenjivana metoda za analizu uticaja materijala na vijabinost mikroorganizama (Korica i dr., 2019), a u ovoj disertaciji je primenjena za ispitivanje antibakterijskog delovanja nanovlaknastih PCL matova sa ekstraktom hajdučke trave. Kao patogeni mikroorganizmi korišćeni su *S. aureus* i *P. aeruginosa*.

Sveža kultura *S. aureus* ili *P. aeruginosa* je razblažena u sterilnom fiziološkom rastvoru (rastvor 9 g NaCl u 1 L destilovane vode) do konačne koncentracije bakterija od 5×10^7 ćelija/ml. Dobijena suspenzija bakterija (200 μ l) je prenesena u 2 ml rastvora PBS u koji je dodat uzorak PCL nanovlaknastog mata sa suvim ekstraktom hajdučke trave, prethodno sterilisan UV osvetljavanjem 15 minuta sa obe strane. Posle inkubacije na 37 °C, u toku 24 h, 1 ml pufera koji je bio u interakciji sa ispitivanim materijalom je razblažen u 9 ml fiziološkog rastvora, a zatim je napravljena serija decimalnih razblaženja od 10^2 do 10^4 . Iz svakog razblaženja, 10 μ l uzorka je zasejano na TSA podlogu i inkubirano 24 h na 37 °C. Efekat ispitivanog materijala na rast mikroorganizama, određen je poređenjem broja formiranih kolonija (eng. *colony forming units*, CFU) u uzorcima u odnosu na kontrolu koju je predstavljao uzorak pufera u koji je dodat PCL nanovlaknasti mat bez suvog ekstrakta hajdučke trave. Stepenn redukciije, R (%), izračunat je prema jednačini:

$$R = \frac{C_0 - C}{C_0} * 100 \% \quad (4.10)$$

gde je C_0 broj kolonija mikroorganizama na kontrolnoj ploči, a C broj kolonija mikroorganizama na ploči sa uzorcima. Test za oba bakterijska soja je ponovljen dva puta i rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti sa standardnom devijacijom.

4.5.8.3. Određivanje antibakterijske aktivnosti metodom zone inhibicije

Antibakterijska aktivnost nanovlaknastih matova sa i bez dodatka cefazolina, kao i komercijalnih katetera obloženih PCL nanovlaknastim matovima sa 20 mas% cefazolina ili 10 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave ispitana je metodom zone inhibicije. Kao patogeni mikroorganizmi korišćeni su *S. aureus* i *E. coli*.

Ispitivani uzorci (nanovlaknasti matovi sa i bez dodatka cefazolina kružnog oblika prečnika 12 mm i obloženi kateteri kružnog oblika prečnika 8 mm) su UV sterilisani osvetljavanjem na 10 min sa obe strane. Sveže kulture testiranih mikroorganizama su razblažene u sterilnom fiziološkom rastvoru da bi se dobio početni broj ćelija od $\sim 10^8$ ćelija/ml. U Petri šolje je razliveno ~ 15 ml TSA podloge inokulisane sa 1 ml bakterijske suspenzije kod uzoraka PCL nanovlaknastih matova sa i bez dodatog cefazolina. TSA ploče su ostavljene da se osuše oko 15 min, nakon čega su uzorci nanovlaknastih matova raspoređeni preko inokulisanih Petri šolja. Za ispitivanje antibakterijske aktivnosti obloženih katetera korišćeno je 32 ml podloge top TSA koja je inokulisana sa 1,1 ml bakterijske suspenzije, tako da je krajnji broj ćelija bio $\sim 10^6$ ćelija/ml u koju su uronjeni uzorci obloženih katetera. Ploče su inkubirane na 37 °C tokom 24 h. Nakon perioda inkubacije, zona inhibicije je određena za svaki uzorak merenjem prečnika bistre zone koja se formirala oko svakog uzorka (Baranovska-Korczić i dr., 2016). Veličina uzoraka je uzeta u obzir prilikom merenja zone inhibicije. Za svaki uzorak, s obzirom na odstupanje oblika zone inhibicije rasta od savršenog kruga, obavljeno je pet merenja i rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti sa standardnom devijacijom.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

U ovoj doktorskoj disertaciji razvijeni su postupci za dobijanje novih funkcionalizovanih nanovlaknastih materijala na bazi PCL. Novi materijali su analizirani ispitivanjem morfoloških, termičkih i mehaničkih svojstava, kao i biološke aktivnosti. U ovom poglavlju disertacije su predstavljani i prodiskutovani rezultati u okviru četiri odeljka.

U potpoglavlju 5.1. su predstavljani rezultati dobijeni karakterizacijom PCL nanovlakana sa antibiotikom cefazolinom kao aktivnom supstancom. Korišćenjem različitih metoda procesiranja, uključujući emulziono, koaksijalno i elektropredenje iz rastvora, dobijena su elektropredena nanovlakna. Analizirana je morfologija uzoraka, hemijska interakcija između polimera i cefazolina, termička stabilnost dobijenog materijala, kinetika otpuštanja leka kao i antibakterijska aktivnost dobijenih materijala. U tekstu su diskutovana svojstva materijala sa osvrtom na njihovu potencijalnu primenu.

Potpoglavlje 5.2. obuhvata rezultate dobijene u procesu optimizacije uslova sušenja raspršivanjem tečnog ekstrakta hajdučke trave pomoću metode statistički planiranog eksperimenta. Primenjena je metoda odzivnih površina, pomoću *Design Expert* softvera i centralni kompozitni dizajn. Nakon uspostavljanja matematičkog modela između variranih parametara procesa i dobijenih izlaznih promenljivih, uslovi sušenja su optimizovani sa ciljem dobijanja što većeg prinosa ekstrakta sa očuvanim biološkim svojstvima. Karakterizacija ekstrakta uključila je određivanje sadržaja suve materije, sadržaja ukupnih polifenola, kao osnovnih bioaktivnih supstanci hajdučke trave, antioksidativne i antibakterijske aktivnosti suvog ekstrakta.

U potpoglavlju 5.3. su predstavljani rezultati dobijeni karakterizacijom PCL nanovlakana sa suvim ekstraktom hajdučke trave. Ekstrakt hajdučke trave pokazuje antimikrobna i antioksidativna svojstva što ga čini pogodnim izvorom biološki aktivnih supstanci na prirodnoj bazi za dobijanje funkcionalizovanih biomaterijala. Korišćenjem metode elektropredenja iz rastvora, dobijena su elektropredena nanovlakna na bazi PCL sa inkorporiranim suvim ekstraktom hajdučke trave koji je dobijen pod optimalnim uslovima sušenja. Analizirani su morfologija uzoraka, hemijska interakcija između polimera i suvog ekstrakta, termička i mehanička svojstva dobijenog materijala, kinetika otpuštanja polifenola kao i biološka aktivnost dobijenih materijala.

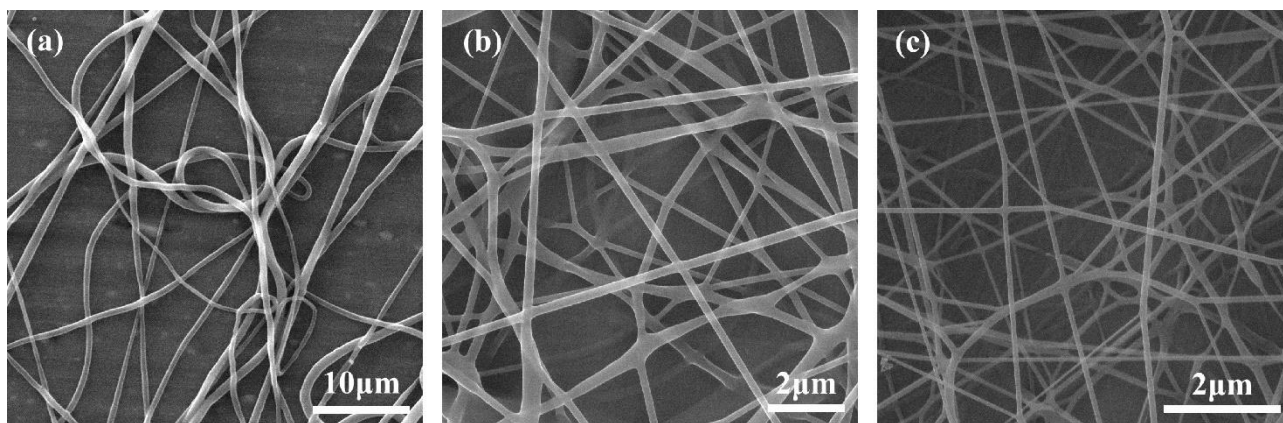
Potpoglavlje 5.4. predstavlja karakterizaciju materijala dobijenih adhezijom obloga od PCL nanovlaknastih matova sa 20 mas% cefazolina odnosno 10 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave na komercijalno dostupne gumene i silikonske katetere. U ovom potpoglavlju je analizirana efikasnost adhezije i adekvatnost primene obloga od novorazvijenih nanovlaknastih materijala kao obloga za katetere u cilju postizanja biološke aktivnosti, konkretno sprečavanja infekcije povezane sa urinarnom kateterizacijom.

5.1. Karakterizacija PCL nanovlakana sa cefazolinom

U cilju dobijanja nanovlakana sa antibakterijskim dejstvom ispitana je mogućnost inkorporacije 20 mas% antibiotika cefazolina u PCL nanovlakna procesirana metodom elektropredenja. Upoređene su karakteristike materijala dobijenih elektropredenjem iz rastvora, emulzionim i koaksijalnim elektropredenjem. Dobijena nanovlakna su okarakterisana u smislu morfologije, hemijske interakcije između leka i polimera, termičkih svojstava materijala, profila oslobađanja leka iz nosača, kao i antibakterijske aktivnosti materijala.

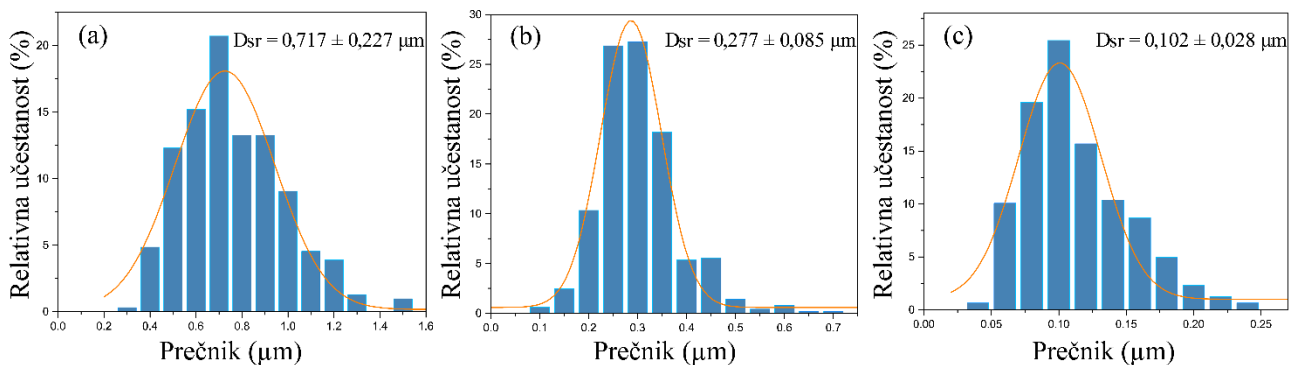
5.1.1. Morfološke karakteristike PCL nanovlakana sa cefazolinom

Za određivanje morfoloških karakteristika elektropredenih nanovlakana, korišćena je skenirajuća elektronska mikroskopija sa emisijom polja (FE-SEM). Inicijalno je ispitan uticaj različitih rastvarača i metoda procesiranja na karakteristike PCL nanovlakana bez dodatka aktivne supstance. Rastvor PCL1 napravljen je rastvaranjem PCL granula u smeši rastvarača DMF/DCM (1:4) i procesiran metodom elektropredenja iz rastvora. Tokom procesa elektropredenja, primenjen je napon od 20 kV, dok je protok bio 2 ml/h. Analizom FE-SEM mikrografija ovako dobijenih PCL1 nanovlakana (slika 5.1. (a)) može se zaključiti da su dobijena nanovlakna uglavnom bila razdvojena bez značajnih kontakta površina. Emulzioni rastvor PCL2 je pripremljen rastvaranjem PCL u smeši rastvarača hloroform/metanol (4:1) sa dodatkom Span-80 (1% v/v) i procesiran elektropredenjem iz rastvora sa primenjenim naponom od 16 kV i protokom od 8 ml/h. Prilikom emulzionog elektropredenja dobijena su donekle slepljena nanovlakna (slika 5.1. (b)). U cilju procesiranja nanovlakana sa strukturom jezgro-omotač, primenjena je metoda koaksijalnog elektropredenja i napravljena su dva rastvora PCL. PCL je rastvoren u TFE (4 mas%) za dobijanje rastvora „omotača“ i PCL rastvoren u TFE (8 mas%) za dobijanje rastvora „jezgra“, procesiran pri korišćenu napona od 30 kV i protoku rastvora „jezgra“ od 0,6 ml/h i protoku rastvora „omotača“ od 1 ml/h. Jezgro-omotač nanovlakna dobijena iz TFE rastvarača, izgradila su mreže tokom elektropredenja (slika 5.1. (c)).



Slika 5.1. FE-SEM mikrografije nanovlakana: (a) PCL1 (PCL elektropreden iz rastvora smeše rastvarača DMF/DCM (1:4)), (b) PCL2 (PCL elektropreden iz emulzionog rastvora smeše rastvarača hloroform/metanol (4:1) uz dodatak surfaktanta Span-80 (1% v/v)) i (c) PCL3 (PCL elektropreden koaksijalnom metodom iz rastvarača TFE)

Analiza FE-SEM mikrografija obavljena u *Image-Pro Plus* softverskom paketu pokazala je da su procesirana nanovlakna imala različite prečnike sa relativno širokom distribucijom dimenzija koja prati normalnu krivu raspodele za sva tri ispitivana tipa PCL nanovlakana (slika 5.2.). Procesirana PCL nanovlakna dobijena elektropredenjem iz rastvora (PCL1), emulzionog (PCL2) i koaksijalnog elektropredenja (PCL3) imala su srednje prečnike od $0,717 \pm 0,227 \mu\text{m}$, $0,277 \pm 0,085 \mu\text{m}$ i $0,102 \pm 0,028 \mu\text{m}$, redom. Raspodela prečnika nanovlakana na osnovu FE-SEM mikrografija, za sva nnaovlakna, prikazana je na slici 5.2. (a,b,c).

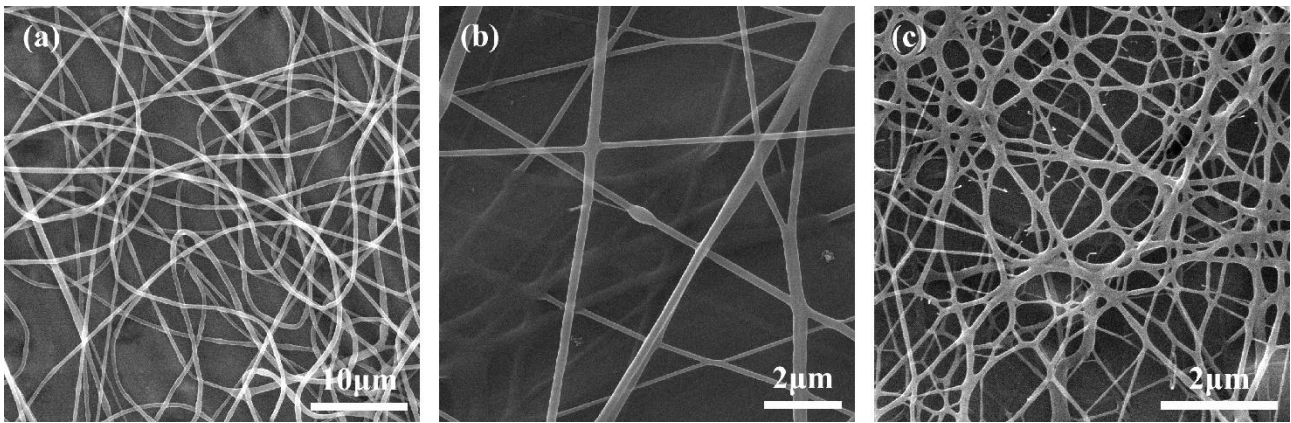


Slika 5.2. Raspodela prečnika nanovlakana: (a) PCL1 (PCL elektropreden iz rastvora smeše rastvarača DMF/DCM (1:4)), (b) PCL2 (PCL elektropreden iz emulzionog rastvora smeše rastvarača hloroform/metanol (4:1) uz dodatak surfaktanta Span-80 (1% v/v)) i (c) PCL3 (PCL elektropreden koaksijalnom metodom iz rastvarača TFE)

Najveći prečnik dobijen je u nanovlaknima elektroprednim iz rastvora pri korišćenju rastvarača DMF/DCM (PCL1). Prečnik nanovlakana se smanjio pri korišćenju smeše rastvarača hloroform/metanol (4:1) uz dodatak surfaktanta (Span-80) kod PCL2 nanovlakana. Smanjenje prečnika može se pripisati uticaju dodatka surfaktanta, koju su prijavili i drugi istraživači (Johnson i dr., 2021). Takođe, s obzirom da je najviši napon primenjen pri dobijanju PCL3 nanovlakana, može se uočiti da je primenjeni napon imao uticaj na formiranje tanjih nanovlakana. Naime, pri visokom naponu zbog veće elektrostatičke interakcije u naelektrisanom rastvoru dolazi do većeg istezanja i stvaranja veće odbojne sile u mlazu fluida pri čemu se stvaraju vlakna malog prečnika (Buchko i dr., 1999). Ovaj efekat može se primetiti kod elektroprednih PCL nanovlakana, jer je najmanji prečnik nanovlakana dobijen pri uslovima kada je primenjen najveći napon tokom procesa (PCL3 - 30 kV), u odnosu na ostala dva sistema (PCL2 - 16kV i PCL1- 20 kV).

Poznato je da brzina protoka rastvora ima uticaj na veličinu prečnika vlakana, pri čemu se sa povećanjem brzine protoka povećava i prečnik vlakana (Taylor, 1969). Najmanja brzina protoka je primenjena pri procesiranju PCL3 nanovlakana, pri čemu ona i imaju najmanji prečnik. Mogla bi se uočiti kontradiktornost analizom uticaja brzine protoka na prečnik PCL1 i PCL2 nanovlakana, jer je primenjena manja brzina protoka kod PCL1 nanovlakana, a dobijena je veća vrednost srednjeg prečnika u poređenju sa PCL2 nanovlaknima koja su elektropredena pri većoj brzini protoka. Očito je u ovom slučaju na debljinu nanovlakana veći uticaj ostvario primenjeni napon, koji je pri procesiranju PCL1 nanovlakana bio veći u odnosu na napon primenjen pri elektropredanju PCL2 nanovlakana (20 kV naspram 16 kV).

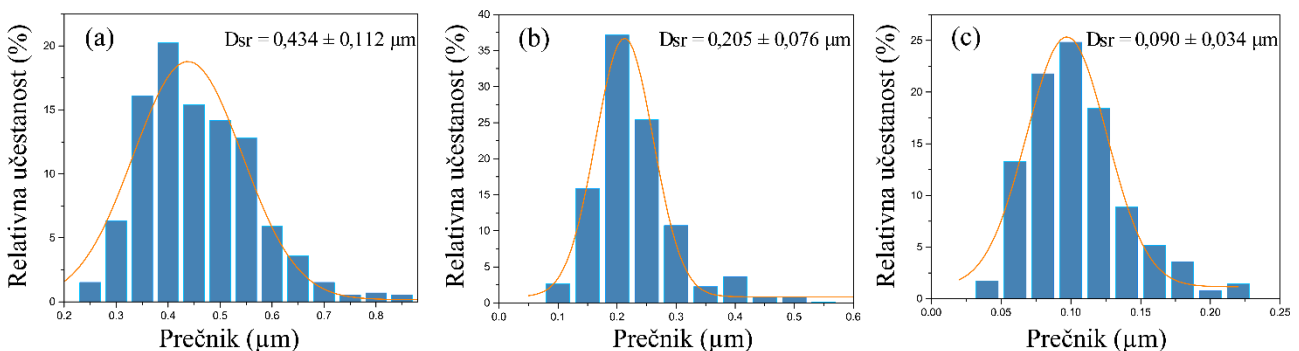
Pod istim uslovima pod kojima su dobijena PCL nanovlakna proizvedena su nanovlakna sa dodatkom 20 mas% cefazolina. Naime, procesirana su tri tipa nanovlakana - S1 nanovlakna su dobijena rastvaranjem PCL u smeši rastvarača DMF/DCM (1:4) uz dodatak antibiotika koji je direktno rastvoren u smeši rastvarača DMF/DCM i procesirana metodom elektropredanja iz rastvora. S2 nanovlakna su dobijena rastvaranjem PCL u smeši rastvarača hloroform/metanol (4:1) sa dodatkom Span-80 (1% v/v) i antibiotika (prethodno rastvorenog u vodi) i procesirana metodom elektropredanja iz rastvora. S3 nanovlakna su dobijena koaksijalnim elektropredanjem, pri čemu je rastvor za „omotač“ dobijen rastvaranjem PCL u TFE (4 mas%), a rastvor „jezgra“ rastvaranjem PCL u TFE (8 mas%) uz dodatak antibiotika (prethodno rastvorenog u vodi). FE-SEM mikrografije dobijenih nanovlakana za uzorke sa inkorporiranim cefazolinom: S1, S2 i S3 prikazane su na slici 5.3. (a,b,c), redom. Nanovlakna iz S1, S2 i S3 su pokazala slične obrasce formiranja i slične morfološke karakteristike kao PCL nanovlakna, što pokazuje da dodatak cefazolina nije ugrozio formiranje nanovlakana tokom procesa elektropredanja.



Slika 5.3. FE-SEM mikrografije nanovlakana: (a) S1 (dobijena rastvaranjem PCL u smeši rastvarača DMF/DCM (1:4) uz dodatak antibiotika i procesirana metodom elektropredenja iz rastvora), (b) S2 (dobijena rastvaranjem PCL u smeši rastvarača hlороform/metanol (4:1) sa dodatkom Span-80 (1% v/v) i antibiotika procesirana metodom elektropredenja iz rastvora) i (c) S3 (dobijena koaksijalnim elektropredenjem, rastvor za „omotač“ dobijen rastvaranjem PCL u TFE, rastvor „jezgra“ rastvaranjem PCL u TFE uz dodatak antibiotika)

FE-SEM analiza je pokazala da su nanovlakna ujednačena po izgledu, bez kapljica i perli, i da je cefazolin uspešno ugrađen u nanovlakna bez vidljivih kristala na površini nanovlakana u svim ispitivanim uzorcima.

Analizom FE-SEM mikrografija pomoću *Image-Pro Plus* softverskog paketa, utvrđeno je da su srednji prečnici uzoraka nanovlakana S1, S2 i S3 iznosili $0,434 \pm 0,112 \mu\text{m}$, $0,205 \pm 0,076 \mu\text{m}$ i $0,090 \pm 0,034 \mu\text{m}$, redom (slika 5.4.). Uticaj dodatka cefazolina na prečnik dobijenih PCL nanovlakana analiziran je poređenjem prečnika PCL nanovlakana sa i bez dodatka cefazolina procesiranim pod istim uslovima. Za utvrđivanje statističke značajnosti korišćen je Studentov t-test (Grech, 2018), a razlika se smatrala statistički značajnom sa p vrednošću manjom od 0,05. Dodavanje leka je uzrokovalo statistički značajno smanjenje prečnika svih ispitivanih nanovlakana ($p < 0,01$).



Slika 5.4. Raspodela prečnika nanovlakana: (a) S1 (dobijena rastvaranjem PCL u smeši rastvarača DMF/DCM (1:4) uz dodatak antibiotika i procesirana metodom elektropredenja iz rastvora), (b) S2 (dobijena rastvaranjem PCL u smeši rastvarača hlороform/metanol (4:1) sa dodatkom Span-80 (1% v/v) i antibiotika procesirana metodom elektropredenja iz rastvora) i (c) S3 (dobijena koaksijalnim elektropredenjem, rastvor za „omotač“ dobijen rastvaranjem PCL u TFE, rastvor „jezgra“ rastvaranjem PCL u TFE uz dodatak antibiotika)

Postoji više razloga zbog kojih je dodatak cefazolina u rastvor uslovio smanjenje prečnika elektropredenih nanovlakana. Provodljivost rastvora utiče na prečnik vlakana; jer povećanje provodljivosti rastvora povećava gustinu naelektrisanja na površini kapljice i uzrokuje smanjenje prečnika vlakna. Provodljivost rastvora polimera može se povećati dodavanjem elektrolita, poput

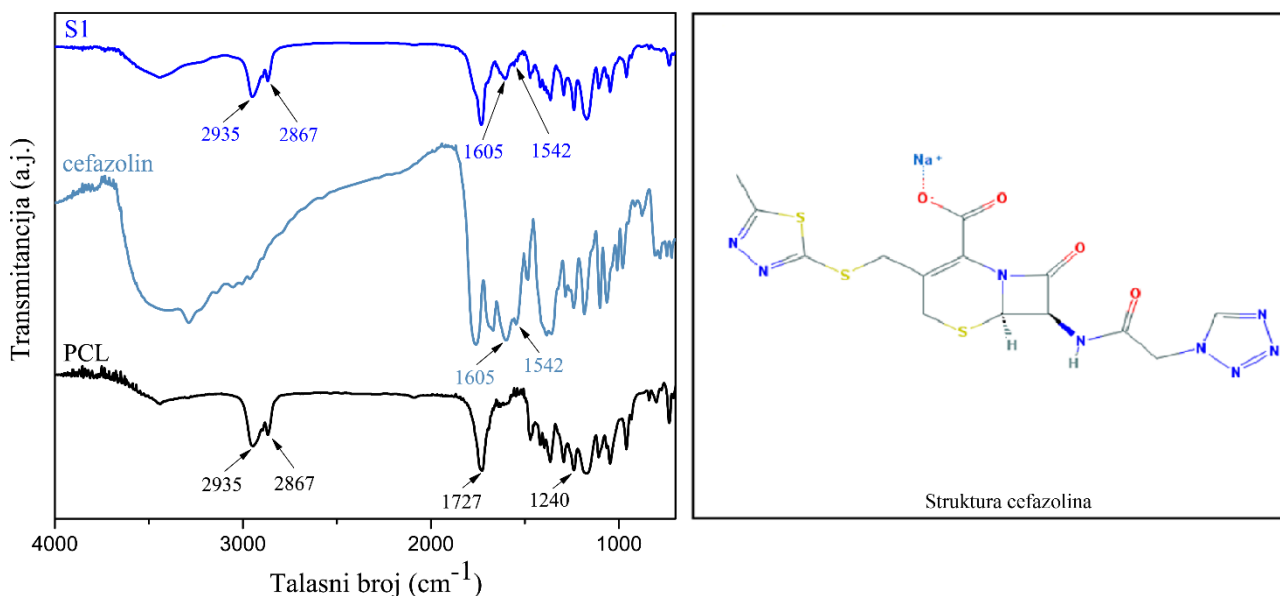
jonskih soli ali i lekova u rastvor. Povećana gustina naelektrisanja uzrokuje smanjenje sila koje deluju na mlaz dok putuje kroz električno polje, što rezultira dobijanju vlakana manjeg prečnika, kao što je objavljeno i u drugim studijama (Luong-Van i dr., 2006; Zong i dr., 2002; Kim i dr., 2004). Dodavanje visokog sadržaja cefazolina (20 mas%, u obliku Na⁺ soli) rastvoru za elektropredenje u ovoj disertaciji je dovelo do povećanja gustine naelektrisanja, koje je uslovalo statistički značajno smanjenje prečnika nanovlakana u svim ispitivanim sistemima.

5.1.2. Hemijske interakcije u PCL nanovlaknima sa cefazolinom

Hemijske strukture cefazolina, PCL nanovlakana, kao i njihove eventualne hemijske interakcije u PCL nanovlaknima sa inkorporiranim cefazolinom analizirane su metodom infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (FTIR). Analizom spektara nije primećena značajna razlika između FTIR spektara čistih komponenti i PCL elektropredenih nanovlakana u različitim rastvaračima sa dodatkom cefazolina (u uzorcima S1, S2 i S3). Slika 5.5. prikazuje FTIR spektar čistog antibiotika, PCL nanovlakana i PCL nanovlakana koja sadrže cefazolin (S1 kao primer).

FTIR spektar cefazolina pokazuje pik na oko 3300 cm⁻¹ koji potiče od N–H istežućih vibracija. Pikovi na 1761 cm⁻¹ i 1605 cm⁻¹ se pripisuju C=O vibracijama istežanja iz β-laktamskog prstena i cikličnog amida, redom (Gurkan i dr., 2012). N–H savijanje amida izvan prstena uslovljava apsorpciju zračenja na 1542 cm⁻¹ koje je karakteristično za kristalni oblik cefazolina. Pik na 742 cm⁻¹ potiče od N–H vibracija istežanja i savijanja van ravni tetrazolnog prstena.

Spektar PCL nanovlakana pokazuje karakteristične apsorpcione trake na 2935 cm⁻¹ i 2867 cm⁻¹ usled asimetričnog i simetričnog rastezanja –CH₂, redom. Istezanje karakteristično za karbonilnu grupu se pojavljuje na 1727 cm⁻¹, dok je za C–O i C–C veze iz kristalne faze zabeležen pik na 1294 cm⁻¹. Pikovi na 1240 cm⁻¹ i 1170 cm⁻¹ potiču od asimetričnog i simetričnog C–O–C istežanja, redom (Veras i dr., 2016).



Slika 5.5. FTIR spektri cefazolina, PCL nanovlakana (PCL elektropreden iz rastvora smeše rastvarača DMF/DCM (1:4)) i S1 (dobijen rastvaranjem PCL u smeši rastvarača DMF/DCM (1:4) uz dodatak antibiotika procesiran metodom elektropredenja iz rastvora)

Poređenjem FTIR spektara PCL nanovlakana sa i bez cefazolina može se zaključiti da je lek zadržan u svim ispitivanim nanovlaknima, nezavisno od primenjene metode elektropredenja. Spektar PCL nanovlakana sa cefazolinom pokazuje pikove na 2935 cm⁻¹ i 2867 cm⁻¹, koji potiču od asimetričnog i simetričnog rastezanja –CH₂, koji su karakteristični za PCL nanovlakna. Oko 1730 cm⁻¹, u FTIR spektru

sva tri uzorka sa cefazolinom postojao je intenzivan pik koji potiče od karbonilne veze (C=O) koja postoji u PCL nanovlaknima. Pik karakterističan za karbonilnu vezu se ne može koristiti za identifikaciju leka jer ovu grupu sadrži i PCL, a pikovi koji identifikuju cefazolin u nanovlaknastim matovima S1, S2 i S3 potiču od C=O vibracija istezanja cikličnog amida na 1605 cm^{-1} i N-H savijanja amida izvan prstena na 1542 cm^{-1} (Gurkan i dr., 2012; Rath i dr., 2016). Ovi identifikacioni pikovi dokazuju da cefazolin nije reagovao sa polimerom, niti se razgradio tokom procesa elektrospredjenja.

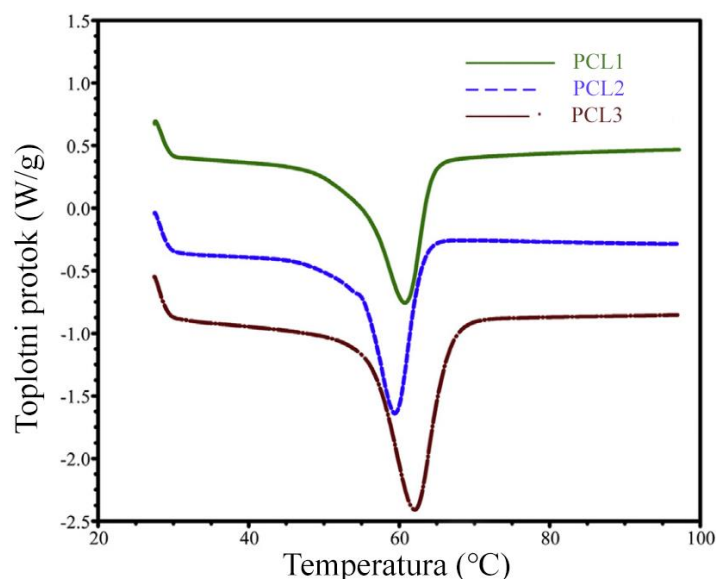
5.1.3. Termička svojstva PCL nanovlakana sa cefazolinom

DSC je urađen u cilju proučavanja termičkih svojstava PCL nanovlaknastih matova sa i bez inkorporiranog cefazolina. Određeni su temperatura topljenja (T_m), entalpija topljenja (ΔH_m) i stepen kristaliničnosti (χ_m) nanovlaknastih matova (tabela 5.1.). Korišćenjem dobijene entalpije topljenja i entalpije topljenja 100 % kristaliničnog PCL, određen je stepen kristaliničnosti PCL nanovlaknastih matova korišćenjem jednačine 4.2.

Tabela 5.1. Termička svojstva PCL nanovlaknastih matova sa i bez dodataka cefazolina

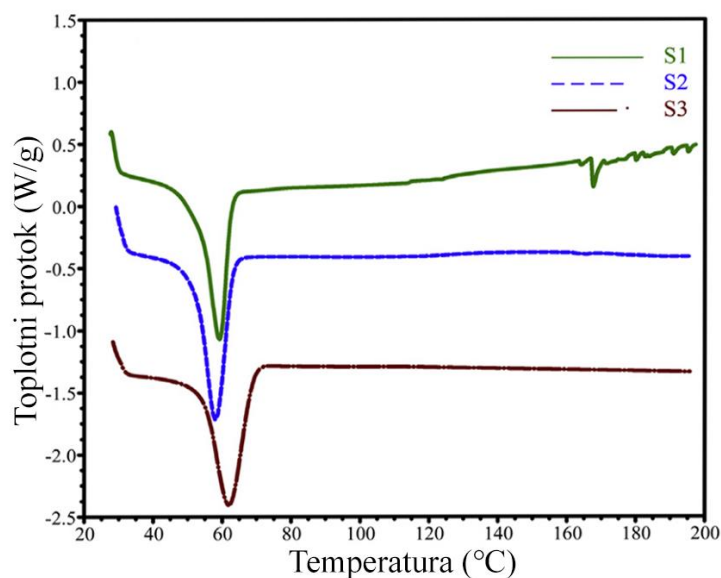
Uzorak	Temperatura topljenja T_m , °C	Entalpija topljenja ΔH_m , J/g	Stepen kristaliničnosti χ_m , %
PCL1	60,7	52,4	37,6
PCL2	59,5	55,1	39,5
PCL3	62,1	68,6	49,2
S1	59,3	50,4	36,1
S2	58,4	53,5	38,3
S3	61,9	62,5	44,8

DSC termogrami PCL nanovlakana su prikazani na slici 5.6. i pokazuju da se temperatura topljenja (T_m) dobijenih nanovlakana nalazi u opsegu $59\text{--}62\text{ °C}$, što je u skladu sa podacima iz literature (Estelles i dr., 2008; Woodruff i Hutmacher, 2010). Na slici se može primetiti da su vrednosti T_m za PCL nanovlakna dobijena elektrospredjenjem iz rastvora i koaksijalnim elektrospredjenjem (PCL1 i PCL3) $60,7\text{ °C}$ i $62,1\text{ °C}$, redom. U slučaju emulzionog elektrospredjenja (PCL2), usled dodavanja Span-80, koji deluje kao plastifikator, zabeležena je nešto niža vrednost T_m ($59,5\text{ °C}$).



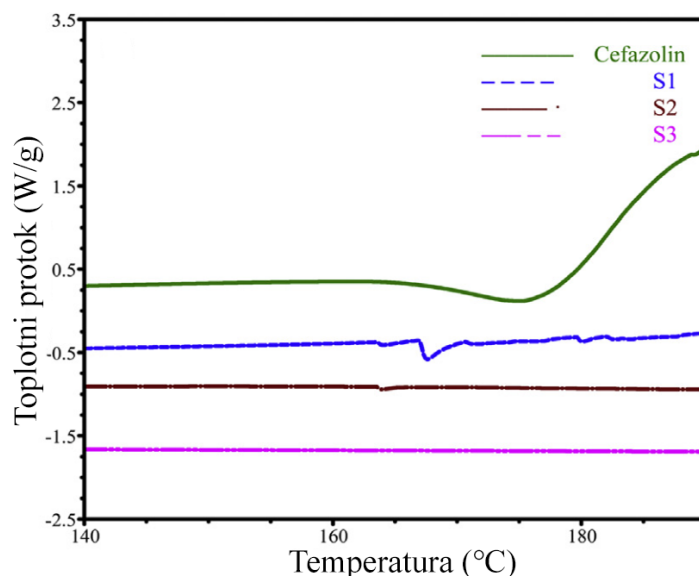
Slika 5.6. DSC termogram zagrevanja za PCL1 (PCL elektropreden iz rastvora smeše rastvarača DMF/DCM (1:4)), PCL2 (PCL elektropreden iz emulzionog rastvora smeše rastvarača hloroform/metanol (4:1) uz dodatak surfaktanta Span-80) i PCL3 (PCL elektropreden koaksijalnom metodom iz rastvarača TFE)

DSC termogrami nanovlakana sa inkorporiranim cefazolinom prikazani na slici 5.7. pokazuju da su T_m za S1, S2 i S3 (59,3 °C, 58,4 °C i 61,9 °C, redom) niže od T_m za PCL1, PCL2 i PCL3 nanovlakana (60,7 °C, 59,5 °C i 62,1 °C, redom). Sniženje temperature topljenja (T_m) i entalpije topljenja (ΔH_m) PCL nanovlakana sa cefazolinom može se objasniti činjenicom da je 20 mas% inkorporiranog leka smanjilo kristaliničnost PCL nanovlakana (Ruckh i dr., 2012; Potrč i dr., 2015).



Slika 5.7. DSC termogram zagrevanja za S1 (nanovlakna dobijena rastvaranjem PCL u smeši rastvarača DMF/DCM (1:4) uz dodatak antibiotika procesirana metodom elektropredenja iz rastvora), S2 (nanovlakna dobijena rastvaranjem PCL u smeši rastvarača hloroform/metanol (4:1) sa dodatkom Span-80 (1% v/v) i antibiotika procesirana metodom elektropredenja iz rastvora) i S3 (nanovlakna dobijena koaksijalnim elektropredjenjem, rastvor za „omotač“ dobijen rastvaranjem PCL u TFE, rastvor „jezgra“ rastvaranjem PCL u TFE uz dodatak antibiotika)

Ponovljenim DSC merenjem PCL nanovlakana sa inkorporiranim cefazolinom, utvrđeno je da u nanovlaknastom matu koje je dobijeno elektropredenjem iz rastvora (S1) lek nije u amorfnom stanju, već zaostaje u kristalnom obliku, o čemu svedoči prisustvo endoternog pika karakterističnog za tačku topljenja cefazolina na 176,1 °C (slika 5.8.). U objavljenoj literaturi, T_m cefazolina nalazi se u opsegu 169-196 °C (Maleki i dr., 2016; Rath i dr., 2016). Cefazolin inkorporiran u PCL nanovlakna bio je u amorfnom stanju u uzorcima nanovlaknastog mata S2 i S3, o čemu svedoči odsustvo karakterističnog endoternog pika na termogramima S2 i S3 nanovlaknastih materijala (slika 5.8.).



Slika 5.8. DSC termogram zagrevanja za cefazolin, S1 (nanovlakna dobijena rastvaranjem PCL u smeši rastvarača DMF/DCM (1:4) uz dodatak antibiotika procesirana metodom elektropredenja iz rastvora), S2 (nanovlakna dobijena rastvaranjem PCL u smeši rastvarača hloroform/metanol (4:1) sa dodatkom Span-80 (1% v/v) i antibiotika procesirana metodom elektropredenja iz rastvora) i S3 (nanovlakna dobijena koaksijalnim elektropredenjem, rastvor za „omotač“ dobijen rastvaranjem PCL u TFE, rastvor „jezgra“ rastvaranjem PCL u TFE uz dodatak antibiotika)

Tokom DSC analize moguće su promene polimorfnog oblika cefazolina usled zagrevanja, na osnovu čega se može zaključiti da DSC nije apsolutno pouzdana tehnika za identifikaciju stanja polimorfnih supstanci poput cefazolina prisutnog u uzorku (Kajdić i dr., 2018). DSC studije su sprovedene da bi se ustanovile termičke karakteristike elektropredenih nanovlakana pripremljenih u različitim smešama rastvarača i procesiranim različitim metodama elektropredenja. Na osnovu DSC rezultata, zaključeno je da je cefazolin inkorporiran u PCL nanovlakna prisutan kao amorfna molekularna čvrsta disperzija (uzorci S2 i S3) i u kristalnoj formi (uzorak S1). Kristalni oblik je potvrđen i FTIR rezultatima cefazolina i uzorka S1. Karakteristična traka na 1542 cm^{-1} (amid II traka) identifikovana je samo kod kristalnih oblika cefazolina u elektropredenim nanovlaknima u uzorku S1 (Kamat i dr., 1988).

Proces pripreme različitih nanovlakana direktno je odgovoran za prisustvo kristalne forme cefazolina u S1 nanovlaknastom matu i amorfne forme u nanovlaknastim matovima S2 i S3. Naime, za pripremu nanovlakana, korišćen je PCL u različitim rastvaračima: DMF/DCM (S1), hloroform/metanol (S2) i TFE (S3), jer je PCL dobro rastvorljiv u ovim rastvaračima i dobijena nanovlakna su bila uniformna, bez kapljica i perli u ovoj disertaciji kao i u studijama drugih (Jang i dr., 2015; Hu i dr., 2015; Sultanova i dr., 2016; Al Rez i dr., 2015; Qin i Wu, 2012). U uzorku S1, polimer i lek su rastvoreni u smeši organskih rastvarača DMF/DCM u odnosu 1:4. Cefazolin je praktično nerastvorljiv u DCM (Pedroso i Salgado, 2013), ali se rastvara u DMF (Wu i dr., 2005) i slaba rastvorljivost u jednom od rastvarača korišćenom za dobijanje nanovlaknastog mata S1 može

da objasni prisustvo zaostale kristalne strukture leka u nanovlaknima. Međutim, u strukturi jezgro-omotač (S3) i u nanovlaknima elektropredenim iz rastvora sa surfaktantom (S2), lek je najpre bio rastvoren u vodi, a zatim u organskim rastvaračima zajedno sa polimerom. U ovim uzorcima cefazolin je bio u amorfnom stanju i potpuno rastvoren i kao takav je detektovan u nanovlaknima DSC i FTIR metodom. Iako je bio prisutan u kristaliničnoj formi, cefazolin je bio potpuno inkorporiran i u S1 nanovlakna, što je pokazano na FE-SEM mikrografijama.

5.1.4. Kinetika oslobađanja leka iz PCL nanovlakana sa cefazolinom

PCL ima veoma sporu stopu razgradnje, u odnosu na druge biorazgradive poliestre, kao što su npr. PLA i PLGA, i ne bubri kada je uronjen u PBS. Stoga je mehanizam oslobađanja leka iz PCL nanovlakana prvenstveno kontrolisan difuzijom (Sultanova i dr., 2016). U ovoj doktorskoj disertaciji, ispitana je kinetika oslobađanja cefazolina iz elektropredenih PCL nanovlaknastih matova dobijenih različitim metodama elektropredenja (S1, S2 i S3) u toku 30 dana. Kumulativno oslobađanje cefazolina u odnosu na vreme pokazuje značajne razlike u kinetici otpuštanja leka iz tri ispitivana uzorka (slika 5.9.).

Kinetika oslobađanja zavisi od vrste leka, njegove kristaliničnosti, rastvorljivosti, veličine čestica i količine farmaceutskih doza. Lekovi rastvorljivi u vodi se uglavnom oslobađaju difuzijom, dok se lekovi slabo rastvorljivi u vodi oslobađaju prilikom razgradnje matrice polimera (Costa i Sousa Lobo, 2001). Lek koji je korišćen u ovom ispitivanju je rastvorljiv u vodi, pa se očekuje da je oslobađanje leka uslovljeno difuzijom i zbog hemijske prirode primenjenog leka i zbog hemijske prirode polimera. Faktori koji utiču na kinetiku oslobađanja leka a koji zavise od svojstva polimera uključuju molekulsku masu, distribuciju molekulske mase i kristaliničnost. Na primer, PCL sa standardnom molekulskom masom (80 kDa) se razgrađuje većom brzinom od PCL sa ultra visokom molekulskom masom (500 kDa) (Leong i dr., 2016). U ovoj disertaciji korišćen je PCL standardne molekulske mase od 80000 g/mol da bi se obezbedilo relativno brzo oslobađanje leka, što je pogodno za primenu u urinarnim kateterima. Na kinetiku oslobađanja leka iz nanovlaknastih matova u najvećoj meri utiču karakteristike nanovlakana koje su i bile određujuće za postizanje značajno različitih kinetičkih profila otpuštanja cefazolina iz tri ispitivana nanovlaknasta mata.

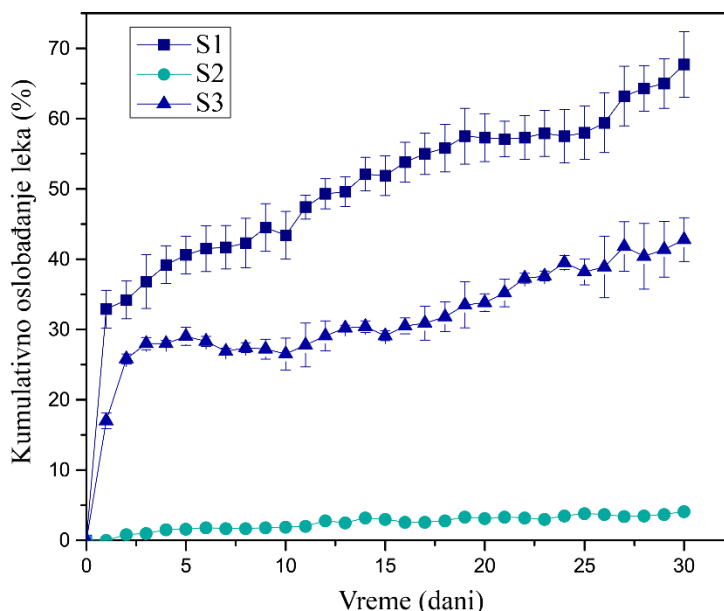
U početnoj fazi primećeno je izuzetno brzo oslobađanje leka iz uzoraka S1 i S3, nakon čega je usledilo postepeno kontrolisano oslobađanje u periodu od 30 dana. Ovakva dinamika otpuštanja leka može se objasniti činjenicom da se tokom procesa elektropredenja, deo cefazolina u obliku njegove natrijumove soli zadržava na površini ili blizu površine nanovlakana, i ova količina leka se izuzetno brzo otpušta iz nanovlakana. Uz to, brzo oslobađanje prvog dana iz uzoraka S1 i S3 može se pripisati slabijim interakcijama između frakcije cefazolina i PCL, kao što je objavljeno i u drugoj studiji (Maleki i dr., 2016).

Na inkorporiranje leka u nanovlakna i oslobađanje iz nanovlakana mogla je uticati temperatura staklastog prelaza (T_g) PCL koja je relativno niska i iznosi $-60\text{ }^\circ\text{C}$. Staklasto stanje polimera sa višim T_g minimalizuje prodiranje vode u nanopore u pojedinačnim nanovlaknima i unutar nanovlaknastog mata. Takvi polimeri uspešno ugrađuju lek u matricu, za razliku od polimera sa nižom T_g , kao što je PCL. PCL se na ispitivanoj temperaturi ($37\text{ }^\circ\text{C}$) nalazi u gumolikom stanju i pokazuje izraženiji efekat naglog oslobađanja leka, kao što je ranije objavljeno za naglo otpuštanje antibiotika ciprofloksacina iz PCL nanovlakana (Zupančić i dr., 2016).

U prva 24 h, $33 \pm 2,7\%$ i $17 \pm 1,1\%$ leka je otpušteno iz uzoraka S1 i S3, redom (slika 5.9.). Posle dve nedelje ukupno $52 \pm 2,8\%$ cefazolina je oslobođeno iz S1 i $30 \pm 1,1\%$ iz S3. Posle 30 dana, skoro $68 \pm 4,7\%$ i $43 \pm 3,1\%$ leka je otpušteno iz S1 i S3, redom. Na osnovu dobijenih profila oslobađanja leka, može se zaključiti da, nakon naglog oslobađanja leka iz S1, otpuštanje leka je usporeno, ali je procent oslobođenog leka rastao tokom vremena ispitivanja. Uzorak S3, nakon početnog naglog oslobađanja jedne količine leka, pokazao je konstantno kontrolisano oslobađanje, što se može pripisati strukturi nanovlakana jezgro-omotač. Može se zaključiti da je sloj PCL

nanovlakana koji čini strukturu „omotača“ odgovoran za sporiju difuziju leka u odnosu na nanovlaknasi mat uzorka S1 u kom ne postoji omotač.

Uzorak S2 je pokazao značajno sporiji profil otpuštanja od druga dva analizirana uzorka nanovlaknastog mata tokom celog ispitivanog perioda od 30 dana. Da bi se sprečila sklonost hidrofилnih lekova da budu zarobljeni na površini vlakana što dovodi do izuzetno brzog oslobađanja leka, kao metoda procesiranja vlakana koristi se emulziono elektropredenje (Kenawy i dr., 2009). U ovoj doktorskoj disertaciji za dobijanje nanovlaknastog mata S2 primenjeno je elektropredenje iz rastvora uz dodatak surfaktanta Span-80, u organski rastvarač. Molekuli cefazolina su u ovakvom sistemu „obmotani“ surfaktantom i polimerom, i formirana je struktura „jezgro-omotač“ tokom procesa elektropredenja. Pošto je većina leka inkorporirana u jezgru, hidrofobni polimerni omotač odvaja lek od vodenog rastvora u koji je uronjen polimerni nosač leka što dovodi do sporijeg oslobađanja leka iz emulziono elektropredenih nanovlakana (Hu i dr., 2015). Kao što je prikazano na slici 5.9. tokom prvih 24 h nije detektovano oslobađanje leka iz uzorka S2. Drugog dana zabeleženo je minimalno oslobađanje od $0,8 \pm 0,17$ % ukupne količine inkorporiranog cefazolina, dok je posle dve nedelje taj procenat bio oko $3 \pm 0,17$ %. U periodu od 30 dana, samo $5 \pm 0,21$ % leka je otpušteno iz nanovlaknastog mata S2.



Slika 5.9. Kumulativno oslobađanje cefazolina iz S1 (nanovlakna dobijena rastvaranjem PCL u smeši rastvarača DMF/DCM (1:4) uz dodatak antibiotika procesirana metodom elektropredenja iz rastvora), S2 (nanovlakna dobijena rastvaranjem PCL u smeši rastvarača hloroform/metanol (4:1) sa dodatkom Span-80 (1% v/v) i antibiotika procesirana metodom elektropredenja iz rastvora) i S3 (nanovlakna dobijena koaksijalnim elektropredenjem, rastvor za „omotač“ dobijen rastvaranjem PCL u TFE, rastvor „jezgra“ rastvaranjem PCL u TFE uz dodatak antibiotika) (adaptirano iz Radisavljevic i dr.,2018)

Rezultati *in vitro* testa oslobađanja cefazolina su fitovani matematičkim modelima- modelima nultog i prvog reda, kao i Higuči (Higuchi) i Korsmejer-Pepas (Korsmeyer-Peppas) modelima, kako bi se ustanovio model oslobađanja cefazolina iz nanovlakana. Koeficijent korelacije (r^2) između modelom predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti, dobijen regresionom analizom podataka, bio je kriterijum za odabir kinetičkog modela koji najbolje odgovara kinetici oslobađanja leka. Za sve modele, skoro svi sistemi su pokazali relativno dobre koeficijente korelacije, u rasponu od 0,850 do 0,973. Higučijev model je pokazao najveću vrednost r^2 za uzorke S1, S2 i S3, što ukazuje da se difuzija cefazolina iz svih sistema odvija prema Higučijevom modelu. Regresirana jednačina za Higučijev model je imala oblik:

$$Q_t = 13,07 t^{1/2} (r^2 = 0,98, \text{ uzorak S1}) \quad (5.1)$$

$$Q_t = 0,69 t^{1/2} (r^2 = 0,99, \text{ uzorak S2}) \quad (5.2)$$

$$Q_t = 8,18 t^{1/2} (r^2 = 0,97, \text{ uzorak S3}) \quad (5.3)$$

pri čemu u navedenim jednačinama Q_t predstavlja količinu cefazolina rastvorenog u vremenu t , a K_H konstantu oslobađanja za svaki uzorak S1, S2 i S3. Primena Higučijevog modela može se koristiti za opisivanje rastvaranja leka iz matriks tableta sa lekovima rastvorljivim u vodi, što je bio slučaj u ovoj disertaciji (Dash i dr., 2010).

Da bi se ispitao način mehanizma transporta leka iz nanovlaknastih matova, eksperimentalni rezultati oslobađanja leka su takođe fitovani Korsmejer-Pepas (Korsmeyer-Peppas) modelom. U ovom modelu, vrednost n (eksponent otpuštanja) koristi se za karakterizaciju različitog mehanizma oslobađanja leka iz cilindričnih matrica. Različiti opsezi vrednosti eksponenta otpuštanja ukazuju na različitu difuziju leka kroz polimernu matricu. Vrednost n za uzorke nanovlaknastih matova S1, S2 i S3 bila je 0,224, 0,490 i 0,204, redom. Ove vrednosti su niže od 0,5, što na osnovu analiza vrednosti eksponenta otpuštanja ukazuje na Pseudo-Fikovu difuziju, koja je u skladu sa cilindričnom strukturom nanovlaknastih matova (tabela 4.3.) (Grkovic i dr., 2017).

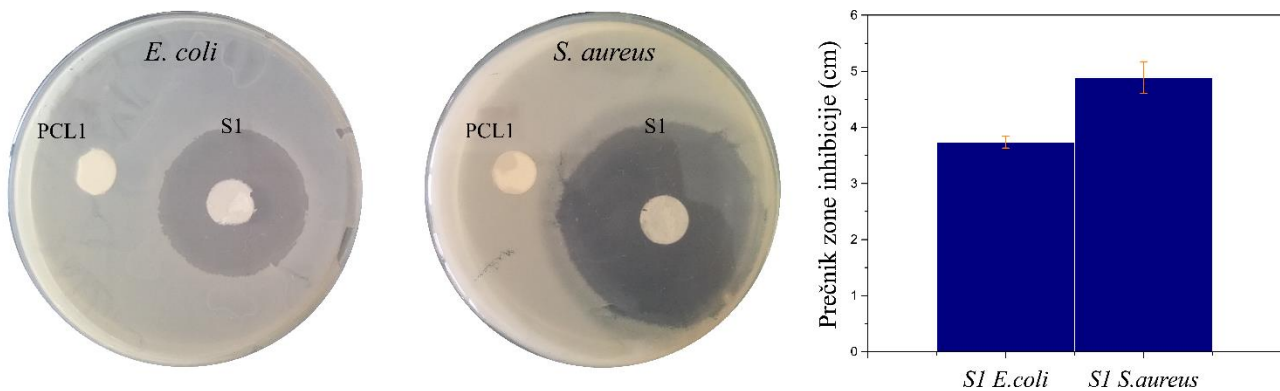
5.1.5. Antibakterijska aktivnost PCL nanovlakana sa cefazolinom

Antibakterijski efekat elektropredenih PCL nanovlakana sa cefazolinom ispitan je prema dve vrste bakterija koje su među najčešćim uzročnicima urinarnih infekcija - *S. aureus* i *E. coli* (Fisher i dr., 2015; Li i dr., 2014). Medicinska sredstava čija primena je povezana sa infekcijom bakterijom *S. aureus* mogu biti intravaskularni kateteri (linijska sepsa), ortopedski uređaji, respiratori, protetski zalisci, vaskularni transplantati i urološki instrumenti (Wasserman i Taljaard, 2011). Ozbiljne stafilokokne infekcije mogu biti endokarditis ili infekcije kostiju i zglobova, dok su manje teške stafilokokne infekcije kože i mekih tkiva (Rayner i Munckhof, 2005). *S. aureus* je vodeći uzročnik bakteriemije, sepse, peritonitisa, pneumonije i endokarditisa, dok se *E. coli* najčešće povezuje sa infekcijama urinarnog trakta (Kim i dr., 2014; Fisher i dr., 2015).

Antibakterijsko dejstvo nanovlaknastih matova ispitano je *in vitro* disk metodom merenjem prečnika zone inhibicije rasta patogenih bakterija. Zona inhibicije je posmatrana kao jasna kružna površina oko ispitivanog uzorka. PCL nanovlakna bez cefazolina su korišćena kao kontrole. Ispitivanja su pokazala da ne dolazi do inhibicije rasta patogenih bakterija oko kontrolnih uzoraka (slike 5.10-5.12.). Stoga se može zaključiti da PCL nanovlakna bez cefazolina nemaju antibakterijski efekat, što je u skladu sa prethodnim izveštajem (Lim i Sultana, 2016).

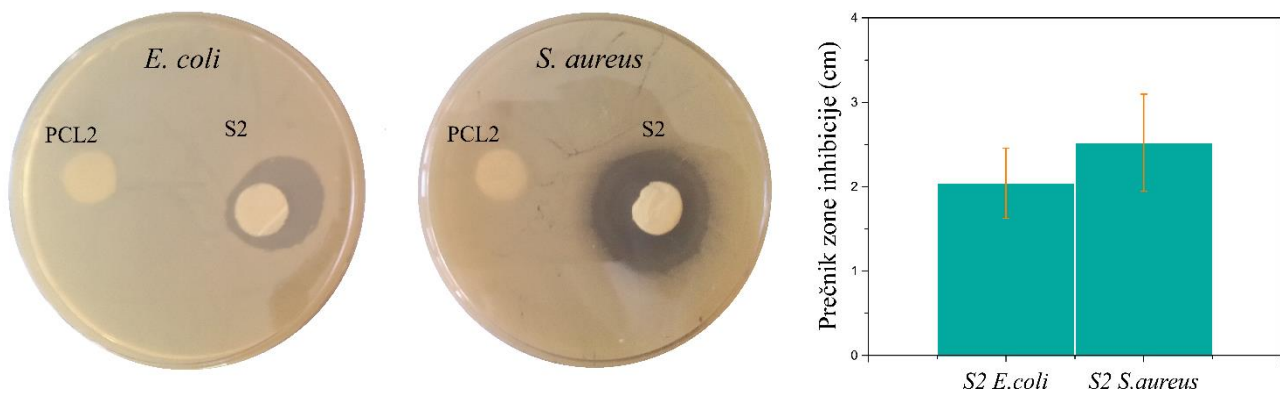
Kao što je očekivano, PCL nanovlakna sa cefazolinom za svaki od ispitivanih uzoraka (S1, S2 i S3), za obe bakterije, pokazala su antibakterijsku aktivnost (slike 5.10-5.12.). Velike zone inhibicije dokazale su da je cefazolin u nanovlaknima ostao u aktivnom obliku, što sugeriše da je njegovo inkorporiranje u polimerna nanovlakna bilo uspešno.

Zona inhibicije oko uzorka S1 bila je $3,7 \pm 0,1$ cm u prečniku za *E. coli* i $4,9 \pm 0,3$ cm za *S. aureus* (slika 5.10.). PCL nanovlaknasti matovi sa cefazolinom u S1, pokazali su veće zone inhibicije u odnosu na druga dva ispitivana uzorka (S2 i S3). Ovo je očekivan rezultat imajući u vidu da je u prva 24 h, $33 \pm 2,7$ % leka otpušteno iz uzorka S1, dok je procenat otpuštenog leka za druga dva uzorka (S2 i S3) bio manji.



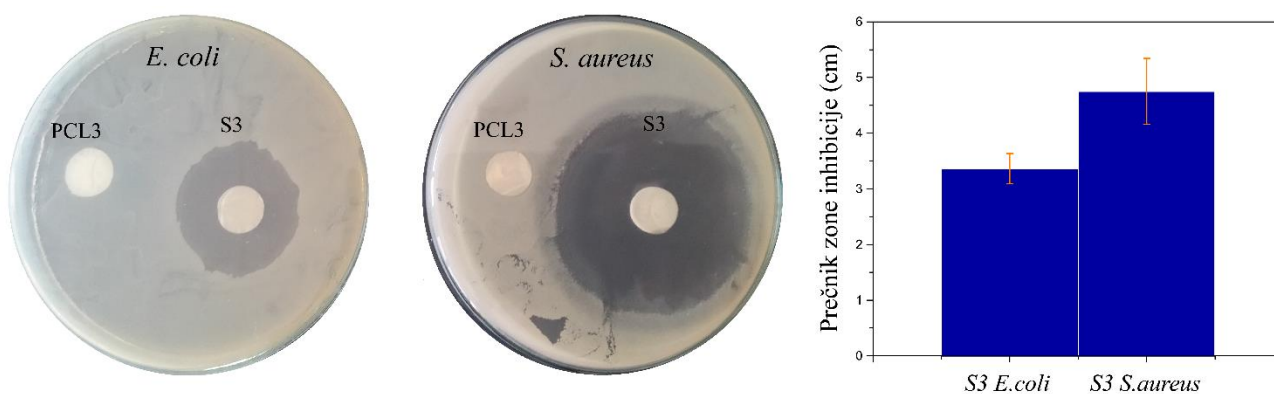
Slika 5.10. Mikrobiološke ploče ispitivanja uticaja nanovlaknastog mata S1 (nanovlakna dobijena rastvaranjem PCL u smeši rastvarača DMF/DCM (1:4) uz dodatak antibiotika procesirana metodom elektropredenja iz rastvora) na rast patogene Gram-negativne bakterije *E. coli* i Gram-pozitivne bakterije *S. Aureus* sa histogramom prečnika zone inhibicije

Za S2, zona inhibicije oko ispitivanog uzorka je bila $2 \pm 0,4$ cm za *E. coli* i $2,5 \pm 0,6$ cm za *S. aureus* (slika 5.11.). Uzorak S2 je pokazao značajno sporiji profil otpuštanja od druga dva analizirana uzorka (S1 i S3), pa se manja zona inhibicije može objasniti sporim oslobađanjem cefazolina iz nanovlaknastog mata S2. Emulziono elektropredenje je korišćena metoda za dobijanje uzorka S2, gde su molekuli cefazolina „obmotani“ surfaktantom i polimerom, i formirana je struktura „jezgromotač“ tokom procesa elektropredenja. Pošto je većina leka inkorporirana u jezgru, hidrofobni polimerni omotač odvaja lek od medijuma u koji je uronjen polimerni nosač leka što dovodi do sporijeg oslobađanja leka iz emulziono elektropredenih nanovlakana S2, samim tim i njegove manje aktivnosti na ispitivane patogene mikroorganizme.



Slika 5.11. Mikrobiološke ploče ispitivanja uticaja nanovlaknastog mata S2 (nanovlakna dobijena rastvaranjem PCL u smeši rastvarača hloroform/metanol (4:1) sa dodatkom Span-80 (1% v/v) i antibiotika procesirana metodom elektropredenja iz rastvora) na rast patogene Gram-negativne bakterije *E. coli* i Gram-pozitivne bakterije *S. Aureus* sa histogramom prečnika zone inhibicije

Konačno, prečnik zone inhibicije je bio $3,4 \pm 0,3$ cm za *E. coli* i $4,7 \pm 0,6$ cm za *S. aureus* za uzorak S3 (slika 5.12.). Neznatno manja zona inhibicije je uočena za uzorak S3 u odnosu na uzorak S1, koji su dobijeni metodom koaksijalnog elektropredenja i metodom elektropredenja iz rastvora, redom. Prilikom koaksijalnog elektropredenja formira se struktura nanovlakana „jezgromotač“, pri čemu je cefazolin inkorporiran u „jezgro“ nanovlakna, a sloj PCL nanovlakana koji čini strukturu „omotača“ odgovoran je za sporiju difuziju leka u odnosu na nanovlaknati mat uzorka S1 u kom ne postoji omotač, što rezultira nešto manjom vrednošću zone inhibicije rasta patogenih mikroorganizama.



Slika 5.12. Mikrobiološke ploče ispitivanja uticaja nanovlaknastog mata S3 (nanovlakna dobijena koaksijalnim elektropredenjem, rastvor za „omotač“ dobijen rastvaranjem PCL u TFE, rastvor „jezgra“ rastvaranjem PCL u TFE uz dodatak antibiotika) na rast patogene Gram-negativne bakterije *E. coli* i Gram-pozitivne bakterije *S. aureus* sa histogramom prečnika zone inhibicije

Cefazolin- antibiotik iz grupe cefalosporina prve generacije se obično koristi za lečenje infekcija i u sistemima za isporuku lekova. Generalno, cefalosporini imaju jaku antibakterijsku aktivnost na Gram-pozitivne bakterije osim na pripadnike roda *Enterococcus*, pri čemu je *S. aureus* najosetljiviji. Gram-negativne bakterije, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Proteus mirabilis* su manje osetljivi na cefalosporine od Gram-pozitivnih koka (Hsieh i Ho, 1975). Takođe je utvrđeno da je *S. aureus* umereno otporna, dok su *E. coli* i *P. aeruginosa* visoko otporne na dejstvo cefazolina (Munir i dr., 2019). Stepenn inhibicije (evidentan kroz veći prečnik zone inhibicije) u ispitivanjima izvedenim u ovoj disertaciji je pokazao da su sva nanovlakna sa cefazolinom u većoj meri inhibirala rast *S. aureus* u poređenju sa inhibicijom rasta *E. coli*. Ovaj rezultat posledica je činjenice da je cefazolin zadržao tipičan način delovanja i nakon inkorporacije u PCL nanovlakna.

Na osnovu dobijenih rezultata zaključuje se da proizvedeni PCL nanovlaknasti matovi sa cefazolinom mogu biti korišćeni kao biomaterijali koji se mogu kombinovati sa kateterima u cilju sprečavanja urinarnih infekcija. Različitim metodama procesiranja PCL nanovlaknastih matova sa cefazolinom, obezbeđena je različita dinamika otpuštanja lekova iz polimerne matrice. Elektropredenjem iz rastvora dobijena su nanovlakna sa naglim otpuštanjem leka, dok su nanovlakna dobijena koaksijalnim elektropredenjem imala nešto nižu stopu otpuštanja, zahvaljujući formiranoj strukturi nanovlakana „jezgro-omotač“. Emulzionim elektropredenjem, dodatkom surfaktanta, postignuto je značajno usporeno oslobađanje. Različita dinamika oslobađanja cefazolina pogodna je jer se i kateteri primenjuju u različitim vremenskim periodima. Postoje dve vrste katetera: kratkoročni kateteri koji se koriste između 1 i 14 dana i dugoročni kateteri koji se obično moraju menjati svakih 4-8 nedelja (Fisher i dr., 2015). Zbog toga bi nanovlaknasti matovi sa inkorporiranim cefazolinom u uzorcima S1 i S3 zbog brzog oslobađanja leka u prvih nekoliko dana bili pogodni za kratkoročne katetere, dok bi dobijeni nanovlaknasti matovi u sistemu S2 bili pogodni za dugoročne katetere, jer pokazuju prolongirano otpuštanje leka.

5.2. Optimizacija procesa dobijanja i karakterizacija suvog ekstrakta hajdučke trave

U cilju dobijanja nanovlakana sa širim spektrom dejstva analizirana je mogućnost inkorporacije prirodnog ekstrakta lekovite biljke - hajdučke trave, koja je od strane Evropske medicinske agencije prepoznata kao lekovita biljka koja pospešuje zarastanje rana (European medicines agency, 2020). Uz to, hajdučka trava pokazuje antimikrobna i antioksidativna svojstva što je čini pogodnim izvorom biološki aktivnih supstanci na prirodnoj bazi, za inkorporiranje u PCL nanovlakna. U okviru rada na ovoj disertaciji optimizovani su uslovi sušenja raspršivanjem tečnog ekstrakta hajdučke trave pomoću metode planiranog eksperimenta, da bi se omogućilo inkorporiranje adekvatne količine ekstrakta u polimerna nanovlakna. Primenjena je metoda odzivnih površina, pomoću *Design Expert* softvera sa ciljem dobijanja što većeg prinosa ekstrakta sa očuvanim biološkim svojstvima. Karakterizacija ekstrakta uključila je određivanje sadržaja suve materije, sadržaja ukupnih polifenola, kao osnovnih bioaktivnih supstanci hajdučke trave, antioksidativne i antibakterijske aktivnosti suvog ekstrakta.

5.2.1. Postavljanje modela

Da bi se utvrdili optimalni uslovi za izvođenje procesa sušenja raspršivanjem tečnog ekstrakta hajdučke trave i dobijanja suvog ekstrakta sa maksimalnim prinomom i maksimalnom antioksidativnom aktivnošću, korišćena je metoda odzivnih površina (RSM) i centralni kompozitni dizajn (CCD). Izabrane su tri procesne promenljive koje mogu da utiču na proces sušenja tečnih ekstrakta, a to su: temperatura, brzina protoka tečnog ekstrakta i sadržaj suve materije u tečnom ekstraktu. Prema eksperimentalnom dizajnu, sušenje raspršivanjem je izvedeno pri promenljivim temperaturama ulaznog vazduha (95-195 °C), brzinama protoka tečnog ekstrakta (3-21 ml/min) i sadržaju suve materije u tečnim ekstraktima (0,3-1,5 %). Nakon izvođenja 23 predviđena eksperimenta sušenja raspršivanjem, 8 serija eksperimenata dalo je proizvod lošeg kvaliteta (pri niskim temperaturama i malim brzinama protoka dobijen je nedovoljno osušen materijal). Ove eksperimentalne tačke su eliminisane iz proračuna u modelu, a dizajn istorijskih podataka sa 15 eksperimentalnih serija je izabran za modelovanje i analizu odnosa između ulaznih parametara i odgovora. Kao rezultat toga, analizirane su procesne promenljive sa smanjenim opsezima, i to: temperatura, 120-195 °C (A); protok, 3-16,5 ml/min (B) i sadržaj suve materije, 0,3-1,5 % (C). Praćen je uticaj ovih procesnih promenljivih na tri odziva sistema (prinos sušenja (Y1), ukupan sadržaj polifenola (Y2) i antioksidativna aktivnost (Y3) u osušenom ekstraktu hajdučke trave (tabela 5.2.). Na osnovu eksperimentalno dobijenih vrednosti za izlazne promenljive postavljeni su matematički modeli kubnog stepena kojima je opisana zavisnost između tri ispitivane procesne promenljive i tri odziva sistema.

Uticaj procesnih parametara (temperatura, brzina protoka tečnog ekstrakta i sadržaj suve materije u tečnom ekstraktu) na odzive je prikazan u daljem tekstu prilikom analize ponašanja svakog od odziva redom.

Tabela 5.2. Vrednosti procesnih promenljivih i odziva u eksperimentalnom dizajnu modela optimizacije sušenja raspršivanjem

Proba	Procesne promenljive			Odzivi		
	A	B	C	Y1	Y2	Y3
	(°C)	(ml/min)	(%)	(%)	(mgGAE/g)	(%)
1	120	7,5	0,6	62	145	41,5
2	120	7,5	1,2	65	137	53
3	145	3	0,9	41	148	47
4	145	3	0,9	27	141	54
5	145	12	0,3	20	140	61
6	145	12	0,3	25	137	59
7	145	12	0,9	38	155	57
8	145	12	0,9	40	157	58
9	145	12	0,9	37	149	59
10	145	12	1,5	8	131	47
11	145	12	1,5	11	137	49
12	170	7,5	0,6	39	145	64
13	170	7,5	1,2	75	135	41
14	170	16,5	0,6	45	141	42
15	195	12	0,9	65	154	62

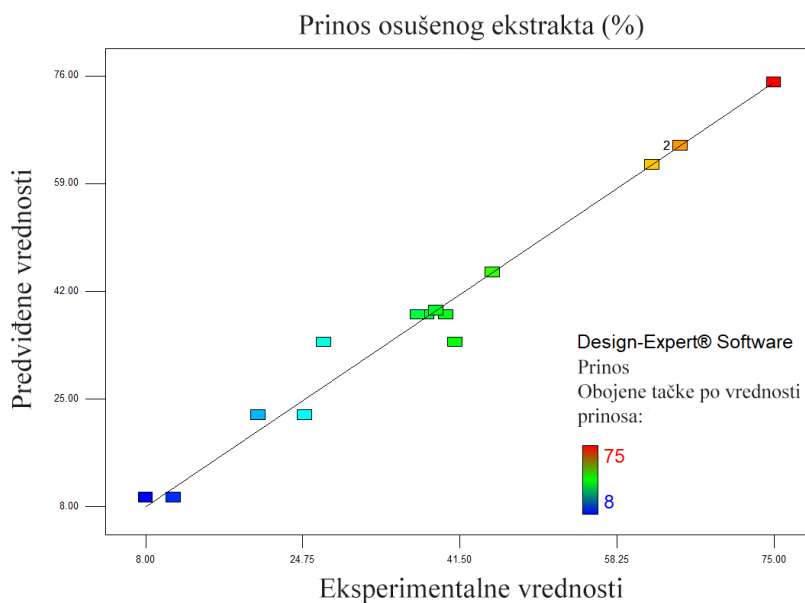
5.2.2. Uticaj procesnih parametara na prinos osušenog ekstrakta

Visok prinos je jedan od ciljeva procesa sušenja raspršivanjem. U ispitivanim uslovima sušenja prinos je varirao od 8 do 75 % (tabela 5.2.). Najveći prinos proizvoda od 75 % ostvaren je pri temperaturi ulaznog vazduha od 170 °C, brzini protoka tečnog ekstrakta od 7,5 ml/min i sadržaju suve materije u tečnom ekstraktu od 1,2 % (tabela 5.2., proba 13.). Najniži prinos dobijen je pri temperaturi ulaznog vazduha od 145 °C, brzini protoka tečnog ekstrakta od 12 ml/min i sadržaju suve materije u tečnom ekstraktu od 1,5 % (tabela 5.2., proba 10.) što je ukazalo na to da su odabrani procesni parametri u velikoj meri uticali na ispitivani odgovor. Primenom višestruke regresione analize dobijena je zavisnost između prinosa sušenja i tri nezavisne promenljive (temperatura, brzina protoka tečnog ekstrakta i sadržaj suve materije u tečnom ekstraktu), koja se opisuje sledećom jednačinom:

$$Y1 = 22.75 - 24.50 A - 38.42 B - 28.83 C - 128.25 AB - 67.00 AC - 113.17 BC + 66.75 A^2 - 22.33 C^2 - 183.50 ABC \quad (5.1)$$

gde je Y1 (prinos sušenja) odziv, a procesne promenljive su A (temperatura), B (brzina protoka tečnog ekstrakta) i C (sadržaj suve materije u tečnom ekstraktu). Prilikom postavljanja modela korišćena je „backward“ regresija, pomoću koje su iz modela eliminisani članovi koji nisu značajno uticali na odziv ($p > 0,1$).

Analizom varijanse (ANOVA) ocenjena je adekvatnost i statistička značajnost modela na osnovu koeficijenta determinacije (r^2). Vrednost koeficijenta determinacije za matematički model prinosa sušenja je iznosio 0,98, što pokazuje da postoji dobra korelacija modelom predviđenih i eksperimentalno dobijenih rezultata (slika 5.13.). „Adekvatna preciznost“ koja meri odnos signala i šuma, imala je vrednost od 16,40 (značajno veći od 4), što ukazuje na to da je postavljen model dao adekvatan signal. Nedostatak fitovanja za model nije bio značajan, tako da se model može smatrati adekvatnim.

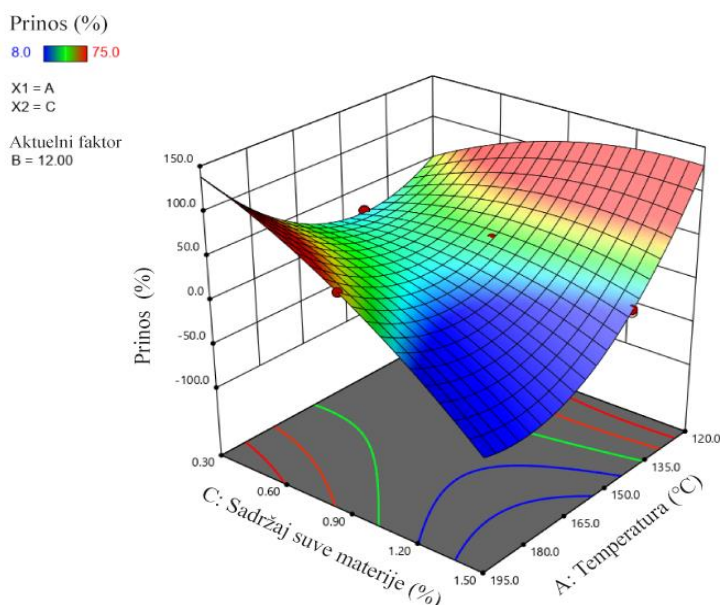


Slika 5.13. Slaganje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti prinosa u eksperimentalnom dizajnu sušenja raspršivanjem tečnog ekstrakta hajdučke trave

Višestruka regresiona analiza podataka ukazala je na to da su značajan uticaj na prinos osušenog ekstrakta imala tri linearna člana (A, B i C), tri parametra interakcije (AB, AC i BC), dva kvadratna člana (A^2 i C^2) i jedan kubni parametar interakcije (ABC). Pozitivan predznak kvadratnog člana temperature (A^2 , jednačina (5.1)) ukazivao je na prisustvo minimuma funkcije, dok je negativan predznak kvadratnog člana u odnosu na sadržaj suve materije u tečnom ekstraktu (C^2) ukazivao na postojanje maksimuma funkcije. Interakcije između temperature i brzine protoka tečnog ekstrakta, između temperature i sadržaja suve materije u tečnom ekstraktu i između brzine protoka tečnog ekstrakta i sadržaja suve materije u tečnom ekstraktu imale su antagonistički efekat na prinos osušenog ekstrakta.

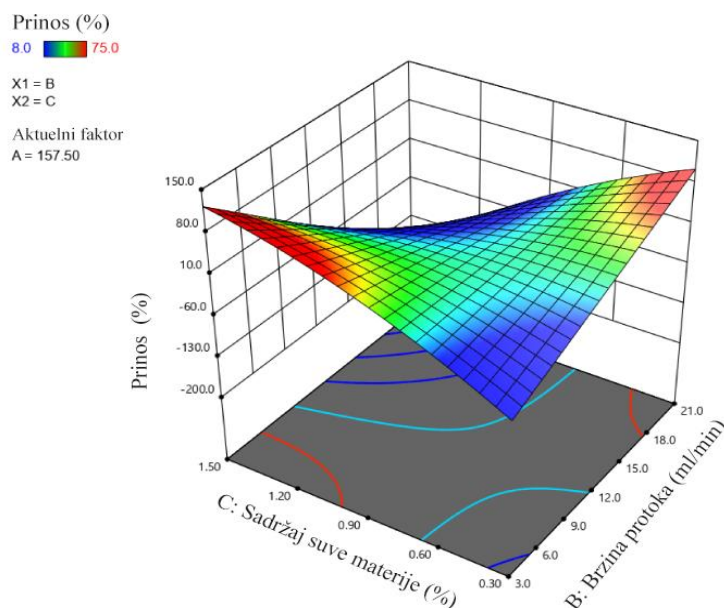
Prinos osušenog ekstrakta se povećavao kada je sadržaj suve materije u tečnom ekstraktu bio u opsegu 0,9-1,2 % i dostigao je najvišu vrednost sa 1,2 % sadržaja suve materije u tečnom ekstraktu (slika 5.14.). U literaturi je dokumentovano da kada se koncentracija polazne tečnosti povećava, količina vlage se smanjuje zajedno sa energijom potrebnom za isparavanje vode (Tontul i Topuz, 2017). Sa većom koncentracijom polazne tečnosti, potpunije sušenje sprečava lepljenje i dolazi do boljeg odvajanja proizvoda a time i većeg prinosa sušenja (Billon i dr., 2000; Nguyen i dr., 2017). Dodatna prednost je što koncentrisaniji rastvori obezbeđuju veće čestice sa boljim odvajanjem u ciklonu (Prinn i dr., 2002; Poozesh i dr., 2020). Međutim, prekomerno povećanje koncentracije polazne tečnosti (u ovoj disertaciji to su bile vrednosti do 1,5 % sadržaja suve materije u tečnom ekstraktu) može da dovede do formiranja prevelikih čestica koje se suše sporije od manjih. Ova

pojava povećava taloženje u komori za sušenje i samim tim smanjuje prinos sušenja (Maurya i dr., 2005).



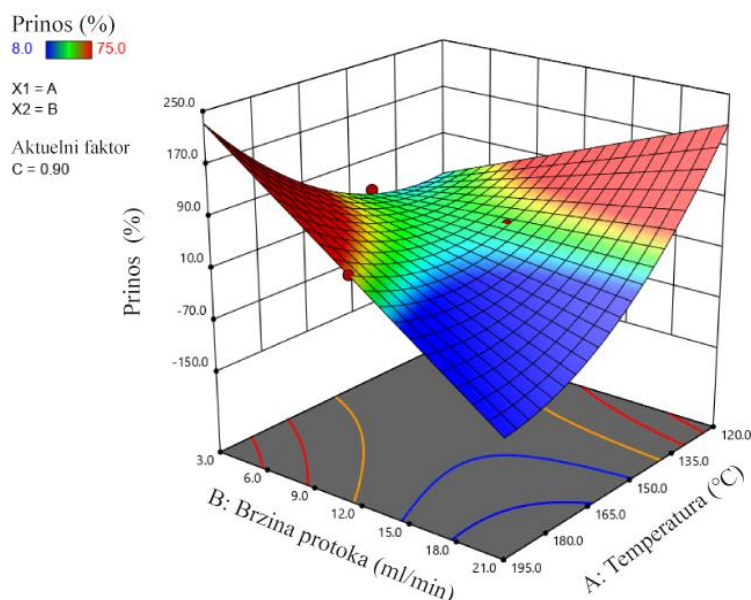
Slika 5.14. Odzivne površine međusobnih uticaja temperature i sadržaja suve materije u tečnom ekstraktu (AC) na prinos osušenog ekstrakta hajdučke trave (Y1) (Radisavljević i dr., 2020)

Maksimalni prinos sušenja je dobijen pri brzini protoka tečnog ekstrakta od 7,5 ml/min (slika 5.15.). Postojanje maksimuma funkcije može se objasniti vremenom zadržavanja tečnosti. Konkretno, kako se brzina protoka tečnosti smanjuje, vreme zadržavanja tečnosti se povećava dajući kapljicama šansu za sušenje. Shodno tome, kako se povećava protok, vreme zadržavanja se smanjuje što rezultira nepotpunim sušenjem i slabijim prinosom. Isti trend koji je primećen u okviru rada na ovoj disertaciji objavili su i drugi (Gallo i dr., 2011; Telang i Thorat, 2010). I prethodna istraživanja su favorizovala niže brzine protoka koje su omogućile potpunije isparavanje vode i smanjile verovatnoću disperzije i kondenzacije na zidovima komore, što je posledično dalo bolje prinose procesa sušenja. Takođe, u jednoj studiji je pokazano da brzina protoka može da izazove negativan efekat na prinos sušenja jer veće brzine protoka mogu da izazovu začepljenje mlaznice za raspršivanje (Toneli i dr., 2010). Negativan uticaj većih protoka na prinos mogao bi se objasniti i smanjenjem temperature izlaznog vazduha, a posledično nižim snabdevanjem toplotnom energijom koja može biti nedovoljna za potpuno sušenje. Kada su u okviru ispitivanja primenjeni visoki protoci, došlo je do lepljenja u komori za sušenje, što je smanjilo prinos i povećalo sadržaj vlage, u skladu sa radom Mihajlovic i dr., 2011.



Slika 5.15. Odzivne površine međusobnih uticaja brzine protoka tečnog ekstrakta i sadržaja suve materije u tečnom ekstraktu (BC) na prinos osušenog ekstrakta hajdučke trave (Y1) (Radisavljević i dr., 2020)

Temperatura je različito uticala na prinos procesa sušenja u okviru ispitivanog temperaturnog opsega (od 120 do 195 °C). Visok prinos postignut je u dva slučaja: 1) kada su kombinovane niska temperatura, niži protok tečnog ekstrakta i visok sadržaj suve materije u tečnom ekstraktu, ili 2) kada su pri sušenju kombinovane visoka temperatura, mali protok tečnog ekstrakta i visok sadržaj suve materije u tečnom ekstraktu. Generalno, na temperaturi od 170 °C prinos je dostigao maksimalnu vrednost, dok je nešto niži prinos primećen na temperaturi od 120 °C sa istim sadržajem suve materije u tečnom ekstraktu (slika 5.16.).



Slika 5.16. Odzivne površine međusobnih uticaja temperature i brzine protoka tečnog ekstrakta (AB) na prinos osušenog ekstrakta hajdučke trave (Y1) (Radisavljević i dr., 2020)

Iako bi u teoriji efikasnost sušenja pri nižim temperaturama i veoma visokim protocima trebalo da bude olakšana, u ovoj disertaciji su se u ovim uslovima čestice lepile, što je u skladu sa

zapažanjima drugih (Mihajlovic i dr., 2011; Tee i dr., 2012). Kada se koriste više temperature ulaznog vazduha, veća je efikasnost prenosa toplote i mase i smanjuje se verovatnoća udara neadekvatnih čestica o zid komore za sušenje (Goula i Adamopoulos, 2005a; Tonon i dr., 2008; Ramos i dr., 2016). Takođe, niži sadržaj vlage u prahu na višoj temperaturi, smanjuje taloženje vlažnih čestica na zidovima raspršivača, a time se povećava prinos procesa sušenja (Jafari i dr., 2017; Pinon-Balderrama i dr., 2020).

5.2.3. Uticaj procesnih parametara na ukupan sadržaj polifenola u osušenom ekstraktu

Primenom višestruke regresione analize nije dobijena zavisnost između ukupnog sadržaja polifenola i analiziranih nezavisnih promenljivih, tako da se može zaključiti da uslovi sušenja nisu značajno uticali na ukupan sadržaj polifenola u suvim ekstraktima. Ukupan sadržaj polifenola u osušnim ekstraktima dobijenim u ispitivanim uslovima sušenja raspršivanjem bio je u rasponu od 131-157 mg GAE/g suve materije, što je bilo uporedivo sa vrednošću ukupnog sadržaja polifenola u polaznom tečnom ekstraktu, koji je iznosio 152 mg GAE/g suve materije. Iako je tipično da se primeti blagi pad sadržaja polifenola u osušnim ekstraktima kao rezultat njihovog izlaganja visokoj temperaturi (Eldridge i dr., 2014; Bastias-Montes i dr., 2019), izbor relativno blagih uslova sušenja u ovoj disertaciji očigledno je sprečio bilo kakvu degradaciju polifenola.

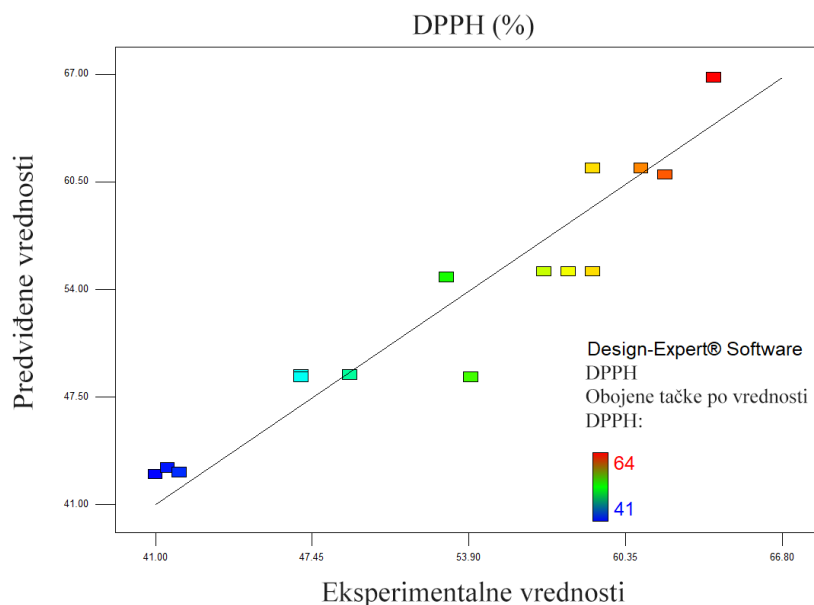
5.2.4. Uticaj procesnih parametara na antioksidativnu aktivnost osušenog ekstrakta

Primenom višestruke regresione analize dobijena je zavisnost između antioksidativne aktivnosti suvog ekstrakta i tri nezavisne promenljive (temperatura, brzina protoka tečnog ekstrakta i sadržaj suve materije u tečnom ekstraktu), koja se opisuje sledećom jednačinom:

$$Y3 = 56.54 + 4.38 A + 6.37 B + 18.72 AC + 30.20 BC + 90.64 ABC \quad (5.2)$$

gde je Y3 (antioksidativna aktivnost) odziv, a procesne promenljive su A (temperatura), B (brzina protoka tečnog ekstrakta) i C (sadržaj suve materije u tečnom ekstraktu).

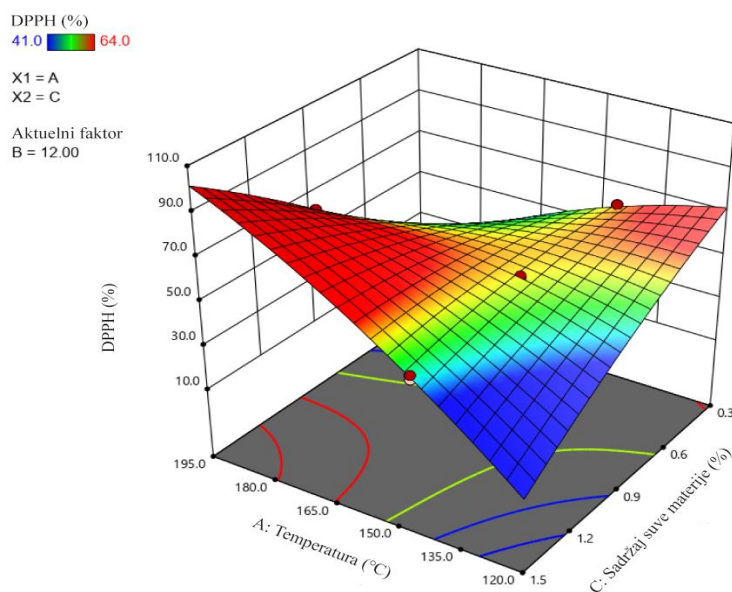
Analizom varijanse (ANOVA) ocenjena je adekvatnost i statistička značajnost modela na osnovu koeficijenta determinacije (r^2). Vrednost koeficijenta determinacije za jednačinu kojom je modelovana antioksidativna aktivnost polifenola u ekstraktima iznosila je 0,96, što pokazuje da postoji dobra korelacija između modelom predviđenih i eksperimentalno dobijenih rezultata (slika 5.17.). „Adekvatna preciznost“ meri odnos signala i šuma, a poželjan je odnos veći od 4. Odnos 12,21 za antioksidativnu aktivnost ukazuje na to da je postavljen model dao adekvatan signal. Nedostatak fitovanja za model nije bio značajan, tako da se može smatrati adekvatnim.



Slika 5.17. Slaganje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti antioksidativne aktivnosti u eksperimentalnom dizajnu sušenja raspršivanjem tečnog ekstrakta hajdučke trave

Na antioksidativnu aktivnost suvih ekstrakata značajno su uticala dva linearna (A, B), dva parametra interakcije (AC, BC) i jedan kubni parametar interakcije (ABC). Jednačina (5.2) pokazuje da su oba linearna parametra (temperatura i brzina protoka tečnog ekstrakta) pozitivno uticala na antioksidativnu aktivnost, što ukazuje da se povećanjem ovih faktora postiže veća antioksidativna aktivnost osušenog ekstrakta. Interakcije između temperature i sadržaja suve materije u tečnom ekstraktu, između brzine protoka tečnog ekstrakta i sadržaja suve materije u tečnom ekstraktu i između svih ispitivanih parametara (ABC) imale su sinergijski i pozitivan efekat na antioksidativnu aktivnost.

Iako je postojao značajan uticaj procesnih parametara na antioksidativnu aktivnost osušenih ekstrakata, treba naglasiti da u poređenju sa antioksidativnom aktivnošću tečnog ekstrakta (64 %), neznatna promena antioksidativne aktivnosti primećena je nakon procesa sušenja. Temperatura je različito uticala na antioksidativnu aktivnost suvih ekstrakata u okviru ispitivanog temperaturnog opsega (od 120 do 195 °C). Minimalna vrednost antioksidativne aktivnosti suvog ekstrakta je dobijena pri temperaturi od 120 °C (41,5 %), dok je maksimalna antioksidativna aktivnost suvog ekstrakta dobijena pri temperaturi od 170 °C (64 %), pri istoj brzini protoka tečnog ekstrakta od 7,5 ml/min i sadržaju suve materije u tečnom ekstraktu od 0,6 % (slika 5.18.).



Slika 5.18. Odzivne površine međusobnih uticaja temperature i i sadržaja suve materije u tečnom ekstraktu (AC) na antioksidativnu aktivnost osušenog ekstrakta hajdučke trave (Y3) (Radisavljević i dr., 2020)

Antioksidativna aktivnost dobijenih prahova je u pozitivnoj korelaciji sa ukupnim sadržajem polifenola, koji nisu termo stabilna jedinjenja. Iako u ovom radu nije primećen značajan pad ukupnog sadržaja polifenola, uslovi sušenja su uticali na njihovu antioksidativnu aktivnost. Ranija istraživanja su pokazala da pri visokim temperaturama dolazi do većeg isparavanje vode; stoga je sušenje brže, vreme kontakta između komponenti i vrućeg vazduha je kraće, pa je i gubitak labilnih jedinjenja manji (Souza i dr., 2015). Postoje i primeri povećanja ukupnog sadržaja polifenola nakon termičke obrade različitih prehrambenih proizvoda nakon sušenja: zelene paprike, boranije, spanaća (Turkmen i dr., 2005) ili crnog luka (Sharma i dr., 2015). Ovo povećanje se pripisuje oslobađanju fenolnih jedinjenja cepanjem esterifikovane i glikozilovane veze (Sharma i dr., 2015). Dok u ovoj disertaciji nije uočen nikakav uticaj uslova sušenja na ukupan sadržaj polifenola, blagi pad antioksidativne aktivnosti se može pripisati suptilnim promenama u hemijskoj prirodi polifenola. Slični rezultati blagog smanjenja antioksidativne aktivnosti nakon sušenja zabeležili su i drugi (Fang i Bhandari, 2011; Edrisi i Langrish, 2016).

5.2.5. Validacija modela

Primenom metode željene funkcije (eng. *Desirability function*) definisani su optimalni uslovi sušenja raspršivanjem za dobijanje maksimalnog prinosa sušenja ekstrakata hajdučke trave sa maksimalnom antioksidativnom aktivnošću. Postupkom numeričke optimizacije dobijeni su sledeći uslovi sušenja raspršivanjem: temperatura od 130 °C; brzina protoka tečnog ekstrakta od 7,5 ml/min i sadržaj suve materije u tečnom ekstraktu od 1,2 %. Pri navedenim uslovima predviđene vrednosti izlaznih promenljivih su iznosile: za prinos sušenja 61 %, a za antioksidativnu aktivnost 57 %. Izvođenjem procesa sušenja raspršivanjem pod predloženim optimalnim uslovima dobijene su sledeće vrednosti izlaznih promenljivih: prinos osušenog ekstrakta 66 % i antioksidativna aktivnost 58 %. Dobijene vrednosti izlaznih promenljivih se uklapaju u 95 % interval predviđanja (PI), čime je izvršena validacija modela, na osnovu koje se može zaključiti da su razvijeni matematički modeli adekvatni.

Antioksidativna aktivnost suvog ekstrakta dobijenog pod optimalnim uslovima sušenja iznosila je 58 %, što je označilo blagi pad aktivnosti uklanjanja radikala tečnog ekstrakta koji je iznosio 64 %. U poređenju sa ukupnim sadržajem polifenola u tečnom ekstraktu (152 mg GAE/g),

došlo je do blagog smanjenja ukupnog sadržaja polifenola nakon sušenja ekstrakta (145 mg GAE/g). Ovaj rezultat ukazuje na značajnije smanjenje antioksidativnog kapaciteta u poređenju sa smanjenjem ukupnog sadržaja polifenola. Oko 91 % antioksidativnog kapaciteta je zadržano nakon procesa sušenja, dok je 95 % ukupnog sadržaja polifenola sačuvano u osušenom ekstraktu.

5.2.6. Antibakterijska aktivnost tečnog i suvog ekstrakta

Antibakterijska aktivnost lekovitih biljaka je rezultat kombinovanog dejstva različitih jedinjenja, uglavnom polifenola. U ovoj studiji procenjena je antibakterijska aktivnost osušenog ekstrakta hajdučke trave dobijenog pri optimalnim uslovima sušenja, na dve vrste patogena. Rezultati su pokazali da je antibakterijska aktivnost ekstrakta hajdučke trave na *S. aureus* i *P. aeruginosa* očuvana nakon procesa sušenja. Dok je osetljivost *P. aeruginosa* bila slična kod tečnog i suvog ekstrakta (MIK vrednost 20 mg/ml), u skladu sa blagim smanjenjem antioksidativne aktivnosti, osušeni ekstrakt je bio nešto manje efikasan u suzbijanju rasta *S. aureus* (MIK vrednost tečnog ekstrakta bila je 5 mg/ml, dok je za suvi ekstrakt iznosila 10 mg/ml).

Opšte je poznato da su biljni polifenoli efikasni u suzbijanju rasta posebno Gram-pozitivnih bakterija (Frey i Meyers, 2010), što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji. Slaba antibakterijska aktivnost na Gram-negativne bakterije generalno je uobičajena pojava za biljne ekstrakte bogate polifenolima. Otpornost Gram-negativnih bakterija može se pripisati strukturi njihovog ćelijskog zida. Naime, ćelijski zid ovih bakterija sadrži lipopolisaharid, koji je nepropustan za polifenole (Nostro i dr., 2000; Li i dr., 2019). Zapažanje da su Gram-negativne bakterije manje osetljive na antibakterijsku aktivnost *A. millefolium* od Gram-pozitivnih takođe su pokazali i drugi (Tajik i dr., 2008).

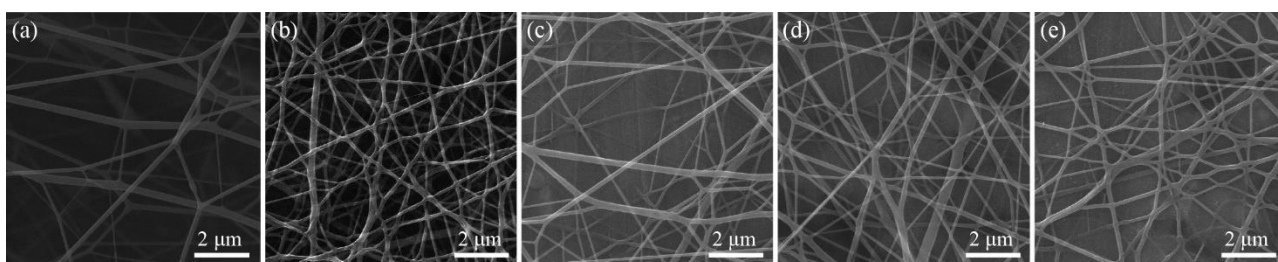
5.3. Karakterizacija PCL nanovlakana sa suvim ekstraktom hajdučke trave

U cilju dobijanja biomaterijala na bazi nanovlakana sa širom biološkom aktivnošću od antibakterijske, ispitana je mogućnost inkorporacije 5 mas%, 10 mas%, 15 mas% i 20 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave u PCL nanovlakna procesirana metodom elektropredenja iz rastvora. Ova nanovlakna su karakterisana u smislu morfologije, eventualne hemijske interakcije između suvog ekstrakta i polimera, termičkih i mehaničkih svojstava materijala, profila oslobađanja polifenola iz nanovlakana, kao i antibakterijske i antioksidativne aktivnosti nanovlakana.

5.3.1. Morfološke karakteristike PCL nanovlakana sa suvim ekstraktom hajdučke trave

Morfologija uzoraka PCL nanovlaknastih matova sa i bez dodatka suvog ekstrakta hajdučke trave utvrđena je skenirajućom elektronskom mikroskopijom sa emisijom polja. Rastvor PCL napravljen je rastvaranjem PCL granula u TFE i procesiran metodom elektropredenja iz rastvora. Proces elektropredenja je izveden za nanovlakna sa i bez dodatka suvog ekstrakta hajdučke trave pod istim uslovima - pri brzini protoka polimernog rastvora od 3 ml/h, naponu od 29 kV i rastojanju 10 cm od igle do kolektora, da bi se smanjio broj perli na nanovlaknima i sa ciljem procesiranja ultra tankih nanovlakana. Analiza FE-SEM mikrografija PCL nanovlakana pokazala je nasumičnu orijentaciju vlakana, glatke cilindrične morfologije (slika 5.19. (a)).

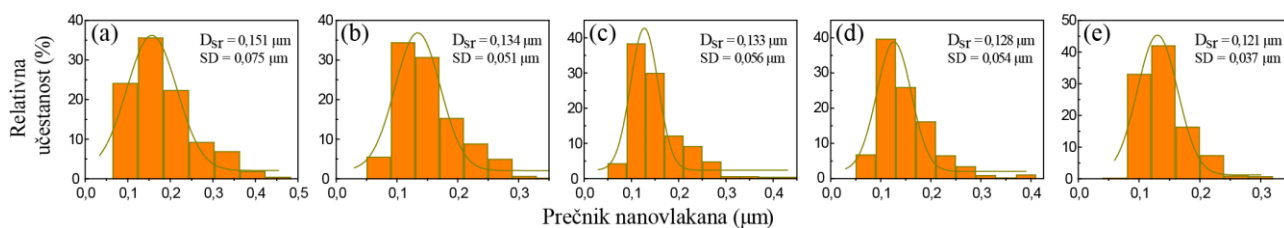
PCL nanovlakna sa dodatkom suvog ekstrakta hajdučke trave su imala sličnu morfologiju kao i PCL nanovlakna (slika 5.19. (b-e)). Ovo ukazuje da dodatak suvog ekstrakta hajdučke trave nije imao nepovoljan uticaj na formiranje nanovlakana tokom procesa elektropredenja. Dobijeni su dobro oblikovani nanovlaknasti matovi sa različitim sadržajima suvog ekstrakta hajdučke trave. Glatka, uniformna PCL nanovlakna sa dodatkom ekstrakta hajdučke trave su dobijena sa svim testiranim koncentracijama (5-20 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave) i formirani su kontinualni netkani nanovlaknasti matovi. FE-SEM analizom nije primećeno prisustvo čestica suvog ekstrakta hajdučke trave na spoljašnjosti nanovlakana (slika 5.19. (b-e)). Međutim, dok su nanovlaknasti matovi PCL i PCL sa dodatkom 5 mas% , 10 mas% i 15 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave bili homogeni po izgledu, kod PCL nanovlaknastog mata sa dodatkom 20 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave javile su se tamnozeleno-žute tačke sporadično raspoređene na površini nanovlaknastog mata. Tačke su imale približan prečnik od 1 μm i mogu da ukažu na prisustvo aglomerata suvog ekstrakta hajdučke trave u materijalu.



Slika 5.19. FE-SEM mikrografije nanovlakana PCL rastvorenog u TFE i procesiranog metodom elektropredenja iz rastvora i to (a) PCL, (b) PCL/HT5 (PCL sa dodatkom 5 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave), (c) PCL/HT10 (PCL sa dodatkom 10 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave), (d) PCL/HT15 (PCL sa dodatkom 15 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave) i (e) PCL/HT20 (PCL sa dodatkom 20 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave)

Analizom FE-SEM mikrografija pomoću *Image-Pro Plus* softverskog paketa, utvrđeno je da su prosečne vrednosti prečnika nanovlakana bez dodatka i sa dodatkom suvog ekstrakta hajdučke trave sa masenim udelom od 5 % , 10 % , 15 % i 20 % iznosile $0,151 \pm 0,075 \mu\text{m}$, $0,134 \pm 0,051 \mu\text{m}$, $0,133 \pm 0,056 \mu\text{m}$, $0,128 \pm 0,054 \mu\text{m}$ i $0,121 \pm 0,037 \mu\text{m}$, redom (slika 5.20. (a-e)). Uticaj dodatka ekstrakta hajdučke trave na prečnik dobijenih PLC nanovlakana procenjen je Studentovim t-testom,

a razlika se smatrala statistički značajnom sa p vrednošću manjom od 0,05 (Grech, 2018). Pokazano je da je dodatak suvog ekstrakta hajdučke trave u svim koncentracijama doveo do blagog, ali statistički značajnog smanjenja prečnika nanovlakana ($p < 0,01$). Slični rezultati su dobijeni i u drugom istraživanju gde su lekovite biljke inkorporirane u nanovlakna (Salevic i dr., 2019). Jedan od mehanizama koji je doveo do smanjenja prečnika nanovlakana mogao bi se pripisati uticaju dodatka ekstrakta hajdučke trave na gustinu naelektrisanja rastvora za elektropredenje. Naime, prisustvo fenolnih jedinjenja u suvom ekstraktu hajdučke trave doprinosi većoj provodljivosti rastvora i samim tim različitom ponašanju rastvora tokom procesa elektropredenja, što je u skladu sa istraživanjima uticaja dodatka ekstrakta *Gymnema sylvestre* na elektropredena PCL/želatin nanovlakna (Ramalingam i dr., 2019). Dodavanje suvog ekstrakta hajdučke trave, kao prirodnog surfaktanta, takođe bi moglo da izazove smanjenje površinskog napona PCL rastvora (Mao i dr., 2021; Coverdale i dr., 2017). Manji površinski napon smanjuje otpor primenjenoj električnoj sili, što uzrokuje da se mlaz više rasteže, što rezultira tanjim prečnikom vlakana (Icoglu i Ogulata, 2017).



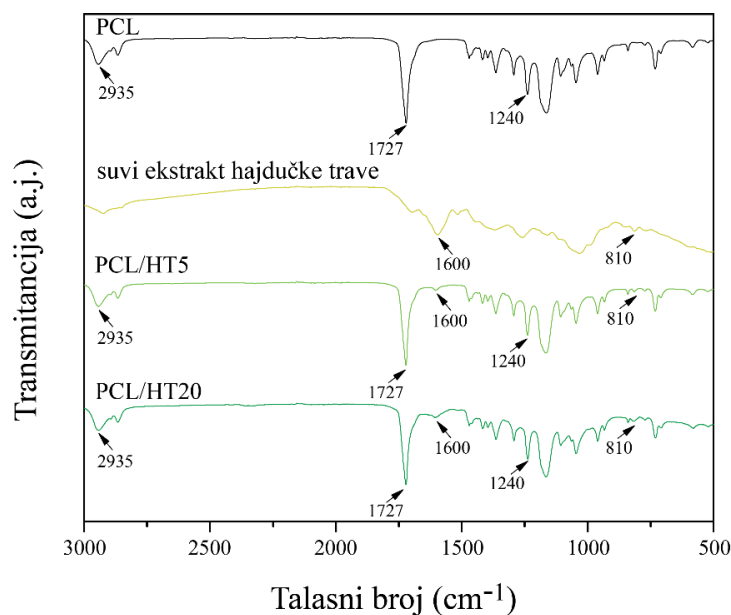
Slika 5.20. Raspodela prečnika nanovlakana PCL rastvorenog u TFE i procesiranog metodom elektropredenja iz rastvora i to (a) PCL, (b) PCL/HT5 (PCL sa dodatkom 5 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave), (c) PCL/HT10 (PCL sa dodatkom 10 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave), (d) PCL/HT15 (PCL sa dodatkom 15 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave) i (e) PCL/HT20 (PCL sa dodatkom 20 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave)

5.3.2. Hemijske interakcije u PCL nanovlaknima sa suvim ekstraktom hajdučke trave

Hemijski sastav čistih komponenti i njihove eventualne hemijske interakcije u PCL nanovlaknastim matovima sa suvim ekstraktom hajdučke trave analizirane su FTIR metodom. Spektri PCL nanovlakana, suvog ekstrakta hajdučke trave i dva uzorka nanovlakana PCL sa 5 mas% i 20 mas% suvog ekstrakta, kao primeri, predstavljani su na slici 5.21. Kao što je ilustrovano na slici 5.21., pikovi koji odgovaraju PCL nanovlaknima i suvom ekstraktu hajdučke trave uočeni su u spektrima PCL nanovlakana sa suvim ekstraktom hajdučke trave, što je sugerisalo na uspešnu inkorporaciju ekstrakta u polimerna nanovlakna.

PCL nanovlakna su pokazala karakteristične pikove na 1721 cm^{-1} (istezanje karakteristično za karbonilnu grupu), 1293 cm^{-1} (istezanje C–O i C–C veze iz kristalne faze), 1238 cm^{-1} (asimetrično C–O–C istezanje) i 1163 cm^{-1} (simetrično C–O–C istezanje). Dva pika koja su se pojavila na 2944 cm^{-1} i 2866 cm^{-1} odgovarala su asimetričnom i simetričnom –CH₂ istežanju, redom (Veras i dr., 2016; Veras i dr., 2020).

Spektar suvog ekstrakta hajdučke trave pokazao je pik na 2851 cm^{-1} koji potiče od vibracija istežanja simetričnih i asimetričnih alifatičnih grupa koje su prisutne u složenoj smeši različitih biomolekula u ekstraktu hajdučke trave. Pikovi na 1600 cm^{-1} i 1513 cm^{-1} su pripisani C=O vibracijama istežanja i N–H vibracijama savijanja. Pikovi na 1447 cm^{-1} , 1258 cm^{-1} i 1031 cm^{-1} potiču od C–C rastežanja fenil grupa, karbonil C–O vibracija istežanja i apsorpcije vibracija istežanja C–O koje je karakteristično za mono- i oligosaharide odnosno, ugljene hidrate, redom. Pik na 810 cm^{-1} potiče od C–H vibracija savijanja van ravni (Topala i dr., 2017; Werner i dr., 2006).



Slika 5.21. FTIR spektri: suvog ekstrakta hajdučke trave i PCL nanovlaknastih matova dobijenih metodom elektropredenja iz rastvora, i to PCL i PCL sa 5 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave (PCL/HT5) i PCL sa 20 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave (PCL/HT20)

FTIR spektri nanovlaknastih matova sa suvim ekstraktom hajdučke trave u svim koncentracijama su pokazali identifikacione pikove na 1600 cm⁻¹ i 810 cm⁻¹, koji su karakteristični za C=O vibracije istezanja i C-H vibracije savijanja van ravni, koji su prisutni na spektru suvog ekstrakta hajdučke trave. Tipični karbonilni pik na 1721 cm⁻¹ i drugi pikovi koji odgovaraju polimernoj matrici PCL su očuvani i na spektrima PCL nanovlakana sa suvim ekstraktom hajdučke trave (za dva nanovlaknasta materijala to je prikazano i na slici 5.21.). U odsustvu novih pikova na spektru PCL nanovlakana sa suvim ekstraktom hajdučke trave, zaključili smo da nema novih formiranih hemijskih veza između polimera i suvog ekstrakta hajdučke trave.

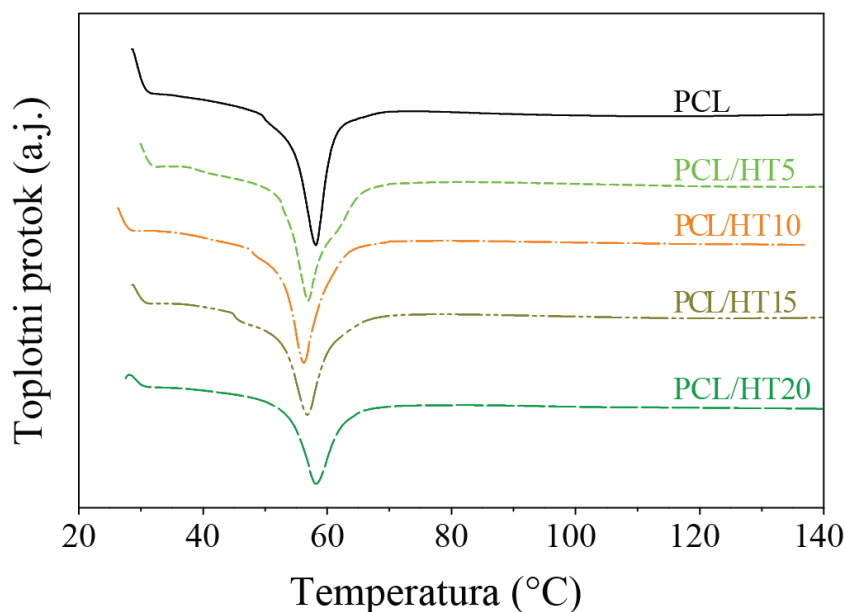
5.3.3. Termička svojstva PCL nanovlakana sa suvim ekstraktom hajdučke trave

Termička svojstva PCL nanovlakanastih matova sa i bez dodatka suvog ekstrakta hajdučke trave su okarakterisana DSC analizom. Određeni su temperatura topljenja (T_m), entalpija topljenja (ΔH_m) i stepen kristaliničnosti (χ_m) (tabela 5.3.). Utvrđeno je da su temperature topljenja (T_m) svih ispitivanih uzoraka u opsegu 56-59 °C, što je u skladu sa literaturnim podacima za temperaturu topljenja PCL (Woodruff i Hutmacher, 2010). Uočen je blagi pad vrednosti T_m sa povećanjem sadržaja suvog ekstrakta hajdučke trave u nanovlaknima sa suvim ekstraktom hajdučke trave u poređenju sa PCL nanovlaknima (slika 5.22., tabela 5.3.). Entalpija topljenja (ΔH_m) i stepen kristaliničnosti (χ_m) elektropredenih PCL nanovlakana sa dodatkom suvog ekstrakta hajdučke trave bili su niži u odnosu na PCL nanovlakna, što ukazuje da je dodatak suvog ekstrakta hajdučke trave smanjio kristaliničnost PCL nanovlakana.

Tabela 5.3. Termička svojstva PCL nanovlaknastih matova bez dodatka (PCL) i sa 5 mas% (PCL/HT5), 10 mas% (PCL/HT10), 15 mas% PCL/HT15) i 20 mas% (PCL/HT20) suvog ekstrakta hajdučke trave

Uzorak	Temperatura topljenja T_m , °C	Entalpija topljenja ΔH_m , J/g	Stepen kristaliničnosti χ_m , %
PCL	58,2	70,3	50,4
PCL/HT5	57,0	70,0	50,1
PCL/HT10	56,3	69,9	50,1
PCL/HT15	56,8	67,3	48,2
PCL/HT20	58,3	52,0	37,2

Slika 5.22. prikazuje DSC termograme za uzorke elektropredenih PCL nanovlakana sa i bez dodatka suvog ekstrakta hajdučke trave.



Slika 5.22. DSC termogram zagrevanja za PCL nanovlaknaste matove dobijene metodom elektropredenja iz rastvora i to za PCL, PCL/HT5 (PCL sa 5 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave), PCL/HT10 (PCL sa 10 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave), PCL/HT15 (PCL sa 15 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave) i PCL/HT20 (PCL sa 20 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave)

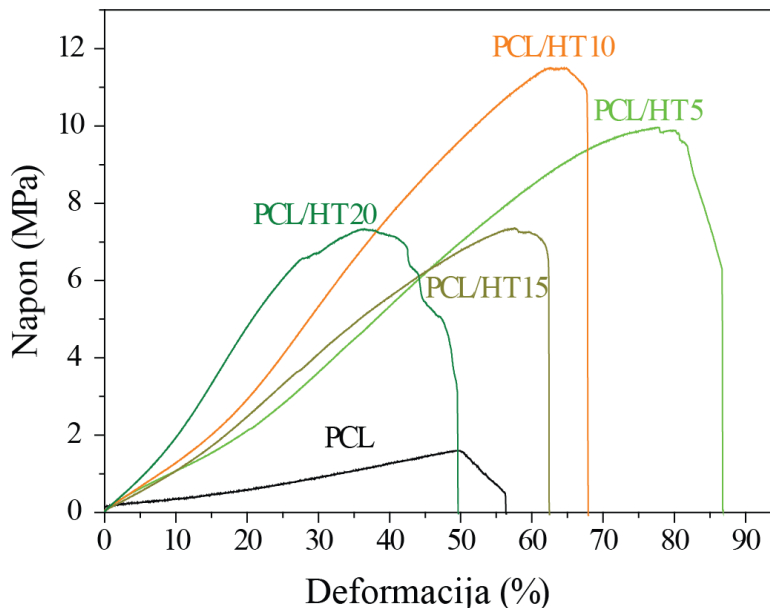
Polukristalni polimeri kao što je PCL sastoje se od tvrdih (kristalnih) i mekih (amornih) faza. Elektropredena PCL nanovlakna sa suvim ekstraktom hajdučke trave varirala su po svojoj strukturi i morfologiji, kao i po stepenu prisustva amorfne faze. Suvi ekstrakt hajdučke trave je u amornom stanju i inkorporiran je, takođe, u amornom stanju, što se može zaključiti odsustvom bilo kakvog endotermnog pika na DSC termogramima u nanovlaknima PCL sa dodatkom ekstrakta hajdučke trave. Dodavanje suvog ekstrakta hajdučke trave u rastvor polimera dovelo je do smanjenja kristaliničnosti polimernih nanovlakana i, posledično, do smanjenja temperature topljenja i entalpije funkcionalizovanih nanovlaknastih matova. Suvi ekstrakt hajdučke trave je delovao kao plastifikator, i verovatno je uticao na redosled između pojedinačnih polimernih lanaca dovodeći do smanjenja

viskoziteta rastvora za elektropredenje. Pored toga, dodatak suvog ekstrakta hajdučke trave povećao je provodljivost rastvora, što je smanjilo prečnik nanovlakana kao što je evidentno u ovoj disertaciji, a što je pokazano za dodatak drugih lekovitih biljaka u PCL nanovlakna (Salevic i dr., 2019). Analizom DSC termograma može se primetiti da je sa povećanjem masenog udela suvog ekstrakta hajdučke trave došlo do sve većeg smanjenja tačke topljenja nanovlaknastih matova, ali ovaj trend je važio samo do koncentracije od 15 mas%. Dodatak 20 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave u PCL nanovlakna je dodatno izazvalo blago povećanje tačke topljenja uzorka u odnosu na ostale nanovlaknaste matove sa dodatkom suvog ekstrakta hajdučke trave (58,3 °C, naspram 57,0 °C, 56,3 °C i 56,8 °C). Stoga je važno naglasiti da se 15 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave može smatrati graničnim sadržajem suvog ekstrakta hajdučke trave u PCL polimernoj matrici za praktične biomedicinske primene, na osnovu analize termičkih svojstava nanovlakana.

5.3.4. Mehanička svojstva PCL nanovlakana sa suvim ekstraktom hajdučke trave

Jedno od osnovnih svojstava bimaterijala različitih namena je da obezbedi adekvatan otpor spoljašnjim silama (mehanički integritet). Isto tako, od velike je važnosti obezbediti dovoljnu elastičnost, koja zavisi od namene biomaterijala i koja treba da omogući da se izbegnu deformiteti usled pokreta tokom aplikacije (Augustine i dr., 2017; Al-Kaabi i dr., 2021). Da bi se okarakterisao uticaj dodatka suvog ekstrakta hajdučke trave na mehanička svojstva PCL nanovlaknastih matova sprovedeno je ispitivanje na zatezanje PCL nanovlaknastih matova sa i bez dodatka suvog ekstrakta hajdučke trave i određena je zatezna čvrstoća, prekidna deformacija i Jungov modul elastičnosti.

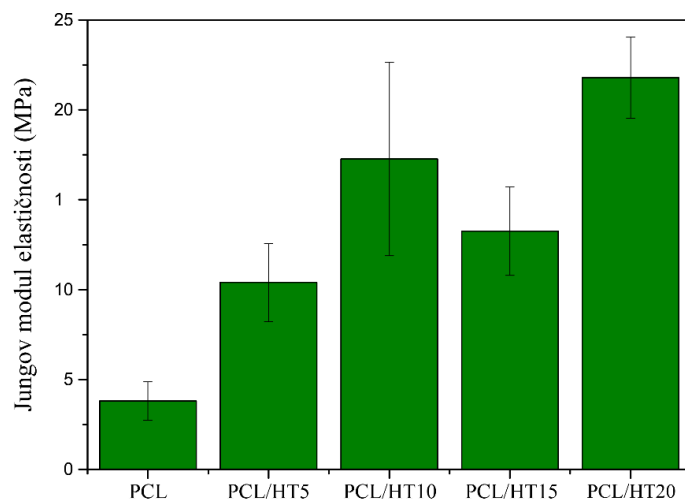
Dobijene krive napon-deformacija pokazuju da su zatezna svojstva PCL nanovlaknastih matova sa dodatkom suvog ekstrakta hajdučke trave veća u odnosu na PCL nanovlakna (slika 5.23.). Isti trend je uočen za zateznu čvrstoću i prekidnu deformaciju i za mat PCL/hidroksiapatitnih nanovlakna u poređenju sa PCL nanovlaknima (Li i dr., 2018).



Slika 5.23. Krive napon-deformacija elektropredenih PCL nanovlaknastih matova dobijenih metodom elektropredenja iz rastvora TFE i to za PCL, PCL/HT5 (PCL sa 5 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave), PCL/HT10 (PCL sa 10 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave), PCL/HT15 (PCL sa 15 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave) i PCL/HT20 (PCL sa 20 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave)

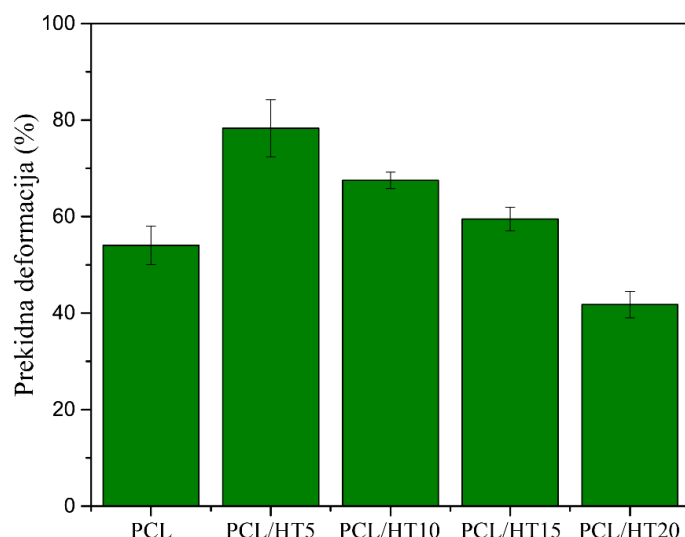
Srednja vrednost Jungovog modula elastičnosti PCL nanovlakana bila je $3,8 \pm 1,1$ MPa, što je uporedivo sa literaturnim podacima za nosače netkanih PCL nanovlaknastih matova sličnog opsega

prečnika nanovlakana (Bolgen i dr., 2005). Vrednost Jungovog modula elastičnosti statistički je značajno povećana u svim nanovlaknastim matovima sa dodatkom suvog ekstrakta hajdučke trave ($p < 0,05$) (slika 5.24.).



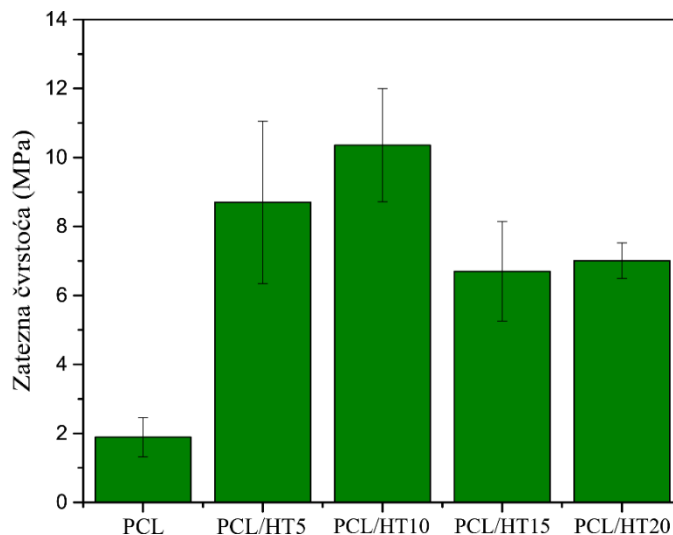
Slika 5.24. Jungov modul elastičnosti PCL nanovlaknastih matova dobijenih metodom elektropredenja iz rastvora TFE i to za PCL, PCL/HT5 (PCL sa 5 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave), PCL/HT10 (PCL sa 10 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave), PCL/HT15 (PCL sa 15 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave) i PCL/HT20 (PCL sa 20 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave)

Dodatak suvog ekstrakta hajdučke trave uticao je na promenu prekidne deformacije, samo pri relativno manjem sadržaju suvog ekstrakta. Ustavnovljeno je statistički značajno povećanje prekidne deformacije u nanovlaknastim matovima sa 5 mas% i 10 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave ($p < 0,05$). Daljim povećanjem udela suvog ekstrakta hajdučke trave nije postignuta statistički značajna razlika u prekidnoj deformaciji, iako se može primetiti da je ona nominalno bila veća za nanovlaknasti mat sa 15 mas% i manja za nanovlaknasti mat sa 20 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave u odnosu na PCL nanovlaknasti mat bez dodataka (slika 5.25.).



Slika 5.25. Prekidna deformacija PCL nanovlaknastih matova dobijenih metodom elektropredenja iz rastvora TFE i to za PCL, PCL/HT5 (PCL sa 5 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave), PCL/HT10 (PCL sa 10 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave), PCL/HT15 (PCL sa 15 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave) i PCL/HT20 (PCL sa 20 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave)

Dodatak suvog ekstrakta hajdučke trave u PCL nanovlakna imao je statistički značajan uticaj na zateznu čvrstoću dobijenih nanovlaknastih matova u svim ispitivanim koncentracijama ($p < 0,01$). I drugi su proučavali uticaj dodatka ekstrakta na zateznu čvrstoću PCL elektropredenih nanovlakana, i pokazano je npr. da je dodatkom ekstrakta *Inula graveolens* kao i suvog ekstrakta hajdučke trave, zatezna čvrstoća PCL nanovlaknastih matova imala veću vrednost (Al-Kaabi i dr., 2021). Zatezna čvrstoća je povećana za uzorke PCL/HT5 i PCL/HT10, a zatim je primećen pad vrednosti zatezne čvrstoće, pri čemu je ona i dalje bila veća u odnosu na PCL nanovlakna bez dodataka (slika 5.26.).



Slika 5.26. Zatezna čvrstoća PCL nanovlaknastih matova dobijenih metodom elektropredenja iz rastvora TFE i to za PCL, PCL/HT5 (PCL sa 5 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave), PCL/HT10 (PCL sa 10 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave), PCL/HT15 (PCL sa 15 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave) i PCL/HT20 (PCL sa 20 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave)

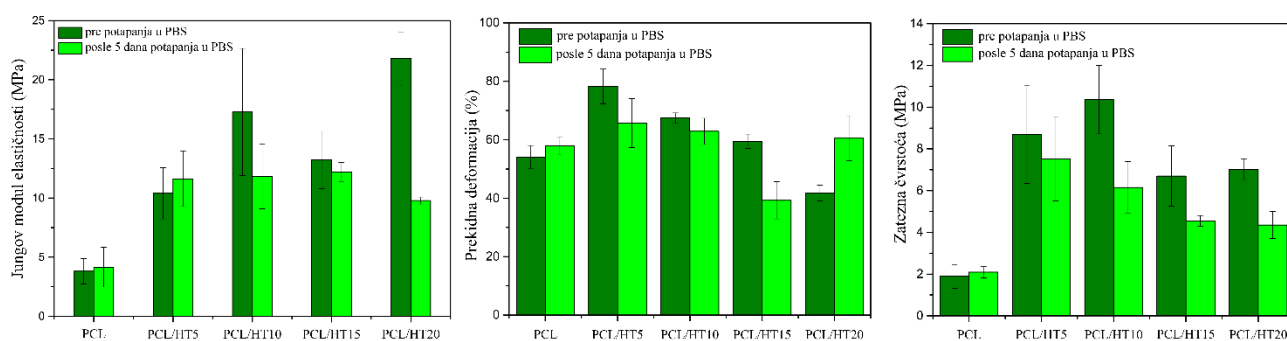
Najniže izmerene vrednosti Jungovog modula elastičnosti, prekidne deformacije i zatezne čvrstoće ($3,8 \pm 1,1$ Mpa, $54,0 \pm 4,0$ % i $1,9 \pm 0,6$ Mpa, redom) su dobijene za PCL nanovlaknaste matove (slike 5.24.-5.26.). Inkorporiranje suvog ekstrakta hajdučke trave u PCL nanovlaknaste matove dovodi do poboljšanja mehaničkih svojstva PCL nanovlaknastih matova. Dodatak suvog ekstrakta hajdučke trave u sadržaju od 5 mas% doveo je do statistički značajnog povećanja je Jungovog modula elastičnosti ($10,4 \pm 2,2$ MPa), prekidne deformacije ($78,3 \pm 5,9$ %) i zatezne čvrstoće ($8,7 \pm 2,3$ MPa). Unapređena mehanička svojstva uočena su i za PCL nanovlaknaste matove sa inkorporiranim suvim ekstraktom hajdučke trave u sadržaju od 10 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave (slika 5.23.). U obe ove koncentracije, dodatak suvog ekstrakta hajdučke trave doprineo je tome da su procesuirani nanovlaknasti matovi bili manje skloni lomu/kidanju i imali veću elastičnost. Daljim povećanjem sadržaja suvog ekstrakta hajdučke trave na 15 mas% i 20 mas%, primećeno je smanjenje vrednosti za prekidnu deformaciju i zateznu čvrstoću u odnosu na karakteristike materijala sa 5 mas% i 10 mas%, što ukazuje na relativno uvećanu krutost materijala i smanjenu čvrstoću. Sa povećanjem sadržaja suvog ekstrakta hajdučke trave više od 10 mas% nije zapaženo dalje unapređenje mehaničkih svojstava, iako su nanovlaknasti matovi sa svim ispitivanim koncentracijama suvog ekstrakta hajdučke trave doveli do poboljšanja u odnosu na PCL nanovlaknasti mat.

Pošto je primećeno da dodatak suvog ekstrakta hajdučke trave dovodi do smanjenja prečnika nanovlakana (slika 5.20.), moglo bi se spekulirati da je zatezna čvrstoća PCL nanovlaknastih matova sa suvim ekstraktom hajdučke trave varirala u zavisnosti od prečnika nanovlakana, pri čemu su vlakna manje vrednosti prečnika imala niže vrednosti čvrstoće. Ovo ponašanje kod vlakana malog prečnika može biti posledica slabijih spojeva međusobno povezanih vlakana ili takođe može biti posledica

defekata u pojedinačnim vlaknima. Slično, smanjenje zatezne čvrstoće sa smanjenjem prečnika vlakana primetili su Han i saradnici za poliuretanski nosač na bazi PCL (Han i dr., 2011).

Pored toga, u nanovlaknima sa najvišim sadržajem suvog ekstrakta hajdučke trave vizuelnom inspekcijom uočena je aglomeracija nerastvorenih čestica ekstrakta hajdučke trave. Takvi aglomerati mogu da deluju kao centri koncentracije napona koji sprečavaju efikasan prenos naprezanja sa polimerne matrice na punioce, i posledično dovode do slabijih mehaničkih svojstava. Na osnovu svih dobijenih rezultata zaključeno je da su najbolja mehanička svojstva posedovali uzorci PCL/HT5 i PCL/HT10 i da dodatak suvog ekstrakta hajdučke trave do 10 mas% dovodi do veće rastegljivosti elektropredenih nanovlakana, omogućavajući proizvodnju nanovlaknastog mata sa poboljšanom zateznom čvrstoćom i većom prekidnom deformacijom.

Ispitana je i promena mehaničkih svojstava nanovlaknastih matova u simuliranim uslovima upotrebe materijala. Naime, određena su mehanička svojstva PCL nanovlaknastih matova nakon petodnevnog potapanja u PBS na 37 °C. Mehanička svojstva, evidentna kroz vrednosti Jungovog modula elastičnosti, prekidne deformacije i zatezne čvrstoće PCL nanovlaknastih matova sa suvim ekstraktom hajdučke trave pokazala su sličan trend kao i za materijale pre potapanja. Sve izmerene vrednosti bile su veće za nanovlaknaste matove sa dodatkom suvog ekstrakta hajdučke trave u poređenju sa PCL nanovlaknastim matom (slika 5.27.).



Slika 5.27. Jungov modul elastičnosti, prekidna deformacija i zatezna čvrstoća PCL nanovlaknastih matova dobijenih metodom elektropredenja iz rastvora TFE i to za PCL, PCL/HT5 (PCL sa 5 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave), PCL/HT10 (PCL sa 10 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave), PCL/HT15 (PCL sa 15 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave) i PCL/HT20 (PCL sa 20 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave) pre i posle potapanja u PBS rastvor

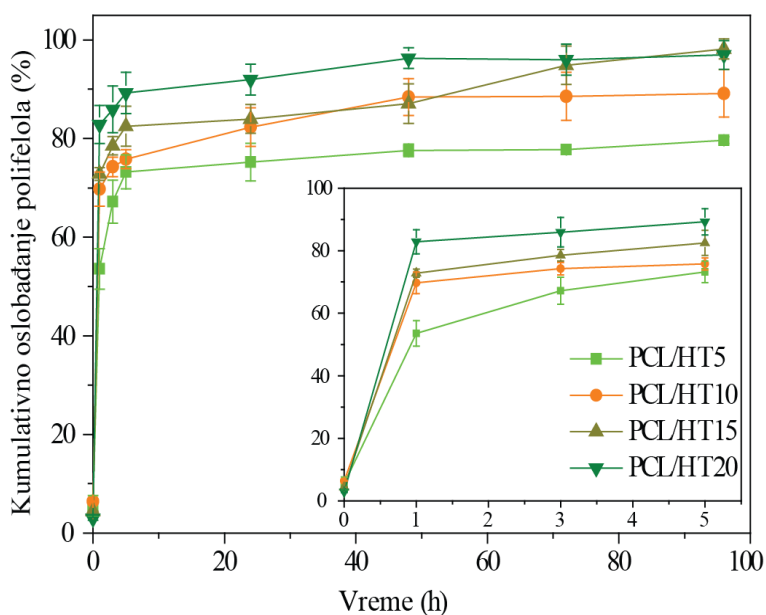
U poređenju sa uzorcima pre potapanja u PBS, vrednost Jungovog modula elastičnosti je pokazala opadajući trend nakon potapanja. Vrednost zatezne čvrstoće svih nanovlaknastih matova je smanjena nakon simulirane upotrebe materijala. Efekat ojačanja materijala do kog je došlo usled dodatka suvog ekstrakta hajdučke trave u PCL nanovlaknaste matove opao je usled potapanja u rastvor PBS, što se može objasniti gubitkom suvog ekstrakta hajdučke trave, koji je oslobođen iz polimerne matrice u ovom periodu. U prethodnoj studiji takođe je primećeno smanjenje vrednosti Jungovog modula i zatezne čvrstoće usled oslobađanja ekstrakta iz PCL-aloe vera vlaknastog mata, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u okviru rada na ovoj disertaciji (Agnes Mari i Giri Dev, 2015).

5.3.5. Kinetika oslobađanja polifenola iz PCL nanovlakana sa suvim ekstraktom hajdučke trave

Kinetika oslobađanja polifenola hajdučke trave iz PCL nanovlaknastih matova sa dodatkom suvog ekstrakta hajdučke trave praćena je tokom pet dana. Nanovlaknasti matovi su bili potopljani u PBS (pH 7,4) na 37 °C, u cilju simulacije fizioloških uslova ljudskog tela. Profili otpuštanja polifenola iz nanovlaknastih matova su pokazali početno naglo otpuštanje i kasnije sporo oslobađanje (slika

5.28.). Početno naglo oslobađanje i kasnije produženo oslobađanje primećeno je u drugim studijama sa ekstraktima lekovitih biljaka inkorporiranim u različita polimerna nanovlakna (Suganya i dr., 2011.; Maver i dr., 2020; Pulicharla i dr., 2016).

Mala količina ukupno inkorporiranih polifenola hajdučke trave je oslobođena neposredno nakon potapanja nanovlaknastih matova u PBS. Ukupno $5,5 \pm 2,1$ %, $6,4 \pm 0,1$ %, $4,4 \pm 0,0$ %, $2,9 \pm 0,3$ % polifenola otpušteno je nakon potapanja iz nanovlaknastih matova PCL/HT5, PCL/HT10, PCL/HT15 i PCL/HT20, redom. U narednih sat vremena zabeležen je značajno veći procenat oslobođenih polifenola i u prvih 24 h, otpušteno je ukupno $75,2 \pm 3,8$ % iz PCL/HT5, $82,3 \pm 3,9$ % iz PCL/HT10, $84 \pm 2,9$ % iz PCL/HT15 i $92 \pm 3,1$ % iz PCL/HT20 od ukupno inkorporiranih polifenola. Kasnije je otpuštanje bilo sporo, a nakon pet dana, $79,7 \pm 0,7$ %, $89,2 \pm 4,8$ %, $98,2 \pm 2,0$ % i $97 \pm 2,9$ % polifenola iz hajdučke trave je otpušteno iz PCL/HT5, PCL/HT10, PCL/HT15 i PCL/HT20, redom.



Slika 5.28. Kumulativno oslobađanje polifenola iz hajdučke trave iz PCL nanovlanknastih matova dobijenih metodom elektropredenja iz rastvora TFE za PCL/HT5 (PCL sa 5 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave), PCL/HT10 (PCL sa 10 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave), PCL/HT15 (PCL sa 15 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave) i PCL/HT20 (PCL sa 20 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave)

Slične rezultate objavili su Namboodiri i Parameswaran, 2013, gde je procenat polifenola iz sirovog ekstrakta *Biophitum sensitivum* (L.) imao isti trend oslobađanja iz PCL vlaknaste membrane pri čemu je u prvih 24 h oslobođeno približno 40 % polifenola, a zatim je usledilo sporije otpuštanje polifenola u narednim satima. Za sve uzorke PCL nanovlaknastih matova sa suvim ekstraktom hajdučke trave uočen je bimodalni profil oslobađanja i kinetika oslobađanja se razlikuje za prvi sat i kasniji period - od 1. do 96. sata praćenja otpuštanja (Karami i dr., 2013). Dovoljna apsorpcija rastvora fosfatnog pufera u nanovlaknima i brza difuzija komponenti hajdučke trave koja se nalazi blizu površine nanovlakana u medijum rezultirala je brzim oslobađanjem polifenola. Pored toga, ovo rapidno oslobađanje polifenola može se pripisati slabim vodoničnim vezama između estarskih karbonilnih grupa PCL i fenolnih hidroksilnih grupa biljnih polifenola (Kim i dr., 2012). Konačno, naglo oslobađanje polifenola može nastati i rastvaranjem eventualno prisutnih aglomerata ekstrakta hajdučke trave, koji su bili vizuelno identifikovani u nanovlaknastim matovima sa visokim sadržajem suvog ekstrakta hajdučke trave. Bimodalni obrazac oslobađanja može imati važnu ulogu u postizanju optimalnog terapijskog odgovora u mnogim tretmanima. Brzo oslobađanje polifenola iz nanovlakana pomaže u postizanju minimalne efektivne koncentracije u početnim satima, nakon čega sledi

produženo oslobađanje koje može biti dovoljno za održavanje adekvatnog terapijskog odgovora tokom dužeg vremenskog perioda (Agarwal i dr., 2021; Xie i dr., 2013).

Rezultati *in vitro* testa oslobađanja polifenola iz PCL nanovlaknastih matova sa dodatkom suvog ekstrakta hajdučke trave su fitovani matematičkim modelima- nultog i prvog reda, Higuči (Higuchi) i Korsmejer-Pepas (Korsmeyer-Peppas) modelima. Higuči model pokazao je najveću vrednost koeficijenta korelacije za sve ispitivane nanovlaknaste matove, što ukazuje da se difuzija polifenola iz nanovlaknastih matova odvija prema Higučijevom modelu. Pojednostavljeno, Higučijev model opisuje oslobađanje lekova iz nerastvorljivih matrica kao kumulativni procenat oslobođenog leka u odnosu na kvadratni koren vremena. Jednačine za Higučijev model bile su:

$$Q_t = 10,76 t^{1/2} (r^2 = 0,78 \text{ za PCL/HT5}) \quad (5.4)$$

$$Q_t = 12,08 t^{1/2} (r^2 = 0,78 \text{ za PCL/HT10}) \quad (5.5)$$

$$Q_t = 12,75 t^{1/2} (r^2 = 0,78 \text{ za PCL/HT15}) \quad (5.6)$$

$$Q_t = 13,31 t^{1/2} (r^2 = 0,75 \text{ za PCL/HT20}) \quad (5.7)$$

pri čemu u navedenim jednačinama Q_t predstavlja količinu polifenola rastvorenog u vremenu t , a K_H konstantu oslobađanja za svaki uzorak PCL/HT5, PCL/HT10, PCL/HT15 i PCL/HT20. Higuči model oslobađanja aktivne supstance pogodan je za primenu za transdermalne flastere sa kontrolisanim oslobađanjem ili za filmove za oralnu kontrolisanu isporuku leka (Paarakh i dr., 2018; Dash i dr., 2010).

Podaci o oslobađanju polifenola iz PCL nanovlaknastih matova sa suvim ekstraktom hajdučke trave su takođe fitovani Korsmejer Pepas (Korsmeyer-Peppas) modelom. U ovom modelu, vrednost n (eksponent otpuštanja) se koristi za karakterizaciju različitog oslobađanja za cilindrične matrice. Vrednost n za PCL/HT5, PCL/HT10, PCL/HT15 i PCL/HT20 bila je 0,07, 0,06, 0,06 i 0,03, redom. Vrednost parametra n ispod 0,45 ukazuje na Pseudo-Fikovu difuziju, što je u skladu sa cilindričnom strukturom ispitivanih nanovlakana (Grkovic i dr.,2017).

5.3.6. Antioksidativna aktivnost PCL nanovlakana sa suvim ekstraktom hajdučke trave

Da bi se ispitalo da li se biološka aktivnost hajdučke trave održala inkorporiranjem suvog ekstrakta hajdučke trave u PCL nanovlaknaste matove, određena je antioksidativna aktivnost dobijenih materijala. Antioksidativna aktivnost merena je kao sposobnost neutralizacije DPPH radikala pufera u koji su bili uronjeni nanovlaknasti matovi. Postojao je trend povećanja antioksidativne aktivnosti sa vremenom interakcije između pufera i nanovlaknastih matova (tabela 5.4.), što je u skladu sa nalazima drugih istraživača (Ahmed i dr., 2018).

Tabela 5.4. Antioksidativna aktivnost PBS pufera u koji su potopljene PCL nanovlaknasti matovi sa dodatkom suvog ekstrakta hajdučke trave u tri vremenska intervala

Vreme inkubacije (h)	Inhibicija DPPH radikala (%)			
	PCL/HT5	PCL/HT10	PCL/HT15	PCL/HT20
0	17,1 ± 2,3	21,9 ± 3,2	61,3 ± 2,9	54,6 ± 4,8
1	48,1 ± 4,1	75,1 ± 3,7	90,4 ± 0,8	91,2 ± 0,9
24	56,7 ± 4,7	76,1 ± 4,1	91,7 ± 1,4	91,9 ± 0,6

Antioksidativna aktivnost je takođe, bila zavisna od doze, tj. koncentracije suvog ekstrakta hajdučke trave u nanovlaknastim matovima. Inhibicija DPPH radikala pufera u kom su bili potopljene

nanovlaknasti matovi tokom 24 h ispitivanja bila je u rasponu od 17,1-56,7 % za PCL/HT5, 21,9-76,1 % za PCL/HT10, 61,3-91,7 % za PCL/HT15 i 54,6-91,9 %, za PCL/HT20. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da je pufer posedovao veću antioksidativnu aktivnost ukoliko su u pufer potopljeni nanovlaknasti matovi sa većim sadržajem suvog ekstrakta hajdučke trave. Sa dužim vremenom inkubacije oslobađala se veća količina polifenola iz hajdučke trave, što je dovelo do povećanja efikasnosti inhibicije DPPH radikala.

Poznato je da su polifenoli jedan od glavnih nosioca antioksidativne aktivnosti biljnog materijala (Ju i dr., 2016, Lim i dr., 2019). U prethodnoj studiji pokazano je da je sposobnost neutralizacije DPPH radikala tečnih ekstrakata hajdučke trave direktno proporcionalna ukupnom sadržaju polifenola (Milutinovic i dr., 2015). U okviru rada na ovoj disertaciji uočen je trend korelacije između ukupnog sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti ($p < 0,1$). Korelacija između ukupnog sadržaja polifenola i antioksidativnog kapaciteta za testirane materijale izračunata je kao Pirsonov koeficijent korelacije (Schober i dr., 2018). Poređenjem antioksidativne aktivnosti ekstrakta hajdučke trave (Milutinovic i dr., 2015) i aktivnosti polifenola oslobođenih iz ispitivanih materijala (PCL/HT5, PCL/HT10, PCL/HT15 i PCL/HT20) dolazi se do zaključka da je ova aktivnost u potpunosti sačuvana u svim ispitivanim nanovlaknastim matovima.

5.3.7. Antibakterijska aktivnost PCL nanovlaknata sa suvim ekstraktom hajdučke trave

Antibakterijski efekat PCL elektropredenih nanovlaknastih matova sa dodatkom suvog ekstrakta hajdučke trave ispitan je prema dve bakterije, predstavnika Gram pozitivnih (*S. aureus*) i Gram negativnih (*P. aeruginosa*) bakterija. Odabrane vrste su uobičajeni patogeni prisutni kod hospitalizovanih pacijenata i često su povezani sa urinarnim infekcijama (Wasserman i Taljaard, 2011; Rayner i Munckhof, 2005; Lamas Ferreira i dr., 2017). Rezultati su pokazali da je antibakterijska aktivnost PCL nanovlaknastih matova sa suvim ekstraktom hajdučke trave na *S. aureus* očuvana tokom procesa elektropredenja i rast ove bakterije je inhibiran u eksperimentima interakcije sa ispitivanim nanovlaknastim matovima. Stepenu redukcije rasta *S. aureus* bio je 69,1 %, 85,7 % i 92,9 % za uzorke PCL/HT10, PCL/HT15 i PCL/HT20, redom. Trend povećanja antibakterijske aktivnosti sugerise da se i ova biološka aktivnost menja na doznom zavisnom načinu, tj. da je najveća za materijal sa najvećim sadržajem suvog ekstrakta. Uočeno je da se sa povećanjem sadržaja suvog ekstrakta hajdučke trave u nanovlaknima povećava njegova antioksidativna i antibakterijska aktivnost. Treba napomenuti da uzorak PCL/HT5 nije imao uticaja na rast bakterija, zbog nedovoljnog sadržaja suvog ekstrakta hajdučke trave potrebnog za inhibiciju rasta bakterija. Svi ispitivani uzorci nisu pokazali efekat na rast *P. aeruginosa*.

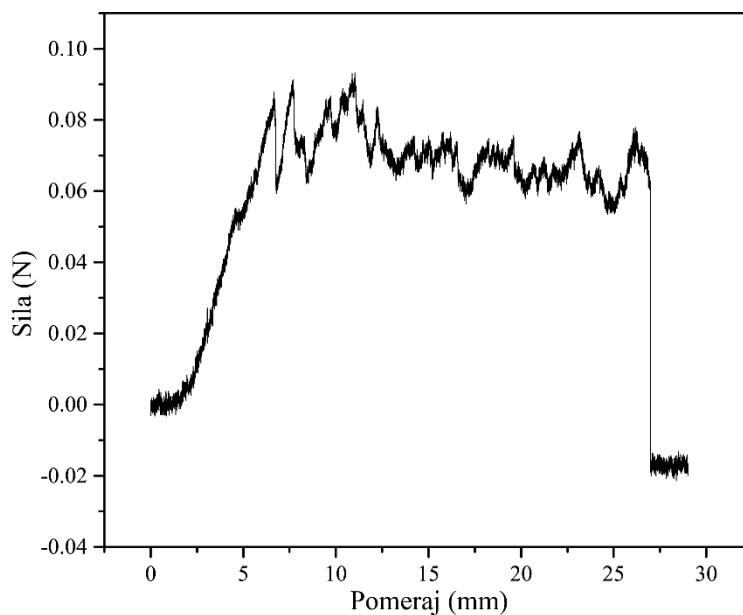
Antibakterijska aktivnost ispitivanih PCL nanovlaknastih matova sa suvim ekstraktom hajdučke trave rezultat je kombinovanog dejstva jedinjenja hajdučke trave, uglavnom polifenola (Sowa i dr., 2020; Milutinovic i dr., 2021). Utvrđeno je da ekstrakti hajdučke trave pokazuju antibakterijsku aktivnost na Gram-pozitivne bakterijske vrste, dok su rezultati ispitivanja na Gram-negativne vrste manje očigledni, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji (Frey i Meyers, 2010; Tajik i dr., 2008). Polifenoli prisutni u hajdučkoj travi razaraju membranu bakterija, što je pretpostavljeni mehanizam kojim je ostvarena antibakterijska aktivnost ispitivanih uzoraka. Ispitivana Gram-pozitivna bakterija *S. aureus* je bila osetljiva za razliku od ispitivane Gram-negativne vrste. Ovakav rezultat nije iznenađujući s obzirom da je poznato da Gram-negativne bakterije pokazuju veći stepen otpornosti na antibakterijska jedinjenja poput onih prisutnih u ekstraktu hajdučke trave (Li i dr., 2019; Tajik i dr., 2008). Gram-pozitivne bakterije imaju debeli spoljašnji sloj peptidoglikana koji nije otporan na aktivnost polifenola (Nostro i dr., 2000). Rezultati pokazuju da PCL nanovlaknasti matovi sa dodatkom suvog ekstrakta hajdučke trave poseduju antibakterijsku aktivnost prema *S. aureus* i mogu se koristiti u materijalima koji mogu da spreče bakterijske infekcije.

5.4. Evaluacija primenljivosti PCL nanovlaknastih matova sa dodatkom cefazolina ili suvog ekstrakta hajdučke trave za oblaganje komercijalnih urinarnih katetera

U okviru ove disertacije razvijeno je više multifunkcionalnih biomaterijala čija bi svojstva mogla da omoguće sprečavanje infekcija izazvanih urinarnom kateterizacijom, pa je ispitana mogućnost oblaganja komercijalnih katetera razvijenim materijalima. Za ova ispitivanja odabran je jedan PCL nanovlaknasti mat sa cefazolinom i jedan nanovlaknasti mat sa suvim ekstraktom hajdučke trave. Metodom elektropredenja iz rastvora, procesirana su nanovlakna na bazi PCL rastvorenog u TFE sa inkorporiranih 20 mas% cefazolina i sa inkorporiranih 10 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave. Ispitana je adhezija između novorazvijenih PCL nanovlaknastih matova i komercijalnih katetera uz evaluaciju antibakterijske aktivnosti dobijenih obloženih katetera. Kao adheziv korišćen je n-butil-2-cijanoakrilat, hemijske formule $C_8H_{11}NO_2$, koji se kao adheziv u tkivnom inženjerstvu koristi već duže vreme (Amiel i dr., 1999).

5.4.1. Adhezija između novorazvijenih PCL nanovlaknastih matova i komercijalnih katetera

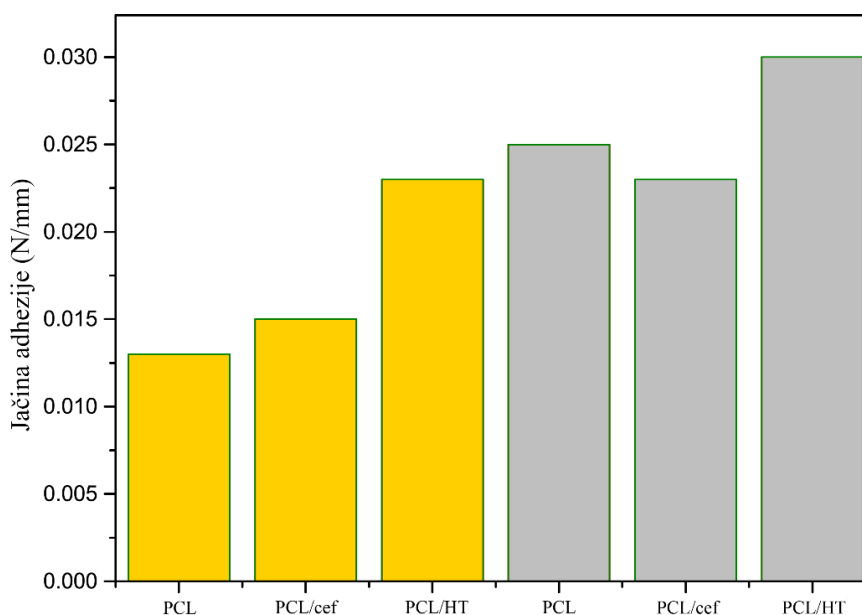
Za procenu stepena adhezije između dva materijala primenjuje se „peel“ test, koji se zatim koristi za određivanje efikasnosti adheziva pri spajanju određenih vrsta materijala. Na slici 5.29. prikazan je karakterističan dijagram sila-pomeraj, dobijen nakon „peel“ testa PCL nanovlaknastog mata obloženog na gumenu kateter, kao primer. Početni deo krive odgovara inicijalnom ispravljaju nanovlakana do uspostavljanja ugla od 180° , nakon čega se rezultati „peel“ testa smatraju validnim. Za proračun maksimalne sile koju je potrebno primeniti da bi došlo do odvajanja, uzeta je srednja vrednost u intervalu trajanja testa. Nagli pad sile na krivoj, ukazuje da je došlo do odvajanja fleksibilnog nanovlaknastog mata sa krute podloge, odnosno ispitivanog katetera.



Slika 5.29. Dijagram sila-pomeraj za ispitivanje adhezije između gumenog katetera i PCL nanovlaknastog mata obloženog pomoću adheziva n-butil-2-cijanoakrilata

Jačina adhezije predstavlja meru spajanja dva ili više materijala koji su međusobno povezani i prikazana je kao odnos srednje sile odvajanja i širine linije vezivanja uzorka. Što je veća vrednost jačine adhezije veća je adhezija između materijala. Na osnovu vrednosti jačine adhezije, možemo zaključiti da je u svim ispitivanim uzorcima postignuta adhezija između katetera i ispitivanih nanovlakana (slika 5.30.). Izraženija adhezija uspostavljena je između nanovlaknastih matova i silikonskog katetera u odnosu na adheziju između nanovlaknastih matova i gumenog katetera, koja nije bila statistički značajna ($p = 0,07$). Važno je napomenuti da dodatak aktivne supstance nije

nepovoljno uticao na adheziona svojsva sa kateterom. Naprotiv, jačina adhezije je povećana za nanovlaknaste matove sa suvim ekstraktom hajdučke trave.



Slika 5.30. Histogram jačine adhezije PCL nanovlaknastih matova bez dodatka (PCL) i sa dodatkom 20 mas% cefazolina (PCL/cef) i sa dodatkom 10 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave (PCL/HT) na gumni kateter (žuto obojeni barovi) i silikonski kateter (sivo obojeni barovi)

Novorazvijeni sistemi u kojima je nanovlaknasti mat nanesen na kateter predstavljaju novi sistem koji do sada nije opisan. U prethodnim studijama, ispitana je npr. adhezija T-testom između PCL nano i mikro vlakana, nakon spajanja termičkom obradom dva nanovlaknasta mata i dva mikrovlaknasta mata. Za nanovlaknasti mat prečnika nanovlakana od oko 500 nm dobijena je jačina adhezije oko 0,0095 N/mm, dok je za vlakna većih dimenzija prečnika od oko 3,7 μm dobijena jačina adhezije od približno 0,065 N/mm. Ovaj rezultat sugerise da je prečnik vlakana imao veliki uticaj na adheziju, verovatno zbog povećane površine kontakta između vlakana (Bouchet i dr., 2021). Adhezija dvoslojnih membrana dobijenih procesom elektropredenja najlon 6/najlon 6, poliakrilonitril/poliakrilonitril i poliviniliden fluorid/poliviniliden fluorid ispitana je „peel“ testom pod uglom od 180°. Rezultati „peel“ testa pokazuju jačinu adhezije u opsegu od 0,002 N/mm do 0,012 N/mm. Niža jačina adhezije je primećena kod polimera koji brzo očvršćavaju, kao što je najlon 6, tokom procesa elektropredenja materijala „sloj na sloj“ što dovodi do lošeg prijanjanja između slojeva (Affandi i dr., 2019).

U okviru ove disertacije ispitana je adhezija nanovlaknastog mata na kateter adhezivom n-butil-2-cijanoakrilatom. Tokom „peel“ testa primećeno je da je do odvajanja nanovlaknastog mata sa katetera došlo „raslojavanjem“ nanovlaknastog mata, tako da ne dolazi do suštinskog odvajanja nanovlaknastog mata od katetera. Dobijene vrednosti jačine adhezije nakon ispitivanja adhezije „peel“ testom pod uglom od 180° su u opsegu od 0,013 N/mm do 0,030 N/mm. Na osnovu dostupnog literaturnog pregleda vrednosti jačine adhezije dobijenih nakon „peel“ testa nanovlaknastih matova, može se zaključiti da su u ovoj disertaciji dobijene veće vrednosti jačine adhezije u odnosu na predstavljene literaturne (Bouchet i dr., 2021; Affandi i dr., 2019).

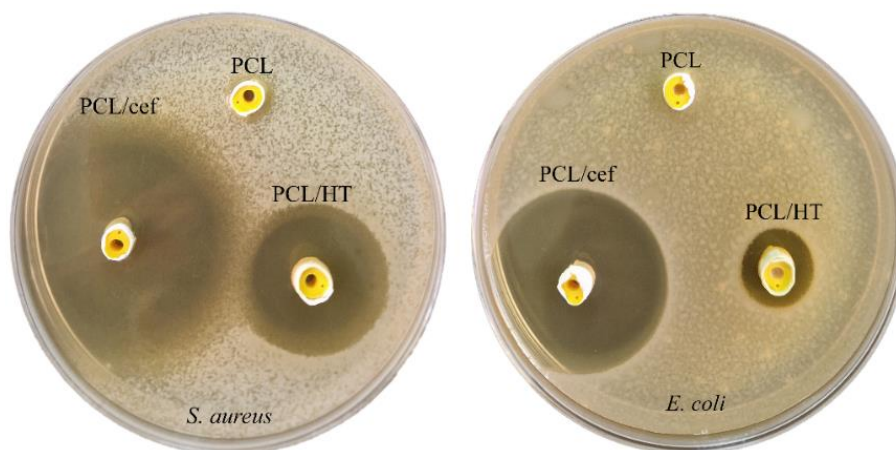
5.4.2. Antibakterijska aktivnost katetera obloženih novorazvijenim PCL nanovlaknastim matovima

Simuliranjem infekcije u laboratorijskim uslovima, ispitano je očuvanje antibakterijske aktivnosti nanovlaknastih matova nakon njihove adhezije na komercijalne katetere. Ovim

eksperimentom je izvršena evaluacija mogućnosti oblaganja polimernih inertnih materijala za dobijanje funkcionalizovanih urinarnih katetera koji mogu da spreče infekcije izazvane urinarnom kateterizacijom.

Eksperiment je izveden uranjanjem obloženog katetera u mikrobiološku podlogu zasejanu predstavnicima Gram-pozitivnih i Gram-negativnih patogenih bakterija. Nakon inkubacije, prečnik zone inhibicije je korišćen kao mera *in vitro* antibakterijskih svojstava gumenih i silikonskih urinarnih katetera obloženih PCL nanovlaknastim matovima bez dodatka i sa 20 mas% cefazolina ili 10 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave. Zona inhibicije posmatrana je kao jasna kružna površina oko uzoraka. PCL nanovlaknasti matovi bez dodatog antibakterijskog agensa su korišćeni kao kontrole i rezultat je pokazao da ne dolazi do inhibicije rasta bakterija oko kontrolnih uzoraka (slike 5.31. i 5.32.). Gumeni i silikonski urinarni kateteri na koje su naneti PCL nanovlaknasti matovi sa cefazolinom i suvim ekstraktom hajdučke trave za obe bakterije, pokazali su antibakterijsku aktivnost (slike 5.31. i 5.32.). Zone inhibicije dokazale su da su cefazolin i suvi ekstrakt hajdučke trave u nanovlaknima ostali u aktivnom obliku, u dovoljnoj koncentraciji da inhibiraju rast patogenih mikroorganizma. Ovo sugeriše da je inkorporiranje ovih antibakterijskih agensa u polimerna nanovlakna bilo uspešno i zadržano nakon njihove adhezije na katetere. Kateteri obloženi PCL nanovlaknastim matovima sa cefazolinom, pokazali su veće zone inhibicije za sve uzorke na obe bakterije. Ovo je očekivan rezultat imajući u vidu da je u nanovlaknastim matovima sa suvim ekstraktom hajdučke trave dodatak biološki aktivne supstance manji u odnosu na nanovlaknasti mat sa cefazolinom (10 mas% u odnosu na 20 mas%). Takođe, samo neke komponente ekstrakta hajdučke trave poseduju antibakterijsku aktivnost jer je u pitanju smeša biološki aktivnih komponenti. Značajno je da se primenom katetera obloženih nanovlaknastim matovima sa ekstraktom hajdučke trave mogu očekivati i druga povoljna dejstva. Naime, hajdučka trava može da pospeši zarastanje malih rana koje mogu da se formiraju u procesu kateterizacije (European medicines agency, 2020). Antioksidativna aktivnost ekstrakta hajdučke trave koja je dokazano očuvana nakon inkorporacije u PCL nanovlaknaste matove može povoljno da utiče na sluzokožu na mestu interakcije, jer smanjuje oksidativni stres ćelija.

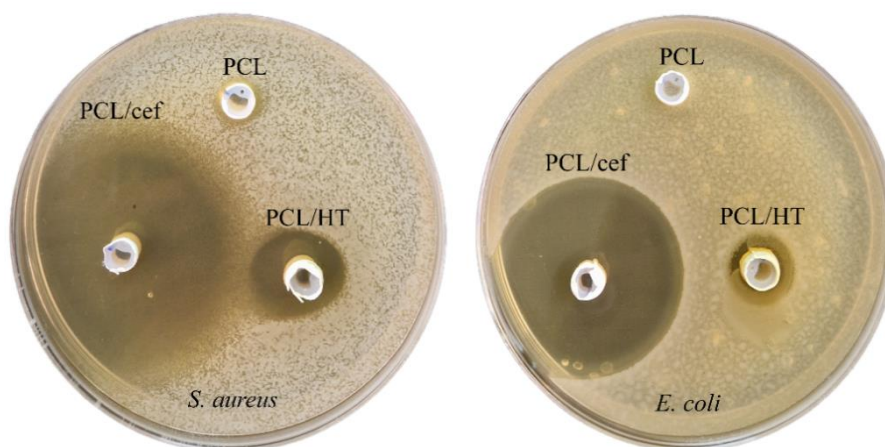
Zona inhibicije rasta bakterija oko uzorka gumenog katetera sa prevlakom PCL nanovlaknastog mata sa cefazolinom bila je $4,7 \pm 0,3$ cm u prečniku za *S. aureus* i $3,7 \pm 0,1$ cm za *E. coli* (slika 5.31.), dok su zone inhibicije sa prevlakom PCL nanovlaknastog mata sa ekstraktom hajdučke trave iznosile $2,1 \pm 0,1$ cm u prečniku za *S. aureus* i $1,6 \pm 0,05$ cm za *E. coli* (slika 5.31.).



Slika 5.31. Mikrobiološke ploče ispitivanja uticaja prevlaka PCL nanovlaknastog mata sa cefazolinom i PCL nanovlaknastog mata sa ekstraktom hajdučke trave na rast patogene Gram-pozitivne bakterije *S. aureus* i Gram-negativne bakterije *E. coli*

Zona inhibicije oko uzorka silikonskog katetera sa prevlakom PCL nanovlaknastog mata sa cefazolinom bila je približno ista kao i u slučaju uzorka gumenog katetera i iznosila je $4,8 \pm 0,3$ cm u prečniku za *S. aureus* i $4,0 \pm 0,1$ cm za *E. coli* (slika 5.32.). Slično kao i kod uzorka gumenog

katetera, zona inhibicije sa prevlakom PCL nanovlaknastog mata sa ekstraktom hajdučke trave iznosila je $1,8 \pm 0,2$ cm u prečniku za *S. aureus* i $1,8 \pm 0,08$ cm za *E. coli* (slika 5.32.). Na osnovu ovoga je zaključeno da priroda katetera nije uticala na biološku aktivnost jer ova, očekivano, zavisi samo od vrste nanovlaknastog mata kojim je inertni kateter obložen.



Slika 5.32. Mikrobiološke ploče ispitivanja uticaja prevlaka PCL nanovlaknastog mata sa cefazolinom i PCL nanovlaknastog mata sa ekstraktom hajdučke trave na silikonskom kateteru na rast patogene Gram-pozitivne bakterije *S. aureus* i Gram-negativne bakterije *E. coli*

Kao što je ranije diskutovano, utvrđen je jak antibakterijski efekat cefazolina na Gram-pozitivne bakterije, čiji je predstavnik *S. aureus*, pa ne čudi što je prečnik inhibicije prema ovoj bakteriji bio izraženiji u odnosu na Gram-negativnu *E. coli*, koja je manje osetljiva na dejstvo cefazolina (Munir i dr., 2019). Sa druge strane, utvrđeno je da ekstrakti hajdučke trave pokazuju antibakterijsku aktivnost na Gram-pozitivne bakterijske vrste, dok su rezultati ispitivanja na Gram-negativne vrste manje očigledni, što je u skladu sa nalazima dobijenim u ovoj disertaciji za procesirane PCL nanovlaknaste matove sa suvim ekstraktom hajdučke trave, čija je antibakterijska aktivnost ispitana metodom razblaženja. U ovom testu nije evidentirana inhibicija *E. coli* što je u skladu sa rezultatima koje su dobili i drugi istraživači ispitujući efekat hajdučke trave prema ovom patogenu (Frey i Meyers, 2010). Međutim, simuliranjem infekcije u laboratorijskim uslovima i primenom metode zone inhibicije za evaluaciju antibakterijske aktivnosti obloženih katetera sa PCL nanovlaknastim matom sa suvim ekstraktom hajdučke trave zabeležena je inhibicija rasta *E. coli*. Ovaj pozitivan rezultat sugerise da je primenjeni sistem adekvatan ciljanoj nameni, čime se potvrđuje da su procesirane obloge na bazi PCL sa cefazolinom ili suvim ekstraktom hajdučke trave zadržale svoja biološka svojstva prilikom aplikacije na komercijalno dostupnim kateterima i tako mogu sprečavati infekcije izazvane kateterizacijom urinarnog trakta. Postoje sistemi oblaganja urinarnih katetera različitim prevlakama, modifikacijama površine uglavnom nanočestica srebra ili antibiotika ili antimikrobnih peptida imobilizovanih na površini katetera, sa antibakterijskim dejstvom na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, ali sistem kakav je razvijen u ovoj doktorskoj disertaciji do sada nije publikovan u literaturi. Imajući u vidu izuzetnu efikasnost i adhezije i očuvanu biološku aktivnost, rezultati dobijeni u ovoj disertaciji mogli bi se koristiti za razvoj novih funkcionalizovanih katetera sa efikasnim antibakterijskim efektom i potencijalnim efektom na zarastanje malih rana.

6. ZAKLJUČAK

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije predstavlja procesiranje nanovlakana iz polimernog rastvora metodom elektrospredjenja. Cilj istraživanja bio je razvoj multifunkcionalnih biomaterijala kao nosača lekova pogodnih za oblaganje urinarnih katetera.

PCL nanovlaknasti matovi sa cefazolinom su procesirani korišćenjem tri metode: elektrospredjenja iz rastvora, emulzionog i koaksijalnog elektrospredjenja. Dobijena nanovlakna su imala ujednačenu strukturu, dok je inkorporiranje cefazolina izazvalo formiranje nanovlakana manjeg prečnika u odnosu na PCL nanovlakna. Cefazolin nije reagovao sa PCL, niti se razgradio tokom procesa elektrospredjenja. Dodatak leka je smanjio kristaliničnost PCL nanovlakana i temperaturu topljenja polimera. Naglo oslobađanje leka je primećeno iz nanovlakana procesiranih elektrospredjenjem iz rastvora (S1) i koaksijalnim elektrospredjenjem (S3), dok je nanovlaknasti mat S2 (emulziono elektrospredjenje) pokazao značajno sporiji profil oslobađanja. Oslobađanje leka iz PCL nanovlakana dostiglo je skoro 68 %, 5 % i 43 % iz S1, S2 i S3, redom, tokom perioda od 30 dana. Difuzija cefazolina iz svih sistema sledila je Higučijev model i Pseudo-Fikovu difuziju leka. U nanovlaknastim matovima očuvana je antibakterijska aktivnost cefazolina pa su materijali inhibirali rast ispitivanih predstavnika i Gram-pozitivnih (*S. aureus*) i Gram-negativnih bakterija (*E. coli*). Rezultati *in vitro* oslobađanja leka i antibakterijskih eksperimenata sugerišu da su PCL nanovlakna sa cefazolinom pogodna za efikasnu dostavu leka na kontrolisan način i inhibiciju rasta bakterija. Imajući u vidu svojstva proizvedenih materijala, nanovlaknasti matovi sa cefazolinom- sistemi S1 i S3 pogodni su za relativno brzo otpuštanje leka, dok dobijeni nanovlaknasti mat u sistemu S2 vrlo sporo otpušta cefazolin i mogao bi se koristiti za dugotrajno otpuštanje leka.

U cilju dobijanja PCL nanovlakana sa širom biološkom aktivnošću, ispitana je mogućnost inkorporacije ekstrakta hajdučke trave u PCL nanovlakna. Otimizovani su uslovi sušenja raspršivanjem tečnog ekstrakta hajdučke trave pomoću metode planiranog eksperimenta, da bi se omogućilo inkorporiranje adekvatne količine ekstrakta u polimerna nanovlakna. Metoda odzivnih površina je uspešno primenjena za modelovanje uticaja temperature, brzine protoka tečnog ekstrakta hajdučke trave i sadržaja suve materije u tečnom ekstraktu hajdučke trave na prinos, ukupni sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost suvog ekstrakta hajdučke trave. Optimalni uslovi sušenja za dobijanje maksimalnog prinosa i maksimalne antioksidativne aktivnosti osušenog ekstrakta hajdučke trave bili su sledeći: temperatura od 130 °C, brzina protoka tečnog ekstrakta od 7,5 ml/min i sadržaj suve materije u tečnom ekstraktu od 1,2 %. Pri optimalnim uslovima sušenja prinos je bio 66 %, ukupni sadržaj polifenola 145 mg ekvivalenta galne kiseline [GAE] po g ukupne suve materije i antioksidativna aktivnost 58 %. Osušeni ekstrakt hajdučke trave zadržao je antibakterijsku aktivnost na predstavnika Gram-pozitivnih bakterija *S. aureus* i predstavnika Gram-negativnih bakterija *P. aeruginosa*.

Različiti sadržaji suvog ekstrakta hajdučke trave dobijeni pri optimalnim uslovima sušenja (5 mas%, 10 mas%, 15 mas% i 20 mas%) uspešno su inkorporirani u PCL nanovlaknaste matove metodom elektrospredjenja iz rastvora. Povećanjem sadržaja ekstrakta hajdučke trave smanjio se prečnik nanovlakana u poređenju sa PCL nanovlaknima. Komponente ekstrakta hajdučke trave nisu reagovale sa PCL, niti su se njene komponente razgradile tokom procesa elektrospredjenja. Suvi ekstrakt hajdučke trave delovao je kao plastifikator, a povećanje njegovog sadržaja smanjilo je kristaliničnost PCL nanovlakana. Dodatkom ekstrakta hajdučke trave u PCL nanovlakna poboljšana su mehanička svojstva PCL nanovlakana što je evidentno kroz povećanje Jungovog modula elastičnosti (do 5,7 puta), zatezne čvrstoće (do 5,5 puta) i prekidne deformacije (do 1,45 puta). Profili oslobađanja polifenola hajdučke trave iz nanovlaknastih matova pokazali su početno brzo i kasnije sporo oslobađanje. Tokom pet dana skoro $79,7 \pm 0,7$ %, $89,2 \pm 4,8$ %, $98,2 \pm 2,0$ % i $97 \pm 2,9$ % polifenola je otpušteno iz PCL/HT5, PCL/HT10, PCL/HT15 i PCL/HT20, redom, pri čemu je bimodalno oslobađanje polifenola sledilo Higučijev model. Antioksidativna aktivnost svih uzoraka povećavala se sa sadržajem ekstrakta u nanovlaknima. Rezultati antibakterijskih eksperimenata pokazali su da su PCL nanovlaknasti matovi sa ekstraktom hajdučke trave inhibirali rast *S. aureus* ako

je sadržaj ekstrakta hajdučke trave 10 mas% i više. Od ispitivanih materijala najbolju biološku aktivnost pokazao je uzorak sa 20 mas% ekstrakta hajdučke trave, ali su vrednosti parametara mehaničkih svojstava ovog materijala pokazale niže vrednosti (narušeni mehanički integritet). S druge strane, 5 mas% ekstrakta hajdučke trave u materijalu bilo je nedovoljno za postizanje relevantne biološke aktivnosti, pa je zaključeno da PCL nanovlaknasti mat sa 10 mas% suvog ekstrakta hajdučke trave postiže željenu biološku aktivnost i mehanička svojstva.

Ispitana je adhezija između novorazvijenih PCL nanovlaknastih matova sa inkorporiranih 20 mas% cefazolina i sa inkorporiranih 10 mas% ekstrakta hajdučke trave i komercijalnih gumenih i silikonskih urinarnih katetera uz evaluaciju jačine adhezije i antibakterijske aktivnosti. Komercijalni gumeni i silikonski urinarni kateteri obloženi PCL nanovlaknastim matovima korišćenjem adheziva n-butil-2-cijanoakrilat pokazali su dobru mehaničku stabilnost, što je evidentno kroz vrednosti jačine adhezije koja je u opsegu 0,015-0,030 N/mm. Obloženi kateteri pokazali su antibakterijsku aktivnost prema *S. aureus* i *E. coli*. Zone inhibicije ukazale su da je inkorporiranje ovih biološki aktivnih agensa u polimerna nanovlakna bilo uspešno i da je relevantna biološka aktivnost zadržana i nakon adhezije nanovlaknastih matova na katetere.

Na osnovu analize svih dobijenih rezultata u ovoj doktorskoj disertaciji, zaključeno je da bi se nanovlaknasti nosači na bazi PCL sa kontinualnim oslobađanjem cefazolina mogli primeniti kao obloge za urinarne katetere sa izrazitom antibakterijskom aktivnošću, dok bi se nosači na bazi PCL sa ekstraktom hajdučke trave sa kontinualnim oslobađanjem polifenola mogli koristiti kao bezbedan i efikasan izvor prirodnih antioksidanasa i antibakterijskih agensa i samim tim kao novi materijal za oblaganje urinarnih katetera.

7. LITERATURA

1. Abdullah M.F., Nuge T., Andriyana A., Ang B.C., Muhamad F., Core-Shell Fibers: Design, Roles, and Controllable Release Strategies in Tissue Engineering and Drug Delivery, *Polymers* 11 (12), 2008., 2019. doi:10.3390/polym11122008
2. Adepu S., Ramakrishna S., Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions, *Molecules* 26, 5905., 2021. doi:10.3390/molecules26195905
3. Adepu S., Gaydhane M.K., Kakunuri M., Sharma C.S., Khandelwal M., Eichhorn S.J., Effect of micropatterning induced surface hydrophobicity on drug release from electrospun cellulose acetate nanofibers, *Applied Surface Science* 426, 755-762., 2017. doi:10.1016/j.apsusc.2017.07.197
4. Affandi N.D.N., Fadil F., Misnon M.I., Preliminary study on the adhesion strength of electrospun bi-layer membranes by 180° peel test, *Fibers and Polymers* 20 (6), 1317-1322., 2019. doi:10.1007/s12221-019-8874-3
5. Agarwal Y., Rajinikanth P.S., Ranjan S., Tiwari U., Balasubramnaian J., Pandey P., Arya D.K., Anand S., Deepak P., Curcumin loaded polycaprolactone-/polyvinyl alcohol-silk fibroin based electrospun nanofibrous mat for rapid healing of diabetic wound: An *in-vitro* and *in-vivo* studies, *International Journal of Biological Macromolecules* 176, 376-386., 2021. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.02.02
6. Agnes Mary S., Giri Dev V.R., Electrospun herbal nanofibrous wound dressings for skin tissue engineering, *Journal Of The Textile Institute* 106 (8), 886-895., 2015. doi: 10.1080/00405000.2014.951247
7. Ahmed R., Tariq M., Ali I., Asghar R., Khanam P.N., Augustine R., Hasan A., Novel electrospun chitosan/polyvinyl alcohol/zinc oxide nanofibrous mats with antibacterial and antioxidant properties for diabetic wound healing, *International Journal of Biological Macromolecules* 120, 385-393., 2018. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.057
8. Akkol E.K., Koca U., Pesin I., Yilmazer D., Evaluation of the wound healing potential of *Achillea biebersteinii* Afan. (*Asteraceae*) by *in vivo* excision and incision models, Evidence-Based, *Complementary and Alternative Medicine* 2011, 1-7., 2011. doi:10.1093/ecam/nep039
9. Al Rez M.F., Elnakady Y.A., Fouad H., Khalil K.A., Albarrag A.M., Elsarnagawy T., Mahmood A., Ansari S.G., Fabrication and characterization of polycaprolactone micro and nanofibers for vascular tissue replacement, *Science of Advanced Materials* 7, 599-605., 2015. doi:10.1166/sam.2015.2255
10. Al-Baadani M. A., Hii Ru Yie K., Al-Bishari A. M., Alshobi B. A., Zhou Z., Fang K., Dai B., Shen Y., Ma J., Liu J., Shen X., Co-electrospinning polycaprolactone/gelatin membrane as a tunable drug delivery system for bone tissue regeneration, *Materials & Design* 209, 109962., 2021. doi:10.1016/j.matdes.2021.109962
11. Al-Kaabi W.J., Albukhaty S., Al-Fartosy A.J.M., Al-Karagoly H.Kh, Al-Musawi S., Sulaiman G.M., Dewir Y.H., Alwahibi M.S., Soliman D.A., Development of *Inula graveolens* (L.) plant extract electrospun/polycaprolactone nanofibers: A novel material for biomedical application, *Applied Sciences* 11, 828., 2021. doi:10.3390/app11020828
12. Alqahtani M.S., Al-Yousef H.M., Alqahtani A.S., Rehman Md T., AlAjmi M.F., Almarfidi O., Amina M., Alshememry A., Syed R., Preparation, characterization, and *in vitro-in silico* biological activities of *Jatropha pelargonifolia* extract loaded chitosan nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutic* 606, 120867., 2021. doi:10.1016/j.ijpharm.2021.120867
13. Amaro M.I., Tajber L., Corrigan O.I., Healy A.M., Optimisation of spray drying process conditions for sugar nanoporousmicroparticles (NPMPs) intended for inhalation, *International Journal of Pharmaceutic* 421, 99-109., 2011. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.09.021

14. Amiel G.E., Sukhotnik I., Kawar B., Siplovich L., Use of n-butyl-2-cyanoacrylate in elective surgical incisions-longterm outcomes 11 No competing interests declared, *Journal of the American College of Surgeons* 189 (1), 21-25., 1999. doi:10.1016/s1072-7515(99)00068-x
15. Anderson B.C., Andrews P.G.D., Arthur H., Jacobson W., Melby L.R., Playtis A.J., Sharkey W.H., Anionic polymerization of methacrylates. Novel functional polymers and copolymers, *Macromolecules* 14, 1599-1601., 1981. doi:10.1021/ma50006a093
16. Andrea T., Marcela F., Lucia C., Esther F., Elena M., Simona M., Microencapsulation of lipase and savinase enzymes by spray drying using Arabic gum as wall material, *Journal of Engineering and Applied Science* 6, 161-173., 2016. doi:10.4236/jeas.2016.64012
17. Angamma C.J., Jayaram S.H., Analysis of the effects of solution conductivity on electrospinning process and fiber morphology, *IEEE Transactions on Industry Applications* 47 (3), 1109-1117., 2011. doi:10.1109/TIA.2011.2127431
18. Antheunis H., Van der Meer J.C., De Geus M., Heise A., Koning C.E., Autocatalytic equation describing the change in molecular weight during hydrolytic degradation of aliphatic polyesters, *Biomacromolecules* 11, 1118-1124., 2010. doi:10.1021/bm100125b
19. Antheunis H., Van der Meer J.C., De Geus M., Kingma W., Koning C.E., Improved mathematical model for the hydrolytic degradation of aliphatic polyesters, *Macromolecules* 42, 2462-2471., 2009. doi:10.1021/ma802222m
20. Antipova T.V., Zhelifonova V.P., Zaitsev K.V., Nedorezova P.M., Aladyshev A.M., Klyamkina A.N., Kostyuk S.V., Danilogorskaya A.A., Kozlovsky A.G., Biodegradation of poly- ϵ -caprolactones and poly-L-lactides by fungi, *Journal of Polymers and the Environment* 26, 4350-4359., 2018, doi:10.1007/s10924-018-1307-3
21. Applequist W.L., Moerman D.E., Yarrow (*Achillea millefolium* L.): A Neglected Panacea? A Review of Ethnobotany, Bioactivity, and Biomedical Research¹, *Economic Botany*, 65 (2), 209-225., 2011. doi:10.1007/s12231-011-9154-3
22. Ashter S.A., Thermoforming of single and multilayer laminates, *Mechanics of Materials*, 123-145., 2014. doi:10.1016/b978-1-4557-3172-5.00006-2
23. Augustine R., Nethi S.K., Kalarikkal N., Thomas S., Patra C.R., Electrospun polycaprolactone (PCL) scaffolds embedded with europium hydroxide nanorods (EHNs) with enhanced vascularization and cell proliferation for tissue engineering applications, *Journal of Materials Chemistry B* 5 (24), 4660-4672., 2017. doi:10.1039/C7TB00518K
24. Avérous L., Biodegradable Multiphase Systems Based on Plasticized Starch: A Review, *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews* 44 (3), 231-274., 2004. doi:10.1081/mc-200029326
25. Aydar A.Y., Bağdathoğlu N., Köseoğlu O., Effect of ultrasound on olive oil extraction and optimization of ultrasound-assisted extraction of extra virgin olive oil by response surface methodology (RSM), *Grasas Y Aceites* 68 (2), 189., 2017. doi:10.3989/gya.1057162
26. Azmin S.N.H.M., Manan Z.A., Alwi S.R.W., Chua L.S., Mustaffa A.A., Yunus N.A., Herbal processing and extraction technologies, *Separation & Purification Reviews* 45, 305-320., 2016. doi: 10.1080/15422119.2016.1145395
27. Baldino L., Cardea S., Generation of biocompatible PCL foams by supercritical foaming, *Chemical Engineering Transactions* 79, 241-246., 2020. doi:10.3303/CET2079041
28. Barber D.J., Freestone I.C., An investigation of the origin of the colour of the Lycurgus Cup by analytical transmission electron microscopy, *Archaeometry* 32, 33-45., 1990. doi:10.1111/j.1475-4754.1990.tb01079.x
29. Barbucci R. *Integrated Biomaterials Science*, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers 2002.
30. Basta Balkana, preuzeto sa sajta: <https://www.bastabalkana.com/2013/02/hajducka-trava-hajducica-ili-ranjenik-legendarna-lekovita-biljka-achillea-millefolium/>
31. Bastias-Montes J.M., Choque-Chavez M.C., Alarcon-Enos J., Quevedo-Leon R., Munoz-Farina O., Vidal-San-Martin C., Effect of spray drying at 150, 160, and 170 °C on the physical

- and chemical properties of maqui extract (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz), *Chilean Journal of Agricultural Research* 79 (1), 144-152., 2009. doi: 10.4067/S0718-58392019000100144
32. Baumgarten P.K., Electrostatic spinning of acrylic microfibers, *Journal of Colloid and Interface Science* 36 (1), 7., 1971. doi:10.1016/0021-9797(71)90241-4
 33. Bayda S., Adeel M., Tuccinardi T., Cordani M., Rizzolio F., The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine, *Molecules* 25 (1), 112., 2019. doi:10.3390/molecules25010112
 34. BCC Research advanced-materials, preuzeto sa sajta: <https://www.bccresearch.com/market-research/advanced-materials/implantable-biomaterials-markets-report.html>
 35. BCC Research nanotechnology, preuzeto sa sajta: <https://www.bccresearch.com/market-research/nanotechnology/global-markets-and-technologies-for-nanofibers.html>
 36. Benedek B., Kopp B., *Achillea millefolium* L. s.l. revisited: Recent findings confirm the traditional use, *Wiener Medizinische Wochenschrift* 157, 312-314., 2007. doi:10.1007/s10354-007-0431-9
 37. Benedek B., Gjoncaj N., Saukel J., Kopp B., Distribution of phenolic compounds in Middleeuropean taxa of the *Achillea millefolium* L. Aggregate, *Chemistry & Biodiversity* 4 (5), 849-857., 2007. doi:10.1002/cbdv.200790072
 38. Berklund C., Pack D.W., Kim K.K., Controlling surface nanostructure using flow-limited field-injection electrostatic spraying (FFESS) of poly (d,l-lactide-co-glycolide), *Biomaterials* 25 (25), 5649-5658., 2004. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.01.018
 39. Bhardwaj N., Kundu S.C., Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnology Advances* 28 (3), 325-347., 2010. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.01.004
 40. Billon A., Bataille B., Cassanas G., Jacob M., Development of spray-dried acetaminophen microparticles using experimental designs, *International Journal of Pharmaceutics* 203, 159-168., 2000. doi:10.1016/s0378-5173(00)00448-8.
 41. Bolgen N., Menciloglu Y.Z., Acatay K., Vargel I., Piskin E., *In vitro* and *in vivo* degradation of non-woven materials made of poly(ϵ -caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 16 (12), 1537-1555., 2005. doi:10.1163/156856205774576655
 42. Bouchet M., Ajjji A., Lerouge S., Determination of the adhesion between electrospun mats through peel tests, *Fibers and polymers* 22 (5), 1266-1273., 2021. doi:10.1007/s12221-021-9195-x
 43. Boyacı İ.H., A new approach for determination of enzyme kinetic constants using response surface methodology, *Biochemical Engineering Journal* 25, 55-62., 2005. doi:10.1016/j.bej.2005.04.001
 44. Bravo L., Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutrition Reviews* 56 (11), 317-333., 1998. doi:10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x
 45. Buchko C.J., Chen L.C., Shen Y., Martin D.C., Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films, *Polymer* 40 (26), 7397-7407., 1999. doi:10.1016/S0032-3861(98)00866-0
 46. Burkersroda F., Von Schedl L., Göpferich A., Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion, *Biomaterials* 23 (21), 4221-4231., 2002. doi:10.1016/s0142-9612(02)00170-9
 47. Bursle E.C., Dyer J., Looke D. F. M., McDougall, D. A. J., Paterson D. L., Playford E. G., Risk factors for urinary catheter associated bloodstream infection, *Journal of Infection* 70(6), 585-591., 2015. doi:10.1016/j.jinf.2015.01.001
 48. Cam M.E., Cesur S., Taskin T., Erdemir G., Kuruca D.S., Sahin Y.M., Kabasakal L., Gunduz O., Fabrication, characterization and fibroblast proliferative activity of electrospun *Achillea lycaonica*-loaded nanofibrous mats, *European Polymer Journal* 120, 109239., 2019. doi:10.1016/j.eurpolymj.2019.109239

49. Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sökmen A., Akpulat H. A., Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (*Asteraceae*). *Journal of Ethnopharmacology* 87 (2-3), 215-220., 2003. doi:10.1016/s0378-8741(03)00149-1
50. Carocho M., Ferreira I.C., A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives, *Food and Chemical Toxicology* 51, 15-25., 2013. doi:10.1016/j.fct.2012.09.021
51. Casper C.L., Stephens J.S., Tassi N.G., Chase D.B., Rabolt J.F., Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process, *Macromolecules* 37 (2), 573-578., 2004. doi:10.1021/ma0351975
52. Cavalcanti A.M., Baggio C.H., Freitas C.S., Rieck L., De Sousa R.S., Da Silva-Santos J.E., Mesia-Vela S., Marques M.C., Safety and antiulcer efficacy studies of *Achillea millefolium* L. after chronic treatment in Wistar rats, *Journal of Ethnopharmacology* 107, 277-284., 2006. doi:10.1016/j.jep.2006.03.011.
53. Chandra R., Rustgi R., Biodegradable polymers, *Progress in Polymer Science* 23 (7), 1273-1335., 1998. doi:10.1016/s0079-6700(97)00039-7
54. Chegini G.R., Ghobadian B., Spray dryer parameters for fruit juice drying, *World Journal of Agricultural Sciences* 3, 230-236., 2007.
55. Chen D.R., Bei J.Z., Wang S.G., Polycaprolactone microparticles and their biodegradation, *Polymer Degradation and Stability* 67, 455-459., 2000. doi:10.1016/S0141-3910(99)00145-7
56. Cheng G., Ma X., Li J.M., Cheng Y.E., Cao Y., Wang Z.M., Shi X.W., Du Y.M., Deng H.B., Li Z.B., Incorporating platelet-rich plasma into coaxial electrospun nanofibers for bone tissue engineering, *International Journal of Pharmaceutics* 547, 656-666., 2018. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.06.020
57. Cheng H.L., Yang X.Y., Che X., Yang M.S., Zhai G.X., Biomedical application and controlled drug release of electrospun fibrous materials, *Materials science & engineering C, Materials for biological applications* 90, 750-763., 2018. doi:10.1016/j.msec.2018.05.007
58. Cortes-Rojas D.F., Oliveira W.P., Physicochemical properties of phytopharmaceutical preparations as affected by drying methods and carriers, *Drying Technology* 30, 921-934., 2012. doi:10.1080/07373937.2012.666608
59. Costa P., Sousa Lobo J.M., Modeling and comparison of dissolution profiles, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 13 (2), 123-133., 2001. doi:10.1016/s0928-0987(01)00095-1
60. Coverdale B.D.M., Gough J.E., Sampson W.W., Hoyland J.A., Use of lecithin to control fibre morphology in electrospun poly(ϵ -caprolactone) scaffolds for improved tissue engineering applications, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 105 (10), 2865-2874., 2017. doi:10.1002/jbm.a.36139
61. Cueva C., Moreno-Arribas M.V., Martín-Álvarez P.J., Bills G., Vicente M.F., Basilio A., Rivas C.L., Requena T., Rodríguez J.M., Bartolomé B., Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria, *Research in Microbiology* 161 (5), 372-382., 2010. doi:10.1016/j.resmic.2010.04.006
62. Cui W., Zhou Y., Chang J., Electrospun nanofibrous materials for tissue engineering and drug delivery, *Science and Technology of Advanced Materials* 11 (1), 014108., 2010. doi:10.1088/1468-6996/11/1/014108
63. Darwis D., Mitomo H., Enjoji T., Yoshii F., Makuuchi K., Enzymatic degradation of radiation crosslinked poly(ϵ -caprolactone), *Polymer Degradation and Stability* 62 (2), 259-265., 1998. doi:10.1016/s0141-3910(98)00005-6
64. Dash S., Murthy P.N., Nath L., Chowdhury P., Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems, *Acta Poloniae Pharmaceutica* 67 (3), 217-223., 2010.

65. De Vrieze S., Van Camp T., Nelvig A., Hagström B., Westbroek P., De Clerck K., The effect of temperature and humidity on electrospinning, *Journal of Materials Science* 44 (5), 1357-1362., 2009. doi:10.1007/s10853-008-3010-6
66. Deitzel J.M., Kleinmeyer J., Harris D., Beck Tan N.C., The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles, *Polymer* 42 (1), 261-272., 2001. doi:10.1016/S0032-3861(00)00250-0
67. Del Castillo E., Process optimization: a statistical approach, *Springer Science & Business Media* 2007.
68. Demir M.M., Yilgor I., Yilgor E., Erman B., Electrospinning of polyurethane fibers, *Polymer* 43 (11), 3303-3309., 2002. doi:10.1016/S0032-3861(02)00136-2
69. Djonlagic J., Nikolic M., RSC Green Chemistry No. 12, A Handbook of Applied Biopolymer Technology: Synthesis, Degradation and Applications, Chapter 6: Biodegradable Polyesters: Synthesis and Physical Properties 149-196., 2011.
70. Donlan R.M., Biofilms and device-associated infections, *Emerging Infectious Diseases* 7 (2), 277-281., 2001. doi:10.3201/eid0702.010226
71. Doshi J., Reneker D.H., Electrospinning process and applications of electrospun fibers. In: Industry applications society annual meeting, 1993, *Conference record of the 1993 IEEE, 1993. IEEE* 1698-1703., 1993.
72. Drexler E.K., Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology; Anchor Press: Garden City, NY, USA, 1986.
73. Drexler E.K., Peterson C., Pergamit G., Unbounding the Future: The Nanotechnology Revolution; William Morrow and Company, Inc.: New York, NY, USA, 1991.
74. Dvir T., Timko B.P., Kohane D.S., Langer R., Nanotechnological strategies for engineering complex tissues, *Nature Nanotechnology* 6 (1), 13-22., 2011. doi:10.1038/nnano.2010.246
75. Edrisi M., Langrish T.A.G., Spray drying bioactive orange-peel extracts produced by Soxhlet extraction: Use of WPI, antioxidant activity and moisture sorption isotherms, *LWT - Food Science and Technology* 72, 1-8., 2016. doi:10.1016/j.lwt.2016.04.033
76. Eldridge J.A., Repko D., Mumper R.J., Retention of polyphenolic species in spray-dried blackberry extract using mannitol as a thermoprotectant, *Journal of Medicinal Food* 17, 1064-1069., 2014. doi:10.1089/jmf.2013.0177
77. Estelles J.M., Vidaurre A., Duenas J.M.M., Cortazar I.C., Physical characterization of polycaprolactone scaffolds, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 19 (1), 189-195., 2008. doi:10.1007/s10856-006-0101-2
78. European medicines agency, preuzeto sa sajta: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-opinion/final-european-union-herbal-monograph-achillea-millefolium-l-herba-revision-1_en.pdf, 2020.
79. Fallah M., Bahrami S.H., Ranjbar-Mohammadi M., Fabrication and characterization of PCL/gelatin/curcumin nanofibers and their antibacterial properties, *Journal of Industrial Textiles* 46 (2), 562-577., 2016. doi:10.1177/1528083715594978
80. Fang Z., Bhandari B., Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols, *Food Chemistry* 129, 1139-1147., 2011. doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.093
81. Fang Y.Z., Yang S., Wu G., Free radicals, antioxidants, and nutrition, *Nutrition* 18 (10), 872-879., 2002. doi:10.1016/s0899-9007(02)00916-4
82. Farooq Z., Rehman S., Abid M., Application of response surface methodology to optimize composite flour for the production and enhanced storability of leavened flat bread (Naan), *Journal of Food Processing and Preservation* 37, 939-945., 2013. doi:10.1111/j.1745-4549.2012.00732.x
83. Fatehi P., Abbasi M., Medicinal plants used in wound dressings made of electrospun nanofibers, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 14 (11), 1527-1548., 2020. doi:10.1002/term.3119

84. Feneley R.C.L., Hopley I.B., Wells P.N.T., Urinary catheters: history, current status, adverse events and research agenda, *Journal of Medical Engineering & Technology* 39 (8), 459-470., 2015. doi:10.3109/03091902.2015.1085600
85. Fenton O.S., Olafson K.N., Pillai P.S., Mitchell M.J., Langer, R., Advances in biomaterials for drug delivery, *Advanced Materials* 30, 1705328., 2018. doi:10.1002/adma.201705328
86. Feynman R.P., There's plenty of room at the bottom, *Engineering and Science* 23, 22-36., 1960.
87. Fisher L.E., Hook A.L., Ashraf W., Yousef A., Barrett D.A., Scurr D.J., Chen X., Smith E.F., Fay M., Parmenter D.J.C., Bayston R., Biomaterial modification of urinary catheters with antimicrobials to give long-term broadspectrum antibiofilm activity, *Journal of Controlled Release* 202, 57-64., 2015. doi:10.1016/j.jconrel.2015.01.037
88. Fong H., Chun I., Reneker, D., Beaded nanofibers formed during electrospinning, *Polymer* 40 (16), 4585-4592., 1999. doi:10.1016/s0032-3861(99)00068-3
89. Formhals A., Process and apparatus for preparing artificial threads. US, 1975504, 1934.
90. Formhals A., Production of artificial fibers. US Patent 2,077,373, 1937.
91. Formhals A., Artificial thread and method of producing same. US Patent 2,187,306, 1940.
92. Freestone I., Meeks N., Sax M., Higgitt C., The Lycurgus Cup-A Roman nanotechnology, *Gold Bulletin* 40, 270-277., 2007. doi:10.1007/BF03215599
93. Frey F.M., Meyers R., Antibacterial activity of traditional medicinal plants used by Haudenosaunee peoples of New York State, *BMC Complementary Medicine and Therapies* 10, 64., 2010. doi:10.1186/1472-6882-10-64
94. Fujihara K., Teo W.E., Lim T.C., Ma Z., *An introduction to electrospinning and nanofibers* 90, World Scientific, Singapore, 2005.
95. Funabashi M., Ninomiya F., Kunioka M., Biodegradation of polycaprolactone powders proposed as reference test materials for international standard of biodegradation evaluation method, *Journal of Polymers and the Environment* 15, 7-17., 2007. doi:10.1007/s10924-006-0041-4
96. Gallo L., Llabot Juan M., Allemandi D., Bucala V., Pina J., Influence of spray-drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cascara sagrada) extract powder physical properties, *Powder Technology* 208, 205-214., 2011. doi:10.1016/j.powtec.2010.12.021
97. Gnach A., Lipinski T., Bednarkiewicz A., Rybka J., Capobianco J.A., Upconverting nanoparticles: Assessing the toxicity, *Chemical Society Reviews* 44, 1561-1584., 2015. doi:10.1039/C4CS00177J
98. Goodsell D.S., *Bionanotechnology: lessons from nature*, Wiley-liss, New Jersey, USA, 1-10., 2004.
99. Göpferich A., Mechanisms of polymer degradation and erosion, *Biomaterials* 17 (2), 103-114., 1996. doi:10.1016/0142-9612(96)85755-3
100. Gotlib O., Vaitkus S., Simoes-Torigoe R., Morris K., Bodnar A., Spada F.E., Alagiri M., Talke F. E., Investigation of an improved electricidal coating for inhibiting biofilm formation on urinary catheters, *Journal of Materials Research and Technology* 10, 339-348., 2021. doi:10.1016/j.jmrt.2020.11.089
101. Goula A.M., Adamopoulos K.G., Spray drying of tomato pulp in dehumidified air: I. The effect on product recovery, *Journal of Food Engineering* 66, 25-34., 2005. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.02.029
102. Grech V., WASP (Write a Scientific Paper) using Excel – 8: t –Tests, *Early Human Development* 121, 58-61., 2018. doi:10.1016/j.earlhumdev.2018.02.
103. Greiner A., Wendorf J.H., Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers, *Angewandte Chemie International Edition* 46 (30), 5670-5703., 2007. doi:10.1002/anie.200604646
104. Grkovic M., Stojanovic D.B., Pavlovic V.B., Rajilic-Stojanovic M., Bjelovic M., Uskokovic P.S., Improvement of mechanical properties and antibacterial activity of

- crosslinked electrospun chitosan/poly (ethylene oxide) nanofibers, *Composites Part B: Engineering* 121, 58-67., 2017. doi:10.1016/j.compositesb.2017.03.024
105. Guil-Guerrero J., Ramos L., Moreno C., Zúñiga-Paredes J., Carlosama-Yopez M., Ruales P., Antimicrobial activity of plant-food by-products: A review focusing on the tropics, *Livestock Science* 189, 32-49., 2016. doi:10.1016/j.livsci.2016.04.021
 106. Gunatillake P.A., Adhikari R., Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering, *European Cells and Materials* 5, 1-16., 2003. doi:10.22203/eCM.v005a01
 107. Gupta P., Elkins C., Long TE., Wilkes G.L., Electrospinning of linear homopolymers of poly (methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent, *Polymer* 46 (13), 4799-4810., 2005. doi:10.1016/j.polymer.2005.04.021
 108. Gupta B., Geeta., Ray A. R., Preparation of poly(ϵ -caprolactone)/poly(ϵ -caprolactone-co-lactide) (PCL/PLCL) blend filament by melt spinning, *Journal of Applied Polymer Science* 123 (4), 1944-1950., 2011. doi:10.1002/app.34728
 109. Gupta B.P., Thakur N., Jain N.P., Banweer J., Jain S., Osmotically controlled drug delivery system with associated drugs, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 13, 571-588., 2010. doi:10.18433/j38w25
 110. Gurkan Y.Y., Turkten N., Hatipoglu A., Cinar Z., Photocatalytic degradation of cefazolin over N-doped TiO₂ under UV and sunlight irradiation: prediction of the reaction paths via conceptual DFT, *Chemical Engineering Journal* 184, 113-124., 2012. doi:10.1016/j.cej.2012.01.011
 111. Haghi A., Akbari M., Trends in electrospinning of natural nanofibers, *Physica Status Solidi (A)* 204 (6), 1830-1834., 2007. doi:10.1002/pssa.200675301
 112. Haider A., Haider S., Kang I.K., A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology, *Arabian Journal of Chemistry* 11 (8), 1165-1188., 2015. doi:10.1016/j.arabjc.2015.11.015
 113. Halliwell B., Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis, *British Journal of Experimental Pathology* 70 (6), 737., 1989.
 114. Halliwell B., Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life, *Journal of Plant Physiology* 141 (2), 312-322., 2006. doi:10.1104/pp.106.077073
 115. Han J., Cao R.W., Chen B., Ye L., Zhang A.Y., Zhang J., Feng Z.G., Electrospinning and biocompatibility evaluation of biodegradable polyurethanes based on L-lysine diisocyanate and L-lysine chain extender, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 96A (4), 705-714., 2011. doi:10.1002/jbm.a.33023
 116. Han X., Shen T., Lou H., Dietary polyphenols and their biological significance, *International Journal of Molecular Sciences* 8, 950-988., 2007. doi:10.3390/i8090950
 117. Hano C., Tungmunnithum D., Plant Polyphenols, More than Just Simple Natural Antioxidants: Oxidative Stress, Aging and Age-Related Diseases, *Medicines* 7 (5), 26., 2020. doi:10.3390/medicines7050026
 118. Hardenia A., Maheshwari N., Hardenia S.S., Dwivedi S.K., Maheshwari R., Tekade R.K., Scientific rationale for designing controlled drug delivery systems. In *Basic Fundamentals of Drug Delivery*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1-28., 2019.
 119. Hayati I., Bailey A., Tadros T.F., Investigations into the mechanisms of electrohydrodynamic spraying of liquids: I. Effect of electric field and the environment on pendant drops and factors affecting the formation of stable jets and atomization, *Journal of Colloid and Interface Science* 117 (1), 205-221., 1987. doi:10.1016/0021-9797(87)90185-8
 120. Hayek S.A., Gyawali R., Ibrahim S.A., Antimicrobial Natural Products. in: *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, (Ed.) A. Méndez-Vilas, Formatex research center., 2013.

121. Hemmati A.A., Arzi A., Amin M., Effect of *Achillea millefolium* extract in wound healing of rabbit, *Journal of Natural Remedies* 2 (2), 164-167., 2002. doi:10.18311/jnr/2002/138
122. Höglund A., Hakkarainen M., Albertsson A., Degradation profile of poly(ϵ -caprolactone)–the influence of macroscopic and macromolecular biomaterial design, *Journal of Macromolecular Science, Part A* 44 (9), 1041-1046., 2007. doi:10.1080/10601320701424487
123. Hsieh W.C., Ho S.W., Evaluation of antibacterial activities of cephalosporin antibiotics: cefazolin, cephaloridine, cephalothin, and cephalexin, *Chinese Journal of microbiology* 8 (1), 1-11., 1975.
124. Hsu C.M., Shivkumar S., N,N-dimethylformamide additions to the solution for the electrospinning of poly(ϵ -caprolactone) nanofibers, *Macromolecular Materials and Engineering* 289 (4), 334-340., 2004. doi:10.1002/mame.200300224
125. Hu J., Prabhakaran M. P., Tian L., Ding X., Ramakrishna S., Drug-loaded emulsion electrospun nanofibers: characterization, drug release and in vitro biocompatibility, *RSC Advances*, 5 (121), 100256-100267., 2015. doi:10.1039/c5ra18535a
126. Huang H., Oizumi S., Kojima N., Niino T., Sakai Y., Avidin–biotin binding-based cell seeding and perfusion culture of liver-derived cells in a porous scaffold with a three-dimensional interconnected flow-channel network, *Biomaterials* 28, 3815-3823., 2007. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.05.004
127. Huang L., McMillan R.A., Apkarian R.P., Pourdeyhimi B., Conticello V.P., Chaikof E.L., Generation of synthetic elastin-mimetic small diameter fibers and fiber networks, *Macromolecules* 33 (8), 2989-2997., 2000. doi:10.1021/ma991858f
128. Huang L., Nagapudi K., Apkarian R.P., Chaikof E.L., Engineered collagen–PEO nanofibers and fabrics, *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* 12 (9), 979-993., 2001. doi:10.1163/156856201753252516
129. Huang W.Y., Wei L.P., Ji Y.G., Xu D.X., Mo J.K., Effect of silicon and latex urinary catheters: a comparative study, *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 25 (8), 1026-1028., 2005. Chinese. PMID: 16109568.
130. Ibrahim H.M., Klingner A., A review on electrospun polymeric nanofibers: Production parameters and potential applications, *Polymer Testing* 90, 106647., 2020. doi:10.1016/j.polymertesting.2020.106647
131. Icoğlu H.I., Ogulata R.T., Effect of ambient parameters on morphology of electrospun poly (trimethylene terephthalate) (ptt) fibers, *Tekstil ve Konfeksiyon* 27 (3), 215-223., 2017.
132. Iqbal H., Khan B.A., Khan Z.U., Razzaq A., Khan N.U., Mena B., Mena F., Fabrication, physical characterizations and *in vitro* antibacterial activity of cefadroxil-loaded chitosan/poly(vinyl alcohol) nanofibers against *Staphylococcus aureus* clinical isolates, *International Journal of Biological Macromolecules* 144, 921-931., 2020. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.169
133. Iwamoto A., Tokiwa Y., Enzymatic degradation of plastics containing polycaprolactone, *Polymer Degradation and Stability* 45 (2), 205-213., 1994. doi:10.1016/0141-3910(94)90138-4
134. Jafari S.M., Ghalenoi M.G., Dehnad D., Influence of spray drying on water solubility index, apparent density, and anthocyanin content of pomegranate juice powder, *Powder Technology* 311, 59-65., 2017. doi: 10.1016/j.powtec.2017.01.070
135. Jang C.H., Cho Y.B., Jang Y.S., Kim M.S., Kim G.H., Antibacterial effect of electrospun polycaprolactone/polyethylene oxide/vancomycin nanofiber mat for prevention of periprosthetic infection and biofilm formation, *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 79 (8), 1299-1305., 2015. doi:10.1016/j.ijporl.2015.05.037
136. Jarusuwannapoom T., Hongrojjanawiwat W., Jitjaicham S., Wannatong L., Nithitanakul M., Pattamaprom C., Koombhongse P., Rangkupan R., Supaphol P., Effect of solvents on electro-spinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of

- resulting electrospun polystyrene fibers, *European Polymer Journal* 41 (3), 409-421., 2005. doi:10.1016/j.eurpolymj.2004.10.010
137. Johnson J.R., Johnston B., Kuskowski M.A., *In vitro* comparison of nitrofurazone and silver alloy-coated foley catheters for contact-dependent and diffusible inhibition of urinary tract infection-associated microorganisms, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (9), 4969-4972., 2012. doi:10.1128/aac.00733-12
 138. Johnson J.R., Kuskowski M.A., Wilt T.J., Systematic review: antimicrobial urinary catheters to prevent catheter-associated urinary tract infection in hospitalized patients, *Annals of Internal Medicine* 144 (2), 116., 2006. doi:10.7326/0003-4819-144-2-200601170-00009
 139. Johnson P.M., Knewton K.E., Hodge J.G., Lehtinen J.M., Trofimoff A.S., Fritz D.J., Robinson J.L., Surfactant location and internal phase volume fraction dictate emulsion electrospun fiber morphology and modulate drug release and cell response, *Biomaterials Science* 9 (4), 1397-1408., 2021. doi:10.1039/d0bm01751e
 140. Ju Y., Zhang A., Fang Y., Liu M., Zhao X., Wang H., Zhang Z., Phenolic compounds and antioxidant activities of grape canes extracts from vineyards, *Spanish Journal of Agricultural Research* 14 (3), e0805, 13 pages., 2016. doi:10.13140/RG.2.1.3053.7207
 141. Kajdič S., Vrečer F., Kocbek P., Preparation of poloxamer-based nanofibers for enhanced dissolution of carvedilol, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 117, 331-340., 2018. doi:10.1016/j.ejps.2018.03.006
 142. Kajdič S., Planinšek O., Gašperlin M., Kocbek P., Electrospun nanofibers for customized drug-delivery systems, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 51, 672-681., 2019. doi:10.1016/j.jddst.2019.03.038
 143. Kamat M.S., Osawa T., DeAngelis R.J., Koyama Y., DeLuca P.P., Estimation of the degree of crystallinity of cefazolin sodium by X-ray and infrared methods, *Pharmaceutical Research* 5 (7), 426-429., 1988. doi:10.1023/a:1015984300692
 144. Kamath S.M., Sridhar K., Jaison D., Gopinath V., Ibrahim B.K.M., Gupta N., Sundaram A., Sivaperumal P., Padmapriya S., Patil S.S., Fabrication of tri-layered electrospun polycaprolactone mats with improved sustained drug release profile, *Scientific Reports* 10 (1), 18179., 2020. doi:10.1038/s41598-020-74885-1
 145. Karami Z., Rezaeian I., Zahedi P., Abdollahi M., Preparation and performance evaluations of electrospun poly(ϵ -caprolactone), poly(lactic acid), and their hybrid (50/50) nanofibrous mats containing thymol as an herbal drug for effective wound healing, *Journal of Applied Polymer Science* 129 (2), 756-766., 2013. doi:10.1002/app.38683
 146. Karimi M., Diffusion in Polymer Solids and Solutions, *Mass Transfer in Chemical Engineering Processes* 2011. doi:10.5772/23436
 147. Kataria K., Gupta A., Rath G., Mathur R.B., Dhakate S.R., *In vivo* wound healing performance of drug loaded electrospun composite nanofibers transdermal patch, *International Journal of Pharmaceutics* 469 (1), 102-110., 2014. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.04.047
 148. Katti D.S., Robinson K.W., Ko F.K., Laurencin C.T., Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: Optimization of fabrication parameters, *Journal of Biomedical Materials Research* 70B (2), 286-296., 2004. doi:10.1002/jbm.b.30041
 149. Kenawy E.-R., Abdel-Hay F.I., El-Newehy M.H., Wnek G.E., Processing of polymer nanofibers through electrospinning as drug delivery systems, *Materials Chemistry and Physics* 113 (1), 296-302., 2009. doi:10.1016/j.matchemphys.2008.07.081
 150. Ki C.S., Baek D.H., Gang K.D., Lee K.H., Um I.C., Park Y.H., Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution, *Polymer* 46 (14), 5094-5102., 2005. doi:10.1016/j.polymer.2005.04.040
 151. Ki C.S., Kim J.W., Hyun J.H., Lee K.H., Hattori M., Rah D.K., Park Y.H., Electrospun three-dimensional silk fibroin nanofibrous scaffold, *Journal of Applied Polymer Science* 106 (6), 3922-3928., 2007. doi:10.1002/app.26914

152. Kim H.K., Missiakas D., Schneewind O., Mouse models for infectious diseases caused by *Staphylococcus aureus*, *Journal of Immunological Methods* 410, 88-99., 2014. doi:10.1016/j.jim.2014.04.007
153. Kim K., Luu Y.K., Chang C., Fang D.F., Hsiao B.S., Chu B., Hadjiargyrou M., Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds, *Journal of Controlled Release* 98 (1), 47-56., 2004. doi:10.1016/j.jconrel.2004.04.009
154. Kim Y-J., Park M.R., Kim M.S., Kwon O.H., Polyphenol-loaded polycaprolactone nanofibers for effective growth inhibition of human cancer cells, *Materials Chemistry and Physics* 133, 674-680., 2012. doi:10.1016/j.matchemphys.2012.01.050
155. Kinnear C., Moore T.L., Rodriguez-Lorenzo L., Rothen-Rutishauser B., Petri-Fink A., Form follows function: Nanoparticle shape and its implications for nanomedicine, *Chemical Reviews* 117, 11476-11521., 2017. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00194.
156. Koç B., Kaymak-Ertekin F., Response surface methodology and food processing applications, *Gıda - Journal of Food* 35 (1), 63-70., 2010.
157. Kohane D.S., Langer R., Polymeric biomaterials in tissue engineering, *Pediatric Research* 63 (5), 487-491., 2008. doi:10.1203/01.pdr.0000305937.26105.e7
158. Kopeček J., Polymer–drug conjugates: Origins, progress to date and future directions, *Advanced Drug Delivery Reviews* 65, 49-59., 2013. doi:10.1016/j.addr.2012.10.014
159. Korica M., Peršin Z., Trifunović S., Mihajlovski K., Nikolić T., Maletić S., Fras Zemljič L., Kostić M.M., Influence of different pretreatments on the antibacterial properties of chitosan functionalized viscose fabric: TEMPO oxidation and coating with TEMPO oxidized cellulose nanofibrils, *Materials* 12 (19), 3144., 2019. doi:10.3390/ma12193144
160. Korsmeyer R.W., Gurny R., Doelker E., Buri P., Peppas N.A., Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers, *International Journal of Pharmaceutics* 15 (1), 25-35., 1983. doi:10.1016/0378-5173(83)90064-9
161. Kowalczyk D., Ginalska G., Golus J., Characterization of the developed antimicrobial urological catheters, *International Journal of Pharmaceutics* 402 (1-2), 175-183., 2010. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.10.014
162. Kudra T., Sticky region in drying: Definition and identification, *Drying Technology* 21, 1457-1469., 2003. doi:10.1081/DRT-120024678
163. Kumar L., Verma S., Joshi K., Utreja P., Sharma S., Nanofiber as a novel vehicle for transdermal delivery of therapeutic agents: challenges and opportunities, *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* 7, 175., 2021. doi:10.1186/s43094-021-00324-1
164. Kuzelova Kostakova E., Meszaros L., Maskova G., Blazkova L., Turcsan T., Lukas D., Crystallinity of electrospun and centrifugal spun polycaprolactone fibers: A comparative study, *Journal of Nanomaterials* 2017, Art ID 8952390, 9 pages., 2017. doi:10.1155/2017/8952390
165. Labet M., Thielemans W., *Chemical Society Reviews* 38, 3484-3504., 2009. doi:10.1039/B820162P
166. Lakshmi T., Geetha R.V., Roy A., Kumar S.A., Yarrow (*Achillea Millefolium* Linn.) a herbal medicinal plant with broad therapeutic use-A review, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 9, 136-141., 2011.
167. Lam C.X.F., Hutmacher D.W., Schantz J.-T., Woodruff M.A., Teoh S.H., Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months *in vitro* and *in vivo*, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 90A (3), 906-919., 2009. doi:10.1002/jbm.a.32052
168. Lam C.X.F., Savalani M.M., Teoh S.-H., Hutmacher D.W., Dynamics of in vitro polymer degradation of polycaprolactone-based scaffolds: accelerated versus simulated physiological conditions, *Biomedical Materials* 3 (3), 034108., 2008. doi:10.1088/1748-6041/3/3/034108
169. Lamas Ferreira J.L., Alvarez Otero J., Gonzalez Gonzalez L., Novoa Lamazares L., Arca Blanco A., Bermudez Sanjurjo J.R., de la Fuente Aguado J., *Pseudomonas aeruginosa*

- urinary tract infections in hospitalized patients: Mortality and prognostic factors, *Plos One* 12 (5), e0178178., 2017.
170. Langer R., Vacanti J.P., Tissue engineering, *Science* (New York, N.Y.) 260 (5110), 920-926., 1993. doi:10.1126/science.8493529
 171. Langer R., Drug delivery and targeting, *Nature* 392, 5-10., 1998.
 172. Latos-Brozio M., Masek A., Natural polymeric compound based on high thermal stability catechin from green tea, *Biomolecules* 10, 1191., 2020. doi:10.3390/biom10081191
 173. Lawrence E.L., Turner I.G., Materials for urinary catheters: A review of their history and development in the UK, *Medical Engineering & Physics* 27 (6), 443-453., 2005. doi:10.1016/j.medengphy.2004.12.013
 174. Lee C.H., Singla A., Lee Y., Biomedical applications of collagen, *International Journal of Pharmaceutics* 221 (1-2), 1-22., 2001. doi:10.1016/s0378-5173(01)00691-3
 175. Lee J.S., Choi K.H., Ghim H.D., Kim S.S., Chun D.H., Kim H.Y., Lyoo W.S., Role of molecular weight of atactic poly(vinyl alcohol) (PVA) in the structure and properties of PVA nanofabric prepared by electrospinning, *Journal of Applied Polymer Science* 93 (4), 1638-1646., 2004. doi:10.1002/app.20602
 176. Lee K.H., Kim H.Y., Khil M.S., Ra Y.M., Lee D.R., Characterization of nanostructured poly(ϵ -caprolactone) nonwoven mats via electrospinning, *Polymer* 44 (4), 1287-1294., 2003. doi:10.1016/s0032-3861(02)00820-0
 177. Lee S.K., Mbwambo Z., Chung H., Luyengi L., Gamez E., Mehta R., Kinghorn A., Pezzuto J., Evaluation of the antioxidant potential of natural products, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 1, 35., 1998.
 178. Leong N.L., Kabir N., Arshi A., Nazemi A., Jiang J., Wu B.M., Petrigliano F.A., McAllister D.R., Use of ultra-high molecular weight polycaprolactone scaffolds for ACL reconstruction, *Journal of Orthopaedic Research* 34 (5), 828-835., 2016. doi:10.1002/jor.23082
 179. Li D., Xia Y., Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel?, *Advanced Materials* 16 (14), 1151-1170., 2004. doi:10.1002/adma.200400719
 180. Li S., Liu L., Garreau H., Vert M., Lipase-catalyzed biodegradation of poly(ϵ -caprolactone) blended with various polylactide-based polymers, *Biomacromolecules* 4 (2), 372-377., 2003. doi:10.1021/bm025748j
 181. Li S., Vert M., Biodegradation of Aliphatic Polyesters in Degradable Polymers: Principles and Application, ed. G. Scott, Kluwer Academic Publishers 71., 2002.
 182. Li X., Li P., Saravanan R., Basu A., Mishra B., Lim S.H., Su X., Tambyah P.A., Leong S.S.J., Antimicrobial functionalization of silicone surfaces with engineered short peptides having broad spectrum antimicrobial and salt-resistant properties, *Acta Biomaterialia* 10 (1), 258-266., 2014. doi:10.1016/j.actbio.2013.09.009
 183. Li Z-H., Cai M., Liu Y-S., Sun P-L., Luo S-L., Antibacterial activity and mechanisms of essential oil from *Citrus medica* L. var. *Sarcodactylis*, *Molecules* 24, 1577., 2019. doi:10.3390/molecules24081577.
 184. Li H., Huang C., Jin X., Ke Q., An electrospun poly(ϵ -caprolactone) nanocomposite fibrous mat with a high content of hydroxyapatite to promote cell infiltration, *RSC Advances* 8, 25228-25235., 2018. doi:10.1039/c8ra02059k
 185. Lim M.M., Sultana N., *In vitro* cytotoxicity and antibacterial activity of silver-coated electrospun polycaprolactone/gelatin nanofibrous scaffolds, 3 *Biotech* 6, 211., 2016. doi:10.1007/s13205-016-0531-6
 186. Lim Y.P., Pang S.F., Yusoff M.M., Gimnun J., Correlation between the antioxidant, total flavonoid and total phenolic content of phaleria macrocarpa fruit extract, *International Journal of Recent Technology and Engineering* 8, 38-42., 2019.
 187. Liu L., Kuffel K., Scott D.K., Constantinescu G., Chung H.-J., Rieger J., Silicone-based adhesives for long-term skin application: cleaning protocols and their effect on peel

- strength, *Biomedical Physics & Engineering Express* 4 (1), 015004., 2017. doi:10.1088/2057-1976/aa91fb
188. Lo J., Lange D., Chew B., Ureteral stents and foley catheters-associated urinary tract infections: The role of coatings and materials in infection prevention, *Antibiotics* 3 (1), 87-97., 2014. doi:10.3390/antibiotics3010087
 189. Lucas N., Bienaime C., Belloy C., Queneudec M., Silvestre F., Nava-Saucedo J.-E., Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review, *Chemosphere* 73 (4), 429-442., 2008. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.06.064
 190. Luciani A., Coccoli V., Orsi S., Ambrosio L., Netti P.A., PCL microspheres based functional scaffolds by bottom-up approach with predefined microstructural properties and release profiles, *Biomaterials* 29, 4800-4807., 2008. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.09.007
 191. Łukasiewicz S., Mikołajczyk A., Błasiak E., Fic E., Dziedzicka-Wasylewska M., Polycaprolactone nanoparticles as promising candidates for nanocarriers in novel nanomedicines, *Pharmaceutics* 13 (2), 191., 2021. doi:10.3390/pharmaceutics13020191
 192. Luong-Van E., Grøndahl L., Chua K.N., Leong K.W., Nurcombe V., Cool S.M., Controlled release of heparin from poly(ϵ -caprolactone) electrospun fibers, *Biomaterials* 27 (9), 2042-2050., 2006. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.10.028
 193. Lv Z., Zhao N., Wu Z., Zhu C., Li Q., Fabrication of novel open-cell foams of poly(ϵ -caprolactone)/poly(lactic acid) blends for tissue engineering scaffolds, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 57, 12951-12958., 2018. doi:10.1021/acs.iecr.8b02233
 194. Madhaiyan K., Sridhar R., Sundarajan S., Venugopal J.R., Ramakrishna S., Vitamin B12 loaded polycaprolactone nanofibers: A novel transdermal route for the water soluble energy supplement delivery, *International Journal of Pharmaceutics* 444 (1-2), 70-76., 2013. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.01.040
 195. Maleki H., Gharehaghaji A.A., Toliyat T., Dijkstra P.J., Drug release behavior of electrospun twisted yarns as implantable medical devices, *Biofabrication* 8 (3), 035019., 2016. doi:10.1088/1758-5090/8/3/035019
 196. Mansoori G., Soelaiman F.T., Nanotechnology-An Introduction for the Standards Community, *Journal of ASTM International* 2 (6), 1-22., 2005. doi:10.1520/JAI13110
 197. Mao Y., Guidoin R., Li Y., Brochu G., Zhang Z., Wang L., Soybean-derived phospholipids complexed poly(lactic-co-glycolic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering applications, *Materials & Design* 205, 109737., 2021. doi:10.1016/j.matdes.2021.109737
 198. Marrazzo C., Di Maio E., Iannace S., Conventional and nanometric nucleating agents in poly(ϵ -caprolactone) foaming: crystals vs. bubbles nucleation, *Polymer Engineering & Science* 48, 336-344., 2008. doi:10.1002/pen.20937
 199. Matthews J.A., Wnek G.E., Simpson D.G., Bowlin G.L., Electrospinning of collagen nanofibers, *Biomacromolecules* 3 (2), 232-238., 2002. doi:10.1021/bm015533u
 200. Maurya M., Murphyb K., Kumarb S., Shib L., Leea G., Effects of process variables on the powder yield of spray-dried trehalose on a laboratory spray-dryer, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 59, 565-573., 2005. doi:10.1016/j.ejpb.2004.10.002.
 201. Maver T., Kurecic M., Pivec T., Maver U., Gradisnik L., Gasparic P., Kaker B., Bratusa A., Hribernik S., Kleinschek K.S., Needleless electrospun carboxymethyl cellulose/polyethylene oxide mats with medicinal plant extracts for advanced wound care applications, *Cellulose* 27, 4487-4508., 2020. doi:10.1007/s10570-020-03079-9
 202. McMillan J., Batrakova E., Gendelman H.E., Cell delivery of therapeutic nanoparticles, *Nanoparticles in Translational Science and Medicine*, 563-601., 2011. doi:10.1016/b978-0-12-416020-0.00014-0
 203. Megelski S., Stephens J.S., Chase D.B., Rabolt J.F., Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers, *Macromolecules* 35 (22), 8456-8466., 2002. doi:10.1021/ma020444a

204. Merrell J.G., McLaughlin S.W., Tie L., Laurencin C.T., Chen A.F., Nair L.S., Curcumin-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanofibres: diabetic wound dressing with anti-oxidant and anti-inflammatory properties, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 36, 1149-1156., 2009. doi:10.1111/j.1440-1681.2009.05216.x
205. Mihajlovic T., Ibric S., Mladenovic A., Application of design of experiments and multilayer perceptron neural network in optimization of the spray-drying process, *Drying Technology* 29, 1638-1647., 2011. doi:10.1080/07373937.2011.592960
206. Milutinovic D.M., Iskorišćenje otpada iz prerade jagorčevine (*Primula veris*), rastavića (*Equisetum arvense*) i hajdučke trave (*Achillea millefolium*) za dobijanje biološki aktivnih polifenola, doktorska disertacija, Beograd, 2017.
207. Milutinovic M., Radovanovic N., Corovic M., Siler-Marinkovic S., Rajilic-Stojanovic M., Dimitrijevic-Brankovic S., Optimisation of microwave-assisted extraction parameters for antioxidants from waste *Achillea millefolium* dust, *Industrial Crops and Products* 77, 333-341., 2015. doi:10.1016/j.indcrop.2015.09.007
208. Milutinovic M., Dimitrijevic-Brankovic S., Rajilic-Stojanovic M., Plant extracts rich in polyphenols as potent modulators in the growth of probiotic and pathogenic intestinal microorganisms, *Frontiers in Nutrition* 8, 688843., 2021. doi:10.3389/fnut.2021.688843
209. Mochizuki M., Hirano M., Kanmuri Y., Kudo K., Tokiwa Y., Hydrolysis of polycaprolactone fibers by lipase: Effects of draw ratio on enzymatic degradation, *Journal of Applied Polymer Science* 55 (2), 289-296., 1995. doi:10.1002/app.1995.070550212
210. Moctezuma C., Hammerbacher A., Heil M., Gershenzon J., Méndez-Alonzo R., Oyama K., Specific polyphenols and tannins are associated with defense against insect herbivores in the tropical oak *Quercus oleoides*, *Journal of chemical ecology* 40, 458-467., 2014. doi:10.1007/s10886-014-0431-3
211. Monteiro C., Costa F., Pirttilä A.M., Tejesvi M.V., Martins M.C.L., Prevention of urinary catheter-associated infections by coating antimicrobial peptides from crowberry endophytes, *Scientific Reports* 9 (1), 2019. doi:10.1038/s41598-019-47108-5
212. Montgomery D.C., Response Surface Methods and Designs. In: *Design and analysis of experiments*, Eighth Edition John Wiley and Sons, Inc, New Jersey, 478., 2005.
213. Morris B.A., Adhesion, *The Science and Technology of Flexible Packaging* 351-400., 2017. doi:10.1016/b978-0-323-24273-8.00010-1
214. Morton W.J., William James Morton. Google Patents 1902.
215. Motealleh B., Zahedi P., Rezaeian I., Moghimi M., Abdolghaffari A.H., Zarandi M.A., Morphology, drug release, antibacterial, cell proliferation, and histology studies of chamomile-loaded wound dressing mats based on electrospun nanofibrous poly(ϵ -caprolactone)/polystyrene blends, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 102, 977-987., 2014. doi:10.1002/jbm.b.33078
216. Munir M.U., Ihsan A., Javed I., Ansari M.T., Bajwa S.Z., Bukhari S.N.A., Ahmed A., Malik M.Z., Khan W.S., Controllably biodegradable hydroxyapatite nanostructures for cefazolin delivery against antibacterial resistance, *ACS Omega* 4 (4), 7524-7532., 2019. doi:10.1021/acsomega.9b00541
217. Muñoz-Bonilla A., Cerrada M., Fernández-García M., Polymeric materials with antimicrobial activity: From synthesis to applications, *RSC Polymer Chemistry Series* 2013, London.
218. Nacey J., Delahijnt B., The evolution and development of the urinary catheter, *Australian and New Zealand Journal of Surgery* 63 (10), 815-819., 1993. doi:10.1111/j.1445-2197.1993.tb00347.x
219. Nair L.S., Laurencin C.T., Biodegradable polymers as biomaterials, *Progress in Polymer Science* 32 (8-9), 762-798., 2007. doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017

220. Namboodiri A.G., Parameswaran R., Fibro-porous polycaprolactone membrane containing extracts of *Biophytum sensitivum*: A prospective antibacterial wound dressing, *Journal of Applied Polymer Science* 129 (4), 2280-2286., 2013. doi:10.1002/app.38950
221. National Nanotechnology Initiative (NNI). Dostupno online: www.nano.gov
222. Nedovic V., Kalusevic A., Manojlovic V., Petrovic T., Bugarski B., Encapsulation systems in the food industry, In: *Advances in Food Process Engineering Research and Applications*, Boston, MA: Springer Nature America, Inc, 229-253., 2013. doi:10.1007/978-1-4614-7906-2_13
223. Nguyen D.Q., Nguyen T.H., Mounir S., Allaf K., Effect of feed concentration and inlet air temperature on the properties of soymilk powder obtained by spray drying, *Drying Technology* 36 (7), 817-829., 2017. doi:10.1080/07373937.2017.1357040
224. Nikmaram N., Roohinejad S., Hashemi S., Koubaa M., Barba F.J., Abbaspourrad A., Greiner R., Emulsion-based systems for fabrication of electrospun nanofibers: food, pharmaceutical and biomedical applications, *RSC Advances* 7, 28951-28964., 2017. doi:10.1039/C7RA00179G
225. Nirmala S., Karthiyayini T., Wound healing activity on the leaves of *Achillea millefolium* L. by excision, incision, and dead space model on adult Wistar albino rats, *International Research Journal of Pharmacy* 2 (3), 240-245., 2011.
226. Norton C.L., Method of and apparatus for producing fibrous or filamentary material, US Patent 2,048,651, 1936.
227. Nostro A., Germano M.P., D'Angelo V., Marino A., Cannatelli M.A., Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity, *Letters in Applied Microbiology* 30, 379-384., 2000. doi:10.1046/j.1472-765x.2000.00731.x.
228. Nowatzki P.J., Koepsel R.R., Stoodley P., Min K., Harper A., Murata H., Donfack J., Hortelano E.R., Ehrlich G.D., Russell A.J., Salicylic acid-releasing polyurethane acrylate polymers as anti-biofilm urological catheter coatings, *Acta Biomaterialia* 8 (5), 1869-1880., 2012. doi:10.1016/j.actbio.2012.01.032
229. Okada M., Chemical syntheses of biodegradable polymers, *Progress in Polymer Science* 27 (1), 87-133., 2002. doi:10.1016/s0079-6700(01)00039-9
230. Oliveira W.P., Bott R.B., Souza C.R.F., Manufacture of standardized dried extracts from medicinal Brazilian plants, *Drying Technology* 24, 523-533., 2006. doi:10.1080/07373930600612073
231. Othman L., Sleiman A., Abdel-Massih R.M., Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in Middle Eastern plants, *Frontiers in Microbiology* 10, 911., 2019. doi:10.3389/fmicb.2019.00911
232. Ozmen L., Langrish T.A.G., An experimental investigation of the wall deposition of milk powder in a pilot-scale spray dryer, *Drying Technology* 21, 1253-1272., 2003. doi:10.1081/DRT-120023179
233. Paarakh M., Jose P., Setty C., Christopher G., Release kinetics-concepts and applications, *International Journal of Pharmacy Research & Technology* 8, 12-20., 2018. doi:10.31838/ijprt/08.01.02
234. Palhares R.M., Gonçalves Drummond M., dos Santos Alves Figueiredo Brasil B., Pereira Cosenza G., das Graças Lins Brandao M., Oliveira G., Medicinal plants recommended by the world health organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality, *PloS one* 10, e0127866, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0127866.
235. Park J., Ye M., Park. K., Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs, *Molecules* 10 (1), 146-161., 2005. doi:10.3390/10010146
236. Park K., Controlled drug delivery systems: Past forward and future back, *Journal of Controlled Release* 190, 3-8., 2014. doi:10.1016/j.jconrel.2014.03.054
237. Patel R.P., Patel M.P., Suthar A.M., Spray drying technology: an overview, *Indian Journal of Science and Technology* 2, 44-47., 2009. doi:10.17485/ijst/2009/v2i10.3

238. Patil P.B., Uphade K.B., Saudagar R.B., A review: Osmotic drug delivery system, *Pharma Science Monitor* 9, 2. 2018.
239. Pedroso T.M., Salgado H.R.N., Methods for qualitative analysis of cefazolin sodium raw material and pharmaceutical product, *Physical Chemistry* 3 (2), 29-38., 2013. doi:10.5923/j.pc.20130302.01
240. Pelipenko J., Kocbek P., Kristl J., Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration, *International Journal of Pharmaceutics* 484, 57-74., 2015. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.02.043
241. Pena J., Corrales T., Izquierdo-Barba I., Doadrio A.L., Vallet-Regí M., Long term degradation of poly(ϵ -caprolactone) films in biologically related fluids, *Polymer Degradation and Stability* 91, 1424-1432., 2006. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2005.10.016
242. Petrovska B., Historical review of medicinal plants' usage, *Pharmacognosy Reviews* 6 (11), 1., 2012. doi:10.4103/0973-7847.95849
243. Pham H.N.T., Nguyen V.T., Vuong Q.V., Bowyer M.C., Scarlett C.J., Effect of extraction solvents and drying methods on the physicochemical and antioxidant properties of *Helicteres hirsuta* Lour. Leaves, *Technologies* 3, 285-301., 2015. doi:10.3390/technologies3040285
244. Pillay V., Dott C., Choonara Y.E., Tyagi C., Tomar L., Kumar P., du Toit L.C., Ndesendo V.M., A review of the effect of processing variables on the fabrication of electrospun nanofibers for drug delivery applications, *Journal of Nanomaterials* 2013, 1-22., 2013. doi:10.1155/2013/789289
245. Pinon-Balderrama C.I., Leyva-Porrás C., Teran-Figueroa Y., Espinosa-Solis V., Alvarez-Salas C., Saavedra-Leos M.Z., Encapsulation of active ingredients in food industry by spray-drying and nano spray-drying technologies, *Processes* 8 (8), 889., 2020. doi:10.3390/pr8080889
246. Pishgar-Komleh S.H., Keyhani A., Msm R., Jafari A., Application of response surface methodology for optimization of Picker-Husker harvesting losses in corn seed, *Iranica Journal of Energy and Environment* 3 (2), 134-142., 2012. doi:10.5829/IDOSI.IJEE.2012.03.02.0027
247. Piskin E., Biodegradable polymers as biomaterials, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 6 (9), 775-795., 1995. doi:10.1163/156856295x00175
248. Pitt C.G., Poly- ϵ -caprolactone and its copolymers in biodegradable polymers as drug delivery systems, ed. M. Casin and R. Langer, Marcel Dekker, New York, 71., 1990.
249. Poole C.P., Owens F.J., Introduction to Nanotechnology; John Wiley & Sons: New York, NY, USA, 2003.
250. Poozesh S., Jafari S.M., Akafuah N.K., Interrogation of a new inline multi-bin cyclone for sorting of produced powders of a lab-scale spray dryer, *Powder Technology* 373, 590-598., 2020. doi:10.1016/j.powtec.2020.07.012
251. Popovic V., Tatic M., Sikora V., Ikanovic J., Drazic G., Djukic V., Mihailovic B., Filipovic V., Dozet G., Jovanovic Lj., Stevanovic P., Variability of yield and chemical composition in soybean genotypes grown under different agro-ecological conditions of Serbia, *Romanian Agricultural Research* 33, 29-39., 2016.
252. Potrč T., Baumgartner S., Roškar R., Planinšek O., Lavrič Z., Kristl J., Kocbek P., Electrospun polycaprolactone nanofibers as a potential oromucosal delivery system for poorly water-soluble drugs, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 75, 101-113., 2015. doi:10.1016/j.ejps.2015.04.004
253. PR Newswire, preuzeo sa sajta: <https://www.prnewswire.com/news-releases/implantable-biomaterials-global-market-report-2021-301484736.html>
254. Pradell T., Climent-Font A., Molera J., Zucchiatti A., Ynsa M.D., Roura P., Crespo D., Metallic and nonmetallic shine in luster: An elastic ion backscattering study, *Journal of Applied Physics* 101, 103518., 2007. doi:10.1063/1.2734944

255. Prinn K.B., Costantino H.R., Tracy M., Statistical modeling of protein spray drying at the lab scale, *AAPS Pharm Sci Tech.* 3, E4., 2002. doi:10.1208/pt030104.
256. PubMed, preuzeto sa sajta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=nanofiber%20electrospinning>
257. Pulicharla R., Marques C., Das R.K., Rouissi T., Brar S.K., Encapsulation and release studies of strawberry polyphenols in biodegradable chitosan nanoformulation, *International Journal of Biological Macromolecules* 88, 171-178., 2016. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.03.036
258. Qin X., Wu D., Effect of different solvents on poly(caprolactone) (PCL) electrospun nonwoven membranes, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 107, 1007-1013., 2012. doi:10.1007/s10973-011-1640-4
259. Radisavljevic A., Stojanovic D.B., Perisic S., Djokic V., Radojevic V., Rajilic-Stojanovic M., Uskokovic P.S., Cefazolin-loaded polycaprolactone fibers produced via different electrospinning methods: Characterization, drug release and antibacterial effect, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 124, 26-36., 2018. doi:10.1016/j.ejps.2018.08.023
260. Radisavljević A., Milutinović M., Dimitrijević Branković S., Uskoković P., Rajilić-Stojanović M., Optimization of spray drying conditions for production of *Achillea millefolium* extract powder, *HEMIJSKA INDUSTRIJA* 75 (6), 353-363., 2022. doi:10.2298/HEMIND210527030R
261. Ramalingam R., Dhand C., Leung C.M., Ezhilarasu H., Prasannan P., Ong S.T., Subramanian S., Kamruddin M., Lakshminarayanan R., Ramakrishna S., Verma N.K., Arunachalam K.D., Poly- ϵ -caprolactone/gelatin hybrid electrospun composite nanofibrous mats containing ultrasound assisted herbal extract: antimicrobial and cell proliferation study, *Nanomaterials* 9, 462., 2019. doi:10.3390/nano9030462
262. Ramalingam R., Dhand C., Leung C.M., Ong S.T., Annamalai S.K., Kamruddin M., Verma N.K., Ramakrishna S., Lakshminarayanan R., Arunachalam K.D., Antimicrobial properties and biocompatibility of electrospun poly(ϵ -caprolactone) fibrous mats containing *Gymnema sylvestre* leaf extract, *Materials Science and Engineering C* 98, 503-514., 2019. doi:10.1016/j.msec.2018.12.135
263. Rameshbabu A.P., Datta S., Bankoti K., Subramani E., Chaudhury K., Lalzawmliana V., Nandi S.K., Dhara S., Polycaprolactone nanofibers functionalized with placental derived extracellular matrix for stimulating wound healing activity, *Journal of Materials Chemistry B* 6, 6767., 2018. doi:10.1039/c8tb01373j
264. Ramos FdeM, Oliveira C.C.Mde, Soares A.S.P., Silveira Junior V., Assessment of differences between products obtained in conventional and vacuum spray dryer, *Journal of Food Science and Technology* 36 (4), 724-729., 2016. doi:10.1590/1678-457X.09216
265. Rath G., Hussain T., Chauhan G., Garg T., Kumar Goyal A., Fabrication and characterization of cefazolin-loaded nanofibrous mats for the recovery of post-surgical wound, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 44 (8), 1783-1792., 2016. doi:10.3109/21691401.2015.1102741
266. Rayner C., Munckhof W.J., Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*, *Internal Medicine Journal* 35, S3-S16., 2005. doi:10.1111/j.1444-0903.2005.00976.x
267. Reibold M., Paufler P., Levin A.A., Kochmann W., Pätzke N., Meyer D.C., Materials: Carbon nanotubes in an ancient Damascus sabre, *Nature* 444, 286., 2006. doi:10.1038/444286a
268. Rocha G.A., Favaro-Trindade C.S., Grosso C.R.F., Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules, *Food and Bioproducts Processing* 90, 1-6., 2012. doi:10.1016/j.fbp.2011.01.001
269. Rošic R., Kocbek P., Pelipenko J., Kristl J., Baumgartner S., Nanofibers and their biomedical use, *Acta Pharmaceutica* 63 (3), 295-304., 2013. doi:10.2478/acph-2013-0024

270. Ruckh T.T., Oldinski R.A., Carroll D.A., Mikhova K., Bryers J.D., Popat K.C., Antimicrobial effects of nanofiber poly(caprolactone) tissue scaffolds releasing rifampicin, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 23 (6), 1411-1420., 2012. doi:10.1007/s10856-012-4609-3
271. Rychter M., Baranowska-Korczyn A., Milanowski B., Jarek M., Maciejewska B.M., Coy E.L., Lulek J., Cilostazol-loaded poly(ϵ -caprolactone) electrospun drug delivery system for cardiovascular applications, *Pharmaceutical Research* 35 (2), 2018. doi:10.1007/s11095-017-2314-0
272. Saeidnia S., Gohari A.R., Mokhber-Dezfuli N., Kiuchi F., A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achillea*, *DARU* 19, 173-86., 2011.
273. Sahoo S., Chakraborti C.K., Behera P.K., Development and evaluation of gastro-retentive controlled release polymeric suspensions containing ciprofloxacin and carbopol polymers, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 4 (4), 2268-2284., 2012.
274. Salevic A., Prieto C., Cabedo L., Nedovic V., Lagaron J.M., Physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties of electrospun poly(ϵ -caprolactone) films containing a solid dispersion of sage (*Salvia officinalis* L.) extract, *Nanomaterials* 9, 270., 2019. doi:10.3390/nano9020270
275. Salim S.A., Kamoun E.A., Evans S., EL-Moslamy S.H. , El-Fakharany E.M., Elmazar M.M., Abdel-Aziz A.F., Abou-Saleh R.H., Salaheldin T.A., Mercaptopurine-loaded sandwiched tri-layered composed of electrospun polycaprolactone/poly(methyl methacrylate) nanofibrous scaffolds as anticancer carrier with antimicrobial and antibiotic features: sandwich configuration nanofibers, release study and *in vitro* bioevaluation tests, *International Journal of Nanomedicine* 16, 6937-6955., 2021. doi:10.2147/IJN.S332920
276. Sanchez L.W., Watson R.R., Fruits, vegetables, and herbs: Bioactive foods promoting wound healing, *Fruits, Vegetables, and Herbs* 2016, 451-464. doi:10.1016/b978-0-12-802972-5.00021-4
277. Sanvicens N., Marco M.P., Multifunctional nanoparticles – properties and prospects for their use in human medicine, *Trends in Biotechnology* 26 (8), 425-433., 2008. doi:10.1016/j.tibtech.2008.04.005
278. Sarker S.D., Nahar L., Kumarasamy Y., Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals, *Methods* 42, 321-324., 2007. doi:10.1016/j.ymeth.2007.01.006
279. Sartore L., Inverardi N., Pandini S., Bignotti F., Chiellini F., PLA/PCL-based foams as scaffolds for tissue engineering applications, *Materials Today: Proceedings* 7, 410-417., 2019. doi:10.1016/j.matpr.2018.11.103
280. Sasidharan S., Chen Y., Saravanan D., Sundram K.M., Yoga Latha L., Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts, *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 8: 1-10., 2011. doi:10.4314/ajtcam.v8i1.60483
281. Savić L., Metode ekstrakcije biljnih materijala: Uperedna analiza cirkulatorne ekstrakcije i ekstrakcije primenom superkritičnog ugljen-dioksida, *Lekovite Sirovine* 34, 93-103., 2014.
282. Scalbert A., Williamson G., Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *The Journal of nutrition* 130, 2073S-2085S, 2000. doi:10.1093/jn/130.8.2073S
283. Schmidt C.E., Baier J.M., Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering, *Biomaterials* 21 (22), 2215-2231., 2000. doi:10.1016/s0142-9612(00)00148-4
284. Schober P., Boer C., Schwarte L.A., Correlation coefficients: Appropriate use and interpretation, *Anesthesia & Analgesia* 126 (5), 1763-1768., 2018. doi:10.1213/ane.0000000000002864

285. Seal B., Otero T.C., Panitch A., Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration, *Materials Science and Engineering: Reports* 34 (4-5), 147-230., 2001. doi:10.1016/S0927-796X(01)00035-3
286. Seville P.C., Li H., Learoyd T.P., Spray-dried powders for pulmonary drug delivery, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 24 (4), 307-360., 2007. doi:10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v24.i4.10
287. Sharma K., Ko E.Y., Assefa A.D., Ha S., Nile S.H., Lee E.T., Park S.W., Temperature-dependent studies on the total phenolics, flavonoids, antioxidant activities, and sugar content in six onion varieties, *Journal of Food and Drug Analysis* 23, 243-252., 2015. doi:10.1016/j.jfda.2014.10.005
288. Siddiq D.M., Darouiche R.O., New strategies to prevent catheter-associated urinary tract infections, *Nature Reviews Urology* 9 (6), 305-314., 2012. doi:10.1038/nrurol.2012.68
289. Siepman J., Siegel R.A., Siepman F., Diffusion controlled drug delivery systems, In: *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 127-152., 2012. doi:10.1007/978-1-4614-0881-9_6
290. Siepman J., Siepman F., Modeling of diffusion controlled drug delivery, *Journal of Controlled Release* 161, 351-362., 2012. doi:10.1016/j.jconrel.2011.10.006
291. Singh S., Singh A.N., Verma A., Dubey V.K., Biodegradable polycaprolactone (PCL) nanosphere encapsulating superoxide dismutase and catalase enzymes, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 171 (7), 1545-1558., 2013. doi:10.1007/s12010-013-0427-4
292. Singha P., Locklin J., Handa H., A review of the recent advances in antimicrobial coatings for urinary catheters, *Acta Biomaterialia* 50, 20-40., 2017. doi:10.1016/j.actbio.2016.11.070
293. Singleton V., Rossi J.A., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158., 1965.
294. Son W.K., Youk J.H., Lee T.S., Park W.H., The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly (ethylene oxide) fibers, *Polymer* 45 (9), 2959-2966., 2004., doi:10.1016/j.polymer.2004.03.006
295. Son Y.J., Kim W.J., Yoo H.S., Therapeutic applications of electrospun nanofibers for drug delivery systems, *Archives of Pharmacal Research* 37, 69-78., 2014. doi:10.1007/s12272-013-0284-2
296. Song R., Murphy M., Li C., Ting K., Soo C., Zheng Z., Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications, *Drug Design, Development and Therapy* 12, 3117-3145., 2018. doi:10.2147/dddt.s165440
297. Souza C.R.F., Oliveira W.P., Powder properties and system behaviour during spray drying of *Bauhinia forficata* link extract, *Drying Technology* 24, 735-749., 2006. doi:10.1080/07373930600685905
298. Souza V., Thomazini M., Balieiro J., Trindade C., Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*), *Food and Bioprocess Processing* 93, 39-50., 2015. doi:10.1016/j.fbp.2013.11.001
299. Sowa P., Marcincakova D., Milek M., Sidor E., Legath J., Dzugan M., Analysis of cytotoxicity of selected *Asteraceae* plant extracts in real time, their antioxidant properties and polyphenolic profile, *Molecules* 25 (23), 5517., 2020. doi:10.3390/molecules25235517
300. Stojanović G., Radulović N., Hashimoto T., Palić R., *In vitro* antimicrobial activity of extracts of four *Achillea* species: The composition of *Achillea clavennae* L. (*Asteraceae*) extract, *Journal of Ethnopharmacology* 101 (1-3), 185-190., 2005. doi:10.1016/j.jep.2005.04.026
301. Stridsberg K., Ryner M., Albertsson A.-C., Controlled ring-opening polymerization: Polymers with designed macromolecular architecture, *Advances in Polymer Science* 157, 41., 2002.

302. Suganya S., Senthil Ram T., Lakshmi B.S., Giridev V.R., Herbal drug incorporated antibacterial nanofibrous mat fabricated by electrospinning: an excellent matrix for wound dressings. *Journal of Applied Polymer Science* 121, 2893-2899., 2011. doi:10.1002/app.33915
303. Sultanova Z., Kaleli G., Kabay G., Mutlu, M., Controlled release of a hydrophilic drug from coaxially electrospun polycaprolactone nanofibers, *International Journal of Pharmaceutics* 505 (1-2), 133-138., 2016. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.03.032
304. Sun H., Mei L., Song C., Cui X., Wang P., The *in vivo* degradation, absorption and excretion of PCL-based implant, *Biomaterials* 27 (9), 1735-1740., 2006. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.09.019
305. Sun Y., Cheng S.H., Lu W.J., Wang Y.F., Zhang P.P., Yao Q.Q., Electrospun fibers and their application in drug controlled release, biological dressings, tissue repair, and enzyme immobilization, *RSC Advances* 9, 25712-25729., 2019. doi:10.1039/C9RA05012D
306. Sun Z.C., Zussman E., Yarin A.L., Wendorff J.H., Greiner A., Compound core-shell polymer nanofibers by co-electrospinning, *Advanced Materials* 15, 1929-1932., 2003. doi:10.1002/adma.200305136
307. Tajik H., Jalali F.S.S., Sobhani A., Shahbazi Y., Zadeh M.S., *In vitro* assessment of antimicrobial efficacy of alcoholic extract of *Achillea millefolium* in comparison with penicillin derivatives, *Journal of Animal and Veterinary Advances* 7, 508-511., 2008.
308. Tambyah P.A., Maki D.G., Catheter-associated urinary tract infection is rarely symptomatic, *Archives of Internal Medicine* 160 (5), 678-682., 2000. doi:10.1001/archinte.160.5.678
309. Taniguchi N., Arakawa C., Kobayashi T., On the basic concept of nano-technology. In Proceedings of the International Conference on Production Engineering, Tokyo, Japan, 26-29 August 1974.
310. Taylor G., Disintegration of water drops in an electric field, *Proceedings of the Royal Society A* 280 (1382), 383-397, 1964. doi:10.1098/rspa.1964.0151
311. Taylor G., Electrically Driven Jets, *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 313 (1515), 453-475., 1969. doi:10.1098/rspa.1969.0205
312. Tee L.H., Chuah L., Pin K.Y., Abdull Rashih A., Yusof Y.A., Optimization of spray drying process parameters of *Piper betle*L. (Sirih) leaves extract coated with maltodextrin, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 4, 1833-1841., 2012.
313. Telang A.M., Thorat B.N., Optimization of process parameters for spray drying of fermented soy milk. *Drying Technology* 28, 1445-1456., 2010. doi:10.1080/07373937.2010.482694
314. Thakkar S., Misra M., Electrospun polymeric nanofibers: New horizons in drug delivery, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 107, 148-167., 2017. doi:10.1016/j.ejps.2017.07.001
315. Tian H., Tang Z., Zhuang X., Chen X., Jing X., Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application, *Progress in Polymer Science* 37 (2), 237-280., 2012. doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.004
316. Tokiwa Y., Suzuki T., Hydrolysis of polyesters by lipases, *Nature* 270, 76-78., 1977. doi:10.1038/270076a0
317. Toneli J., Park K., Negreiros A., Murr F., Spray-drying process optimization of chicory root inulin, *Drying Technology* 28, 369-379., 2010. doi:10.1080/07373931003645017
318. Tonon R.V., Brabet C., Hubinger M.D., Influence of process conditions on the physicochemical properties of acai (*Euterpe oleraceae* Mart) powder produced by spray drying, *Journal of Food Engineering* 88, 411-418., 2008. doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.02.029
319. Tontul I., Topuz A., Spray-drying of fruit and vegetable juices: Effect of drying conditions on the product yield and physical properties, *Trends in Food Science and Technology* 63, 91-102., 2017. doi:10.1016/j.tifs.2017.03.009

320. Topala C.M., Tatarua L.D., Ducu C., ATR-FTIR spectra fingerprinting of medicinal herbs extracts prepared using microwave extraction, *Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 3, 2017. ISSN 2458-5920
321. Torres-Martinez E.J., Cornejo Bravo J.M., Serrano Medina A., Pérez González G.L., Villarreal Gómez L.J., A summary of electrospun nanofibers as drug delivery system: Drugs loaded and biopolymers used as matrices, *Current Drug Delivery* 15, 1360-1374., 2018. doi:10.2174/1567201815666180723114326
322. Trumbeckaite S., Benetis R., Bumblauskienė L., Burdulis D., Janulis V., Toleikis A., Vikšelis P., Jakštas V., *Achillea millefolium* L. s.l. herb extract: Antioxidant activity and effect on the rat heart mitochondrial functions, *Food Chemistry* 127 (4), 1540-1548., 2011. doi:10.1016/j.foodchem.2011.02.01
323. Tshweu L., Katata L., Kalombo L., Chiappetta D.A., Hocht C., Sosnik A., Swai, H., Enhanced oral bioavailability of the antiretroviral efavirenz encapsulated in poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles by a spray-drying method, *Nanomedicine* 9 (12), 1821-1833., 2014. doi:10.2217/nnm.13.167
324. Tsuji H., Ishizaka T., Porous biodegradable polyesters. II. Physical properties, morphology, and enzymatic and alkaline hydrolysis of porous poly(ϵ -caprolactone) films, *Journal of Applied Polymer Science* 80 (12), 2281-2291., 2001. doi:10.1002/app.1333
325. Tucker N., Stanger J.J., Staiger M.P., Razzaq H., Hofman K., The history of the science and technology of electrospinning from 1600 to 1995, *Journal of Engineered Fibers and Fabrics- Special Issue-Fibers* 7, 63-73., 2012.
326. Turkmen N., Sari F., Velioglu Y.S., The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables, *Food Chemistry* 93, 713-718., 2005. doi:10.1016/j.foodchem.2004.12.038
327. Vacanti J.P., Langer R., Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation, *The Lancet* 354 (Suppl 1), S32-S34., 1999. doi:10.1016/s0140-6736(99)90247-7
328. Vaidya S., Ganguli A.K., Microemulsion methods for synthesis of nanostructured materials. In *Comprehensive Nanoscience and Nanotechnology (Second Edition)*; Andrews, D. L.; Lipson, R. H.; Nann, T., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1-12., 2019.
329. Van Natta F.J., Hill J.W., Carruthers W.H., Polymerization and ring formation, ϵ -caprolactone and its polymers, *Journal of the American Chemical Society* 56, 455-459., 1934. doi:10.1021/ja01317a053
330. Veras F.F., Roggia I., Pranke P., Pereira C.N., Brandelli A., Inhibition of filamentous fungi by ketoconazole-functionalized electrospun nanofibers, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 84, 70-76., 2016. doi:10.1016/j.ejps.2016.01.014
331. Veras F.F., Ritter A.C., Roggia I., Pranke P., Pereira C.N., Brandelli A., Natamycinloaded electrospun poly(ϵ -caprolactone) nanofibers as an innovative platform for antifungal applications, *SN Applied Sciences* 2, 1105., 2020. doi:10.1007/s42452-020-2912-z
332. Vercaigne L.M., Sitar D.S., Penner S.B., Bernstein K., Wang G.Q., Burczynski F.J., Antibiotic-heparin lock: *In vitro* antibiotic stability combined with heparin in a central venous catheter, *Pharmacotherapy* 20 (4), 394-399., 2000. doi:10.1592/phco.20.5.394.35063
333. Wagenlehner F.M.E., Naber K.G., Treatment of bacterial urinary tract infections: Presence and future, *European Urology* 49 (2), 235-244., 2006. doi:10.1016/j.eururo.2005.12.017
334. Wagner F.E., Haslbeck S., Stievano L., Calogero S., Pankhurst Q.A., Martinek K.-P., Before striking gold in gold-ruby glass, *Nature* 407, 691-692., 2000. doi:10.1038/35037661
335. Wang L., Zhou H., Wang X., Mi J., Mechanism of bubble nucleation in poly(ϵ -caprolactone) foaming at low temperature, *Polymer* 79, 47-55., 2015. doi:10.1016/j.polymer.2015.10.012

336. Wang X., Um I.C., Fang D., Okamoto A., Hsiao B.S., Chu B., Formation of water-resistant hyaluronic acid nanofibers by blowing-assisted electro-spinning and non-toxic post treatments, *Polymer* 46 (13), 4853-4867., 2005. doi:10.1016/j.polymer.2005.03.058
337. Wang J., Tian L.L., He L.M., Chen N., Ramakrishna S., So K.F., Mo X.M., Lycium barbarum polysaccharide encapsulated poly lactic-co-glycolic acid nanofibers: cost-effective herbal medicine for potential application in peripheral nerve tissue engineering, *Scientific Reports* 8, 8669., 2018. doi:10.1038/s41598-018-26837-z
338. Wang K., Amin K., An Z., Cai Z., Chen H., Chen H. et al., Advanced functional polymer materials, *Materials Chemistry Frontiers* 4 (7), 1803-1915., 2020. doi:10.1039/d0qm00025f
339. Wang S., Lu L., Wang C., Gao C., Wang X., Polymeric biomaterials for tissue engineering applications 2011, *International Journal of Polymer Science* 2011, 180-250., 2011. doi:10.1155/2011/184623.
340. Warren J.W., Catheter-associated urinary tract infections, *Infectious Disease Clinics of North America* 11 (3) 609-622., 1997. doi:10.1016/s0891-5520(05)70376-7
341. Wasserman E., Taljaard J., Update on infections caused by *Staphylococcus aureus*, *Southern African Journal of Epidemiology and Infection* 26 (2), 60-64., 2011. doi:10.1080/10158782.2011.11441426
342. Weissig V., Pettinger T.K., Murdock N., Nanopharmaceuticals (part 1): Products on the market, *International Journal of Nanomedicine* 9, 4357-4373., 2014. doi: 10.2147/IJN.S46900
343. Werner I., Glasl S., Reznicek G., Infrared spectroscopy as a tool for chemotaxonomic investigations within the *Achillea millefolium* group, *Chemistry & Biodiversity* 3 (1), 27-33., 2006. doi: 10.1002/cbdv.200690003.
344. Woodruff M.A., Hutmacher D.W., The return of a forgotten polymer-Polycaprolactone in the 21st century, *Progress in Polymer Science* 35 (10), 1217-1256., 2010. doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002
345. Woodward S.C., Brewer P.S., Moatamed F., Schindler A., Pitt C.G., The intracellular degradation of poly(ϵ -caprolactone), *Journal of Biomedical Materials Research* 19 (4), 437-444., 1985. doi:10.1002/jbm.820190408
346. Wu J., Wang J., Zhang M., Solubility of cefazolin sodium pentahydrate in different solvents between 275 K and 310 K, *Journal of Chemical & Engineering Data* 50, 2026-2027., 2005. doi:10.1021/je050242k
347. Xie Z., Paras C.B., Weng H., Punnakitikashem P., Su L-C., Vu K., Tang L., Yang J., Nguyen K.T., Dual growth factor releasing multi-functional nanofibers for wound healing. *Acta Biomaterialia* 9 (12), 9351-9359., 2013. doi: 10.1016/j.actbio.2013.07.030
348. Xu R.D., Zhao H.L., Muhammad H., Dong M.D., Besenbacher F., Chen M.L., Dual-delivery of FGF-2/CTGF from Silk Fibroin/PLCL-PEO coaxial fibers enhances MSC proliferation and fibrogenesis, *Scientific Reports* 7, 8509., 2017. doi:10.1038/s41598-017-08226-0
349. Xue J., He M., Niu Y., Liu H., Crawford A., Coates P., Chen D., Shi R., Zhang L., Preparation and in vivo efficient anti-infection property of GTR/GBR implant made by metronidazole loaded electrospun polycaprolactone nanofiber membrane, *International Journal of Pharmaceutics* 475 (1-2), 566-577., 2014. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.09.026
350. Yan E., Jiang J., Yang X., Fan L., Wang Y., An Q., Zhang Z., Lu B., Wang D., Zhang D., pH-sensitive core-shell electrospun nanofibers based on polyvinyl alcohol/polycaprolactone as a potential drug delivery system for the chemotherapy against cervical cancer, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 55, 101455., 2020. doi:10.1016/j.jddst.2019.101455
351. Yang Q., Li Z., Hong Y., Zhao Y., Qiu S., Wang C., Wei Y., Influence of solvents on the formation of ultrathin uniform poly(vinyl pyrrolidone) nanofibers with electrospinning,

- Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 42 (20), 3721-3726., 2004. doi:10.1002/polb.20222
352. Yang Y., Zhu X., Cui W., Li X., Jin Y., Electrospun composite mats of poly [(d,l-lactide)-co-glycolide] and collagen with high porosity as potential scaffolds for skin tissue engineering, *Macromolecular Materials and Engineering* 294 (9), 611-619., 2009. doi:10.1002/mame.200900052
353. Yassim M.A., Elkhooly T.A., Elsherbiny S.M., Reicha F.M., Shokeir A.A., Facile coating of urinary catheter with bio-inspired antibacterial coating, *Heliyon* 5 (12), e02986., 2019. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02986
354. Ye W.P., Du F.S., Jin W.H., Yang J.Y., Xu Y., *In vitro* degradation of poly(caprolactone), poly(lactide) and their block copolymers: influence of composition, temperature and morphology, *Reactive and Functional Polymers* 32 (2), 161-168., 1997. doi:10.1016/s1381-5148(96)00081-8
355. Yuan X., Zhang Y., Dong C., Sheng J., Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning, *Polymer International* 53 (11), 1704-1710., 2004. doi:10.1002/pi.1538
356. Zare M., Ramakrishna S., Current progress of electrospun nanocarriers for drug delivery applications, *Proceedings* 4, 8790., 2020. doi:10.3390/IECP2020-08790
357. Zein I., Hutmacher D.W., Tan K.C., Teoh S.H., Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications, *Biomaterials* 23, 1169-1185., 2002. doi:10.1016/S0142-9612(01)00232-0
358. Zeng J., Haoqing H., Schaper A., Wendorf J.H., Greiner A., Poly-l-lactide nanofibers by electrospinning—Influence of solution viscosity and electrical conductivity on fiber diameter and fiber morphology, *e-Polymers* 3 (1), 102-110., 2003. doi:10.1515/epoly.2003.3.1.102
359. Zhang Q.W., Lin L.G., Ye W.C., Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine-UK* 13, 2-26., 2018. doi:10.1186/s13020-018-0177-x
360. Zhang W., Aguila B., Ma S., Potential applications of functional porous organic polymer materials, *Journal of Materials Chemistry A* 5, 8795-8824. 2017. doi:10.1039/C6TA11168H
361. Zhang S., Liang X., Gadd G.M., Zhao Q., Superhydrophobic coatings for urinary catheters to delay bacterial biofilm formation and catheter-associated urinary tract infection, *ACS Applied Bio Materials* 3 (1), 282-291., 2020. doi:10.1021/acsabm.9b00814
362. Zhao F., Shi Y., Pan L., Yu G., Multifunctional nanostructured conductive polymer gels: synthesis, properties, and applications, *Accounts of Chemical Research* 50, 1734-1743., 2017. doi:10.1021/acs.accounts.7b00191
363. Zhao S., Wu X., Wang L., Huang Y., Electrospinning of ethyl-cyanoethyl cellulose/tetrahydrofuran solutions. *Journal of Applied Polymer Science* 91 (1), 242-246., 2004. doi:10.1002/app.13196
364. Zong X., Kim K., Fang D., Ran S., Hsiao B.S., Chu B., Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes, *Polymer* 43, 4403-4412., 2002. doi:10.1016/S0032-3861(02)00275-6
365. Zupančič Š., Sinha-Ray S., Sinha-Ray S., Kristl J., Yarin A.L., Long-term sustained ciprofloxacin release from PMMA and hydrophilic polymer blended nanofibers, *Molecular Pharmaceutics* 13 (1), 295-305., 2016. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00804

BIOGRAFIJA AUTORA

Anđela (Nebojša) Radisavljević, diplomirani inženjer tehnologije, rođena je 29.07.1985. godine u Valjevu. Osnovnu i srednju školu završila je u Ljigu. Studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Farmaceutsko inženjerstvo, završila je 2013. godine sa prosečnom ocenom 8,00, dok je diplomski rad odbranila na Katedri za konstrukcije i specijalne materijale sa ocenom 10. Školske 2013/2014. god. upisala je doktorske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu, smer Inženjerstvo materijala, odslušala predmete predviđene planom i programom doktorskih studija i položila ispite sa prosečnom ocenom 9,75.

Od februara 2015. godine angažovana je na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije TR 34011 „Razvoj opreme i procesa dobijanja polimernih kompozitnih materijala sa unapred definisanim funkcionalnim svojstvima”. Zaposlena je u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu u zvanju istraživač saradnik. Usmerila je svoj naučnoistraživački rad u oblasti: Procesiranje i karakterizacija polimernih biomaterijala.

Koautor je šest radova, od kojih je jedan u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), tri u istaknutom međunarodnom časopisu (M22) i dva u međunarodnom časopisu (M23), osam saopštenja sa međunarodnog skupa (M34), jednog saopštenja sa skupa nacionalnog značaja (M64) i dva nova tehnička rešenja primenjena na nacionalnom nivou (M82). Ukupan broj citata naučnih radova iznosi 48. Hiršov indeks (h-indeks) je $h = 3$.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Анђела Н. Радисављевић
Број индекса 4032/2013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом
Процесирање и карактеризација полимерних нановлакана са антимицробним
ефектом за превенцију инфекција изазваних катетеризацијом уринарног тракта

- 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, 23.06.2022.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Анђела Н. Радисављевић
Број индекса 4032/2013
Студијски програм Инжењерство материјала
Наслов рада Процесирање и карактеризација полимерних нановлакана са антимикуробним ефектом за превенцију инфекција изазваних катетеризацијом уринарног тракта
Ментор др Петар Ускоковић, ред. проф.; др Мирјана Рајилић-Стојановић, ван. проф. Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

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, 23.06.2022.

Изјава о коришћењу

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

Процесирање и карактеризација полимерних нановлакана са антимицробним ефектом за превенцију инфекција изазваних катетеризацијом уринарног тракта 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, 23.06.2022.

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.

Ocena izveštaja o proveru originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije „Procesiranje i karakterizacija polimernih nanovlakana sa antimikrobnim efektom za prevenciju infekcija izazvanih kateterizacijom urinarnog trakta“, autora Anđele N. Radisavljević, konstatujemo da utvrđeno podudaranje teksta iznosi 11 %. Ovaj stepen podudarnosti posledica je citata, ličnih imena, opštih mesta i podataka, kao i prethodno publikovanih rezultata istraživanja Anđele Radisavljević, koji su proistekli iz njene disertacije, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika. Na osnovu svega iznetog, a u skladu sa članom 8. stav 2. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu, izjavljujemo da izveštaj ukazuje na originalnost doktorske disertacije, te se propisani postupak pripreme za njenu odbranu može nastaviti.

Mentori:

dr Petar Uskoković, red. prof.
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-
metalurški fakultet

dr Mirjana Rajilić-Stojanović, van. prof.
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-
metalurški fakultet

Beograd, 23.06.2022.