



Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer

## **ORALNO DOVAJANJE INZULINA – MIT ALI UPANJE ZA DIABETIKE?**

Področje: interdisciplinarno (kemijska tehnologija, farmacija)

Avtorja:

Timotej Pukšič, Brina Godec

Mentorice:

Mateja Godec, prof., dr. Milica Pantić in dr. Gabrijela Horvat

Ljutomer, februar 2020

## **ZAHVALA**

Zahvaljujema se mentoricama dr. Milici Pantić, dr. Gabrijeli Horvat, in Mateji Godec za pomoč pri izvedbi eksperimentov in meritev ter pisanju raziskovalne naloge.

Prav tako se zahvaljujema Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo univerze v Mariboru, ki nama je za raziskovalne namene omogočila uporabo laboratorijev in priskrbela potrebne materiale.

## **UPORABLJENE KRAJŠAVE**

DSC – diferencialna vrstična kalorimetrija

FTIR – Fourierjeva transformacijska infrardeča spektroskopija

PBS – phosphate-buffered saline (fosfatni pufer-simulacija pogojev v črevesju)

SCF – superkritični fluid

SGF – simulated gastric fluid (simulirana želodčna tekočina)

TGA – termogravimetrična analiza

USP – United States Pharmacopeia

EtOH – etanol

## POVZETEK

Pripravili smo alginatne aerogele s prevleko iz hitozana po postopku sol-gel sinteze in jih superkrično posušili. Na aerogele smo poskušali vezati inzulin z dvema metodama – z difuzijo z etanolom in s superkrično impregnacijo.

Aerogele smo testirali s pomočjo naprave USP 2 za in vitro sproščanje v SGF in PBS po standardih USP ter spremljali spreminjanje absorbance z UV spektrofotometrom.

Za karakterizacijo aerogelov smo uporabili FTIR, TGA/DSC in adsorpcijo dušika. Z uporabo FTIR-a smo želeli dokazati prisotnost inzulina v vzorcih. S TGA/DSC analizami smo določili stabilnost pripravljenih vzorcev ob povišanih temperaturah, z adsorpcijo dušika pa smo določili specifično površino vzorcem.

S pomočjo dobljenih rezultatov smo ugotavljali uporabnost in lastnosti aerogelov z inzulinom.

Cilj raziskovalne naloge je bil ugotoviti ali bi alginatni aerogel s prevleko iz hitozana zaščitil inzulin pred kislim pH želodca in se nato kontrolirano sproščal v črevesju.

Ključne besede: alginat, hitozan, aerogel, inzulin, sladkorna bolezen

## **ABSTRACT**

Within our research work, we synthesized alginate aerogels with chitosan coating using salt-gel synthesis and dried them supercritically. We tried to bind insulin to aerogels using two methods, namely diffusion of ethanol and supercritical impregnation.

Aerogels were tested by using a device named USP 2 for in vitro release in SGF and PBS according to USP standards, moreover absorbance changes were monitored using a spectrophotometer.

For aerogels characterisation we used FTIR, TGA/DSC and nitrogen adsorption. By using FTIR we tried to prove the presence of insulin in samples. TGA/DSC analyses enabled us to determine stability of prepared samples at increased temperatures, while nitrogen adsorption helped us identify specific surface area of samples.

Based on results obtained we aimed to establish usefulness and characteristics of aerogels with insulin.

The aim of this research work was to find out whether alginate aerogel with chitosan coating would protect insulin from acid pH of the stomach and afterwards release into intestine.

Key words: alginate, chitosan, aerogel, insulin, diabetes

## Kazalo vsebine

ZAHVALA.....	2
UPORABLJENE KRAJŠAVE.....	3
POVZETEK .....	4
ABSTRACT .....	5
1 UVOD .....	9
2 TEORETIČNI DEL .....	11
2.1 AEROGELI IN NJIHOVA SINTEZA.....	11
2.2 ALGINAT .....	12
2.3 HITOZAN .....	12
2.5 INZULIN .....	14
2.6 SLADKORNA BOLEZEN.....	16
2.7 KONTROLIRANO SPROŠČANJE .....	17
2.8 SUŠENJE MOKRIH GELOV.....	17
3 METODE DELA.....	18
3.1 SOL-GEL SINTEZA.....	18
3.2 SUPERKRITIČNO SUŠENJE S CO <sub>2</sub> .....	18
3.3 SUPERKRITIČNA IMPREGNACIJA .....	19
3.4 IN VITRO SPROŠČANJE .....	19
3.5 TGA IN DSC ANALIZA .....	20
3.6 FTIR ANALIZA .....	21
3.7 ADSORPCIJA DUŠIKA .....	21
4 UPORABLJENI MATERIALI IN LABORATORIJSKI INVENTAR.....	22
4.1 KEMIČALIJE .....	22
4.1.1 INZULIN .....	22
4.2 LABORATORIJSKI INVENTAR IN APARATURE .....	22
5 EKSPERIMENTALNI DEL .....	24
5.1 PREVERJANJE TOPNOSTI INZULINA.....	24
5.1.1 Priprava umeritvene krivulje topnosti inzulina v EtOH.....	25
5.2 PRIPRAVA ALGINATNIH AEROGELOV Z INZULINOM.....	25
5.4 PRIPRAVA PREVLEKE IZ HITOZANA.....	26

<b>5.5</b>	<b>SUPERKRITIČNO SUŠENJE .....</b>	<b>26</b>
<b>5.6</b>	<b>IN VITRO SPROŠČANJE .....</b>	<b>26</b>
<b>6</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>28</b>
<b>6.1</b>	<b>VEZAVA INZULINA Z DIFUZIJO Z ETANOLOM .....</b>	<b>28</b>
6.1.1	TGA/DSC.....	28
6.1.2	IN VITRO SPROŠČANJE.....	29
6.1.3	FTIR.....	30
6.1.4	ADSORPCIJA DUŠIKA .....	32
<b>6.2</b>	<b>VEZAVA INZULINA S SUPERKRITIČNO IMPREGNACIJO .....</b>	<b>32</b>
<b>7</b>	<b>ZAKLJUČEK.....</b>	<b>33</b>
<b>8</b>	<b>VIRI IN LITERATURA .....</b>	<b>35</b>
<b>8.1</b>	<b>VIRI SLIK.....</b>	<b>36</b>

## Kazalo slik

Slika 1: Aerogel .....	11
Slika 2: Strukturna formula alginata [4].....	12
Slika 3: Hitozan .....	13
Slika 4: Sproščanje inzulina v telesu .....	14
Slika 5: Inzulin .....	15
Slika 7: Sol-gel sinteza [1].....	18
Slika 8: Fazni diagram CO <sub>2</sub> [1] .....	19
Slika 9: Shema USP 2 naprave.....	20
Slika 10: UV spekter inzulina.....	24
Slika 11: Priprava raztopin .....	25
Slika 12: Alginatni aerogel in plast inzulina v EtOH.....	25
Slika 13: Mešanje raztopine hitozana.....	26
Slika 14: TGA/DSC krivulje za alginatne aerogele .....	28
Slika 15: FTIR spekter alginatnega aerogela z inzulinom in prevleko iz hitozana ....	30
Slika 16: FTIR spekter alginatnega aerogela s prevleko iz hitozana .....	30
Slika 17: FTIR spekter inzulina.....	31

## Kazalo tabel

Tabela 1: Rezultati in vitro sproščanja.....	29
Tabela 2: Primerjava specifičnih površin por v aerogelih .....	32



## 1 UVOD

Moja devet let stara sestra je pri treh letih zbolela za sladkorno boleznijo tipa 1, s tem se je zelo spremenilo življenje celotne družine. Ker njene beta celice trebušne slinavke ne proizvajajo več hormona inzulina, ki znižuje raven glukoze v krvi, mora doživljenjsko uporabljati inzulinsko črpalko, s katero si dovaja inzulin v telo. Cevko, po kateri teče inzulin in je povezana s črpalko, ima vstavljeno v podkožje. Le-to je potrebno menjati vsake tri dni oziroma bolj pogosto, ker se včasih zamaši. Kot posledica mnogih vbodov pri vstavljanju inzulinskega seta, je koža velikokrat razdražena, nastanejo tudi izpuščaji. Vstavljanje inzulinskega seta pa je tudi boleče, predvsem za majhne otroke. Prav tako pa ni najbolj enostavno vedno s seboj nositi inzulinsko črpalko. Oviro predstavlja pri športnih dejavnostih, kot je plavanje, ples, gimnastika, kolesarjenje in druge športne panoge. Moja sestra se zelo rada in veliko giba, kar je za uravnavanje sladkorja v krvi edino pravilno. Kadar se intenzivno ukvarja s telesnimi aktivnostmi, si mora črpalko izključiti in vnaprej poskrbeti za ustrezno količino inzulina. Strah jo je tudi, da bi si poškodovala inzulinsko črpalko. Zato me je vedno zanimalo, zakaj ne moremo v telo inzulina vnašati oralno. Največja prepreka pri tem je kisel pH v želodcu, ki izniči učinkovitost inzulina. Oralno vnašanje inzulina v telo ne le, da bi zmanjšalo te posledice mehanskih injektorjev, ampak bi tudi izboljšalo kvaliteto življenja sladkornih bolnikov.

Zaradi hitrega življenjskega ritma smo sladkorni bolniki tipa 2, ki v nekaterih primerih potrebuje zdravljenje z inzulinom, podvrženi veliko bolj, kot se tega zavedamo. Veliko stresa in nezdrav način prehranjevanja močno pospešita razvoj diabetesa, zato je tudi vedno več nedioagnosticiranih bolnikov. Trenutno živi vsak deseti Zemljan s sladkorno boleznijo, kar je 463 milijon bolnikov. Do leta 2035 bi naj število diagnosticiranih naraslo na 592 milijonov.

V lanskem šolskem letu smo raziskovali aerogele, ki veljajo za materiale prihodnosti. Kljub temu, da je na podlagi diabetesa vedno več raziskav, do sedaj ni bilo moč najti raziskave, ki bi povezovala materiale prihodnosti, aerogele in inzulin, hormon, ki je potreben za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 1 in tipa 2, ko je to potrebno. Zato se nam je zdelo zelo zanimivo raziskati, ali bi lahko z aerogelom ohranili učinkovitost inzulina pri prehodu skozi želodec. V mislih smo ves čas imeli mojo sestro in vse sladkorne bolnike, ki bi jim s tem olajšali vsakdan.

Postavili smo si naslednje hipoteze:

H1: Inzulin lahko v aerogel vnesemo z difuzijo v fazi priprave mokrega gela.

H2: Inzulin je možno vnesti v aerogel z impregnacijo s superkritičnim CO<sub>2</sub>.

H3: V kislem pH želodca se inzulin iz aerogela ne sprošča.

H4: Inzulin se v PBS sprošča kontrolirano.

## 2 TEORETIČNI DEL

### 2.1 AEROGELI IN NJIHOVA SINTEZA

Koloidne zmesi so zmesi, v katerih sta pomešani najmanj dve različni fazi. Če sta to tekoča in trdna faza, govorimo o soli. V kolikor sta pomešani s plinastimi delci, nastalo spojino imenujemo aerosol, to je v naravi na primer oblak. Kadar so tekoči koloidni delci raztopljeni v tekočem topilu, to imenujemo emulzija, praktičen primer tega je mleko.

S pomočjo koloidne snovi, natančneje soli, in takoimenovanim postopkom sol-gel sinteze nastane mokri gel iz katerega lahko nastane aerogel [1].

Aerogel je material v trdnem agregatnem stanju z izredno nizko maso, visoko specifično površino ter odprto porozno strukturo, ki pripomoreta k boljši vezavi večje količine aktivnih učinkovin.

Aerogel so prvič pripravili leta 1931. Velja za enega najbolj edinstvenih materialov na svetu in je zaradi svojih izjemnih lastnosti uvrščen tudi v Guinnessovo knjigo rekordov. Njegova slabost je ta, da je sinteza običajno dolgotrajna in draga [2].

Aerogel nastane iz mokrega gela, katerega topilo se nato nadomesti z zrakom, ki lahko predstavlja več kot 90 % snovi. Aerogeli so dobri izolacijski materiali, zato so uporabni tudi v gradbeništvu, imajo najnižjo toplotno prevodnost in najmanjšo gostoto med trdnimi materiali.

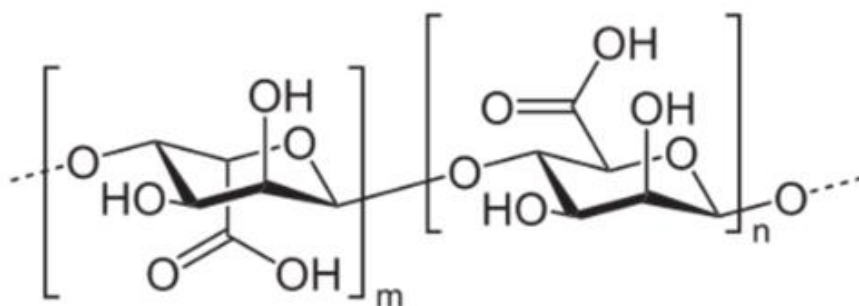
Aerogeli so lahko pripravljene iz različnih materialov, glavna lastnost materiala mora biti le sposobnost geliranja. Med anorganskimi aerogeli so najbolj znani silika aerogeli, ki so uporabni v gradbeništvu, med organskimi aerogeli pa se v zadnjem času veliko raziskav posveča polisaharidnim aerogelom, predvsem za aplikacije v farmaciji, prehranski industriji in medicini [1].



Slika 1: Aerogel

## 2.2 ALGINAT

Alginat (Slika 2) je naravni polisaharid, ki ima sposobnost tvorbe gela. V naravi se nahaja v celični steni rjavih alg v obliki kalcijevih, natrijevih, barijevih, stroncijevih in magnezijevih soli, iz katerih ga tudi pridobivajo in je posledično tudi poceni [3]. Alginat je nestrupena biorazgradljiva in biokompatibilna snov, je bele do rumeno-rjave barve in ga lahko najdemo v obliki vlaken, zrn ali prahu. Njegova molekulska formula je  $(C_6H_{12}O_6)_n$ , molekulska masa pa znaša od 10.000 do 600.000 g/mol [4].



Slika 2: Strukturna formula alginata [4]

Alginat je linearen, nerazvejan polisaharid sestavljen iz monomernih enot  $\beta$ -D-manuronske (poli-M odseki) in  $\alpha$ -L-guluronske kisline (poli-G odseki), ki sta povezani z 1,4 glikozidno vezjo. Delno se uporablja v prehrabeni industriji (okoli 30 % proizvedenega alginata), ostalo pa za farmacevtske in dentalne aplikacije ter na področju priprave funkcionalnih materialov za oskrbo ran.

Uporaben je tudi zaradi sposobnosti geliranja, ki je mogoče pri nizkem pH s pomočjo vodikovih vezi in interakcij med alginatom in dvo- oz. trivalentnimi ioni.

V telesu se alginat razgradi v debelem črevesju s pomočjo encimov [5][6].

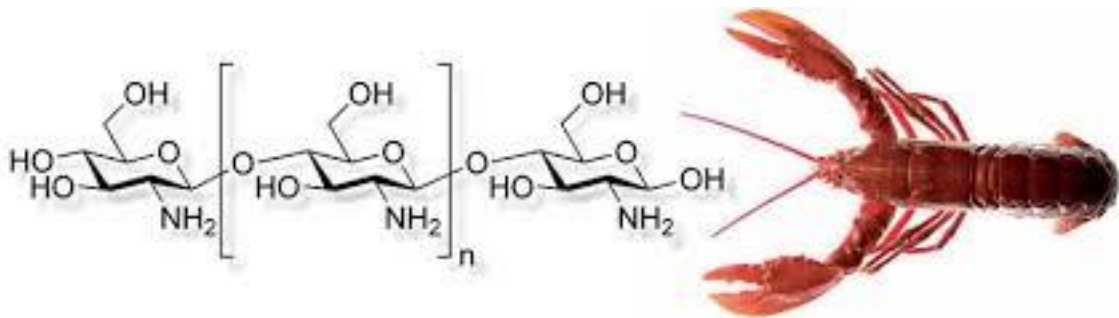
## 2.3 HITOZAN

Hitozan (Slika 3) je kationski polisaharid, sestavljen iz ponavljajočih se enot glukoze, ki ga pridobivajo iz hitina (predvsem oklepi rakov, rakovic, školjke) in je takoj za celulozo drugi najbolj razširjen biopolimer na Zemlji. Odkril ga je francoski kemik in farmacevt Henri Braconnot leta 1811. Ime hitozan se uporablja za več kot 70 % deacetilirane produkte hitina. Raztoplja se v nekaterih šibkih in močnih kislinah. Topnost je sicer odvisna od stopnje deacetilacije, porazdelitve acetilnih skupin v verigi, koncentracije ionov in molekulske mase [6] [7].

Kemijsko je hitozan zelo podoben celulozi, vendar poleg reaktivne hidroksilne ( $-OH$ ) skupine vsebuje tudi  $-NH_2$  skupino, ki vpliva na nekatere fizikalne in kemijske lastnosti hitozana. Signale  $-NH_2$  skupine lahko opazimo pri infrardeči spektroskopiji hitozana [8].

Hitozan se uporablja za izdelavo obličev, povojev in gaz ter športnih oblačil v obliki hitozanskih in hitinskih vlaken, ki imajo veliko specifično površino, sposobnost navzemanja vlage, protibakterijske lastnosti, ne povzročajo alergij in ne dražijo kože [6].

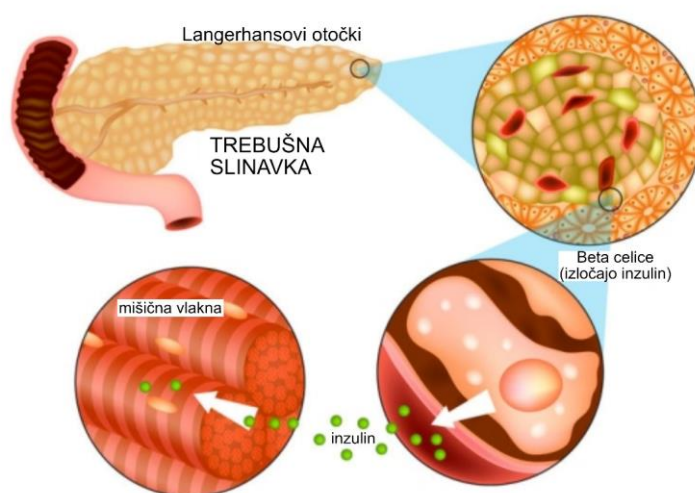
V farmacevtski industriji je uporaben zaradi svoje biorazgradljivosti, biokompatibilnosti in netoksičnosti. Uporablja se za umetne membrane ledvic, kot substrat pri presaditvah kože, oskrbi ran in za strjevanje krvi v medicini, kot dostavni sistem za učinkovine in gene v farmaciji, lahko pa bi se uporabljal tudi za cepiva, za pripravke za zniževanje holesterola in telesne teže. Zaradi svojih fizikalnih in kemijskih lastnosti je uporaben tudi za zaščito rastlin pred virusi in bakterijami, za čiščenje vode in v kozmetični industriji [9].



Slika 3: Hitozan

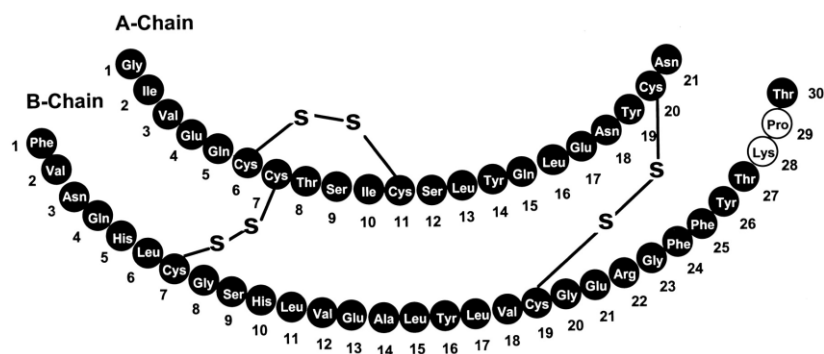
## 2.5 INZULIN

Inzulin (Slika 5) je hormon, ki uravnava nivo sladkorja v krvi. Proizvajajo ga beta celice Langerhansovih otočkov trebušne slinavke, ki so del endokrinega dela tega organa. Sprošča se, ko nivo sladkorja v krvi naraste in s tem skrbi za normo glikemijo. Je anabolni in antikatabolni hormon, ker skrbi za skladiščenje in zniževanje glukoze v krvi.



Slika 4: Sproščanje inzulina v telesu

Beljakovina je polipeptid zgrajen iz dveh verig, A veriga je zgrajena iz 21 aminokislin, B veriga pa iz 30; iz proinzulina, prohormonske molekule, ki je sestavljena iz 74 aminokislin. Proinzulin je razmeroma neaktiven in se v normalnih pogojih izloča v majhnih količinah. V endoplazemskem retikulumu beta celic se proinzulin cepi na dveh mestih, nastaneta A in B veriga ter biološko neaktiven C peptid. A in B verigi sta povezani z dvema disulfidnima vezema ( $—S—S—$ ). Proinzulin, inzulin in C peptid so shranjeni v granulah v beta celicah in se sproščajo ob dvigu glukoze v krvi [10].



Slika 5: Inzulin

Inzulin se kot zdravilo uporablja že od leta 1922. Najprej so ga pridobivali iz trebušnih slinavk živali, psov, goveda, svinj in ovac, vendar učinkovitost le-tega ni bila zadovoljiva. Danes so v uporabi inzulini, sintetizirani z gensko tehnologijo in se po sestavi ne razlikujejo od človeškega. Pridobivajo ga s posebnimi postopki, kjer ga na posebnih gojiščih proizvajajo bakterije in glive. Nastali inzulin potem prečistijo in pripravijo v določeni koncentraciji v posebni raztopini [11].

Hitro delujoči inzulin začne učinkovati približno 15 minut po injiciranju, vrh doseže v približno 1 uri in učinkuje približno od 2 do 4 ure. Med hitro delujoče inzuline spadajo analogi inzulina glulizin, lispro in aspart.

Kratko delujoči inzulin začne učinkovati v približno 30 minutah, vrh doseže po približno 2 do 3 urah in učinkuje približno od 3 do 6 ur. Med takšne inzuline spada sintetični človeški inzulin.

Srednje dolgo delujoči inzulin začne učinkovati v 2 do 4 urah, vrh doseže po 4 do 12 urah in učinkuje približno od 12 do 18 ur. Med takšne inzuline spada sintetični človeški inzulin s podaljšanim učinkovanjem.

Dolgo delujoči inzulin začne učinkovati več ur po injiciranju, ima majhen vrh ali ga sploh nima in učinkuje 24 ur. Med takšne inzuline uvrščamo inzuline detemir, glargin in degludec.

Mešani (bifazični) inzulin združuje hitro delujoči in srednje dolgo delujoči inzulin v enem pripravku. Na voljo so različne oblike z različnima stalnima količinama obeh vrst inzulina. Uporaba mešanega inzulina je lahko bolj praktična in lahko zmanjša možnost napak pri odmerjanju, vendar pa mešani inzulini ne omogočajo enake prožnosti zdravljenja kot uporaba dveh ločenih vrst inzulina [12].

Trenutno se inzulin v telo sladkornega bolnika vnaša z mehanskimi injektorji neposredno v podkožje. Ne le, da imajo s tem bolniki veliko dela in da morajo biti pri tem zelo pazljivi in paziti na higieno, lahko pride do različnih okužb in zamašitve inzulinskih setov. Prav zato bi bilo oralno vnašanje inzulina v telo sladkornih bolnikov veliko lažje in bi bila s tem izboljšana njihova kvaliteta življenja.

Inzulin gre po injiciranju v podkožje v krvni obtok in posledično pride do jeter. Oralno vnesen inzulin bi moral priti čez prebavni sistem, skozi črevesje bi se neposredno absorbiral v jetra, kjer poteka glikogeneza in se glukoza shranjuje v obliki glikogena. Ta pot bi bila zelo podobna tisti, kot pri zdravem človeku. Prav tako bi bila manjša možnost za hiperinzulinemijo, torej za preveliko količino inzulina prisotnega v telesu.

Največjo oviro za oralno vnašanje inzulina v telo predstavlja kisel pH v želodcu, ki inzulinu onemogoča delovanje, saj inzulin v kislem pH-ju izgubi učinkovitost.

Še ena izmed preprek je encimska degradacija, zaradi katere bi se inzulin razgradil tekom prebavne poti [13] [14] [15].

## 2.6 SLADKORNA BOLEZEN

Sladkorna bolezen ali diabetes je ena najbolj razširjenih kroničnih bolezni, število diagnosticiranih bolnikov pa iz leta v leto narašča. Mednarodna zveza za diabetes je izdala podatek, da ima sladkorno bolezen vsak deseti Zemljan, skupno več kot 425 milijonov ljudi. Z inzulinom se zdravi predvsem sladkorna bolezen tipa 1, vendar je tudi vedno več primerov tipa 2, ki zahteva zdravljenje z inzulinom.

Življenjsko pomembno je inzulin vnašati v telo pri sladkorni bolezni tipa 1, ker gre za propad beta celic trebušne slinavke in za popolno pomanjkanje inzulina. Ta tip diabetesa je avtoimunskega izvora, kar pomeni, da človeški imunski obrambni sistem prepozna beta celice kot lastnemu telesu tuje celice in jih napade in uniči kot druge tujke v telesu. Pri tipu 2 je potrebno zdravljenje z inzulinom, če pankreas ne zmore proizvajati zadostne količine inzulina. Zato se inzulin v obeh primerih v telo aplicira z mehanskimi injektorji [16].



## 2.7 KONTROLIRANO SPROŠČANJE

Sisteme za dostavo aktivnih učinkovin v telo delimo glede na način, kako se zdravilo sprošča:

- Zdravila s takojšnjim sproščanjem – zdravilo se sprosti v trenutku po uporabi.
- Zdravila s počasnim oz. podaljšanim sproščanjem – zdravilo se sprošča dlje časa na določenem mestu v telesu.

S kontroliranim oz. podaljšanim sproščanjem lahko nadzorujemo količino sproščene zdravila v telesu, saj se pri vsakodnevno rabljenih tabletah le-to največkrat sprosti zelo hitro. Prav zaradi tega farmacevtska industrija teži k razvoju novih produktov, ki bi z manjšim odmerkom zdravila podaljšali terapevtski učinek [17].

Da bi bilo sproščanje čim bolj učinkovito, želimo, da se aktivna učinkovina sprosti v tankem ali debelem črevesju, kjer pH znaša približno 6,8. Za to so najbolj primerni nosilci nekateri polisaharidni aerogeli, ki vzdržijo kisle pogoje v želodcu, kjer pH znaša približno 1,2. Mikroorganizmi v črevesju jih nato razgradijo, posledično pa se sprosti aktivna učinkovina [18].

## 2.8 SUŠENJE MOKRIH GELOV

Pri pripravi gelov ločimo tri vrste sušenja mokrih gelov. Prvo je sušenje na zraku, pri katerem dobimo t. i. kserogel. Tekoča faza se odstrani z izhlapevanjem ali izparevanjem, toda nastali produkt največkrat ni stabilen, med sušenjem se skrči, porozna struktura pa se poruši. Drugi način je sušenje z zamrzovanjem. Topilo kristalizira in ga nato odstranimo s sublimacijo. Dobljeni kriogel lahko ob nepravilni izvedbi spet preide v tekoče stanje. Prav tako se zaradi nastanka kristalov v porah gela struktura običajno povsem poruši.

Tretja metoda je sušenje s superkričnim CO<sub>2</sub>, pri čemer dobimo aerogel. Ker je sistem vedno v eni fazi, je krčenje minimalno, ohranimo pa največ lastnosti mokrega gela, predvsem nanostrukturo por. Topilo se pri tem načinu zamenja s superkričnim fluidom (SCF) in odstrani iz por. Po končani ekstrakciji topila iz mokrega gela s SCF, znižamo tlak in temperaturo pod kritično točko fluida, ki preide v plinasto stanje, ostane pa nam aerogel.

### 3 METODE DELA

#### 3.1 SOL-GEL SINTEZA

Aerogele pripravimo s t. i. sol-gel sintezo (Slika 7). Pri tem najprej pripravimo sol, nato pa trdni koloidi tvorijo tridimenzionalno mrežo ter tvorijo gel: hidrogel, če je topilo voda, in alkogel, če je topilo alkohol. Točka geliranja je trenutek, ko se tvori zadnja vez v molekuli. Da dobimo aerogel, sledi še postopek superkričnega sušenja s CO<sub>2</sub>, pri čemer odstranimo topilo. Nasprotno: s sušenjem pri atmosferskem tlaku, ko tekočina počasi izpareva, dobimo kserogele. Sol-gel sinteza producira izjemno čiste ter nove materiale, zato velja za zelo cenjeno in vsestransko metodo.

Metoda priprave polisaharidnih gelov ob prisotnosti organskega topila (etanola) in brez dodatka zamreževalcev oz. drugih kemikalij velja za atraktivno in hitro metodo priprave polisaharidnih aerogelov. Pri tej metodi polisaharid raztopimo v vodi, nato pa dodamo etanol. Etanol poviša hidrofobne interakcije v molekuli polisaharida in povzroči koagulacijo. Nastane stabilni gel, ki ga lahko superkrično sušimo [3].

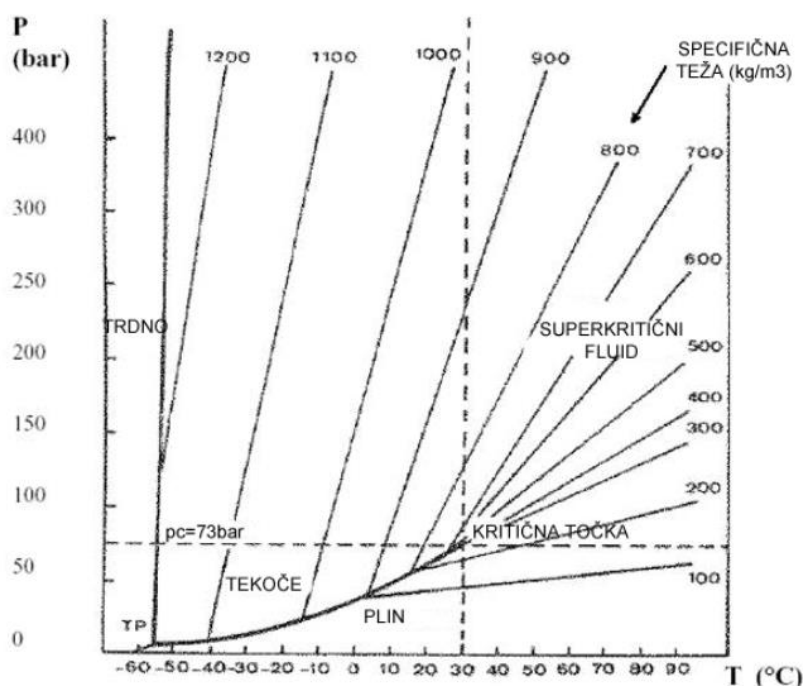


Slika 6: Sol-gel sinteza [1]

#### 3.2 SUPERKRITIČNO SUŠENJE S CO<sub>2</sub>

Da iz mokrega gela dobimo aerogel, uporabimo postopek superkričnega sušenja. Topilo (etanol), ki iz tablet izpodrine vodo, se pri sušenju zamenja s superkričnim fluidom (SCF) – CO<sub>2</sub>. Ta nastane pod posebnimi pogoji, 31 °C in 73 barov (Slika 8). Po končani 4-5 urni ekstrakciji topila iz mokrega gela s SCF, znižanju tlaka in temperature pod kritično točko fluida, ki preide v plinasto stanje, nastane aerogel. Tako nastanejo suhe tablete, ki so veliko bolj obstojne.

SCF so vse spojine, ki imajo tlak in temperaturo nad mejnimi vrednostmi (kritično točko), kjer združujejo lastnosti plinov in tekočin. Največkrat v tej obliki uporabljamo H<sub>2</sub>O in CO<sub>2</sub>, za sušenje aerogelov običajno uporabljamo CO<sub>2</sub>, saj je poceni, varen in kritično točko doseže zelo hitro, pri dokaj nizki temperaturi in tlaku.



Slika 7: Fazni diagram CO<sub>2</sub> [1]

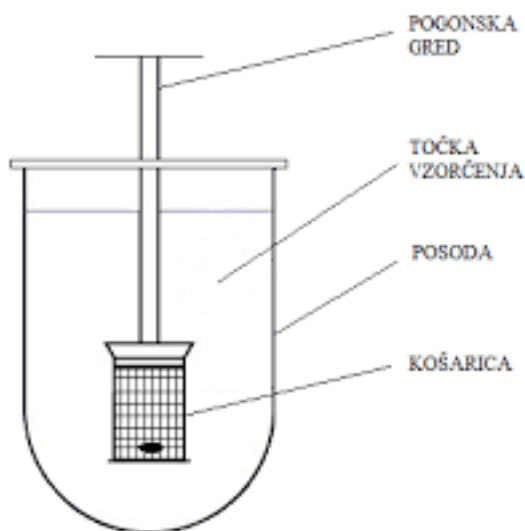
### 3.3 SUPERKRITIČNA IMPREGNACIJA

Z metodo superkritične impregnacije vnašamo aktivno učinkovino v dostavne sisteme. Pri tem uporabljamo CO<sub>2</sub> pri superkritičnih pogojih (100 barov in 40 °C), ki je netoksičen in neškodljiv za človeško telo. Impregnacija je uspešna, ko je učinkovina, ki jo vnašamo v sistem, topna v superkritičnem CO<sub>2</sub>. Impregnacija v aerogele poteka po postopku, da se najprej pripravijo aerogeli s superkritičnim sušenjem, nato pa se pripravljene aerogele ponovno izpostavijo superkritičnemu CO<sub>2</sub> skupaj z aktivno učinkovino [4].

### 3.4 IN VITRO SPROŠČANJE

Z in vitro testi preučujemo sproščanje zdravilne učinkovine in ocenimo njeno biološko uporabnost [1]. V posodo USP 2 naprave (Slika 9) nalijemo pripravljeno tekočino, ki simulira pogoje v želodcu oz. črevesju in vanjo dodamo željeno tableto, v našem primeru aerogel z inzulinom. Medtem, ko naprava meša vsebino, v določenih časovnih

razmikih odvzemamo vzorec in mu s spektrofotometrom merimo absorbanco ter tako ugotovimo, koliko učinkovine se je že sprostil.



Slika 8: Shema USP 2 naprave

### 3.5 TGA IN DSC ANALIZA

Pri TGA (termogravimetrični analizi) ter pri diferencialni vrstični kalorimetriji (DSC) segrevamo snov in merimo maso snovi v odvisnosti od časa in/ali temperature pri kontroliranem segrevanju v kontrolirani atmosferi. Tako lahko natančno določimo, pri kateri temperaturi in s kakšno hitrostjo snov razpade oz. pri kateri temperaturi preučevana snov začne reagirati (taliti, goreti, sublimirati, izparevati ...).

Spremembe se kažejo kot odstopanja na linearnem grafičnem prikazu, ki ga opazujemo s pomočjo računalniškega programa. Aparatura za TGA/DSC analizo vsebuje celico, ki se postopoma segreva, v njej pa je tudi senzor, ki meri maso lončka, v kateri je preiskovana snov in jo primerja z maso praznega lončka.

Meritev je mogoča v temperaturnem razponu od 25 °C do 1600 °C pri različnih pogojih. Kot inertna atmosfera, ki na kemijske procese ne vpliva, se uporablja dušik, za oksidativne procese pa se uporabljata zrak in kisik [19].

Snov lahko segrevamo z višanjem temperature pri željeni hitrosti ali vzdržujemo konstantno temperaturo med celotnim procesom [20].

### 3.6 FTIR ANALIZA

Metoda FTIR (ang. Fourier-transform infrared spectroscopy – Fourierjeva transformacijska infrardeča spektroskopija) temelji na interakciji in absorpciji infrardeče svetlobe v primerjavi z naravnimi nihanjem ter rotacijami molekul. Na podlagi ustvarjenih frekvenc lahko identificiramo molekulo oz. funkcionalne skupine in vezi v vzorcu, saj vsaka skupina proizvede lasten način vibriranja, po katerem jo prepoznamo, ne glede na to katero molekulo analiziramo. Metoda je namenjena tako kvalitativnemu kot kvantitativnemu preučevanju skupin.

Adsorpcijo valovanja izrazimo z valovnim številom, ki predstavlja število valov sevanja v dolžinski enoti. Ker imajo fotoni v infrardečem območju nižjo energijo kot v vidnem območju, molekula ne spremeni elektronskega stanja [21].

### 3.7 ADSORPCIJA DUŠIKA

Z adsorpcijo dušika določamo volumen, specifično površino, velikost por in adsorpcijsko izotermo. V prvem koraku iz por vzorca odstranimo zrak, v drugem pa jih napolnimo z dušikom, ki je v tekočem agregatnem stanju pri 78 K. Vrednosti dobimo s pomočjo računanja razlike med številom dovedenih molekul in adsorbiranih molekul dušika.

## 4 UPORABLJENI MATERIALI IN LABORATORIJSKI INVENTAR

### 4.1 KEMIKALIJE

Pri eksperimentalnem delu raziskovalne naloge smo uporabili:

- Etanol, absolutni, 100%, Lot: K50552317 837 (Merck)
- Hitozan, Lot: STBH0024 (Sigma Aldrich)
- Alginat, Lot: MKCF1224 (Sigma Aldrich)
- NaOH, p.a.  $\geq 98\%$ , Lot: SZBG2670H (Sigma Aldrich)
- CH<sub>3</sub>COOH, purity > 98% (Baker)

#### 4.1.1 INZULIN

- NovoRapid Penfill: inzulin aspart

En vložek vsebuje 3 ml, kar ustreza 300 enotam inzulina. 1 ml raztopine vsebuje 100 enot inzulina aspart (kar ustreza 3,5 mg), glicerol, fenol, metakrezol, cinkov klorid, natrijev hidrogenfosfat dihidrat, natrijev klorid, klorovodikovo kislino/natrijev hidroksid za uravnavanje pH in vodo za injekcije.

### 4.2 LABORATORIJSKI INVENTAR IN APARATURE

Pri eksperimentalnem delu raziskovalne naloge smo uporabili:

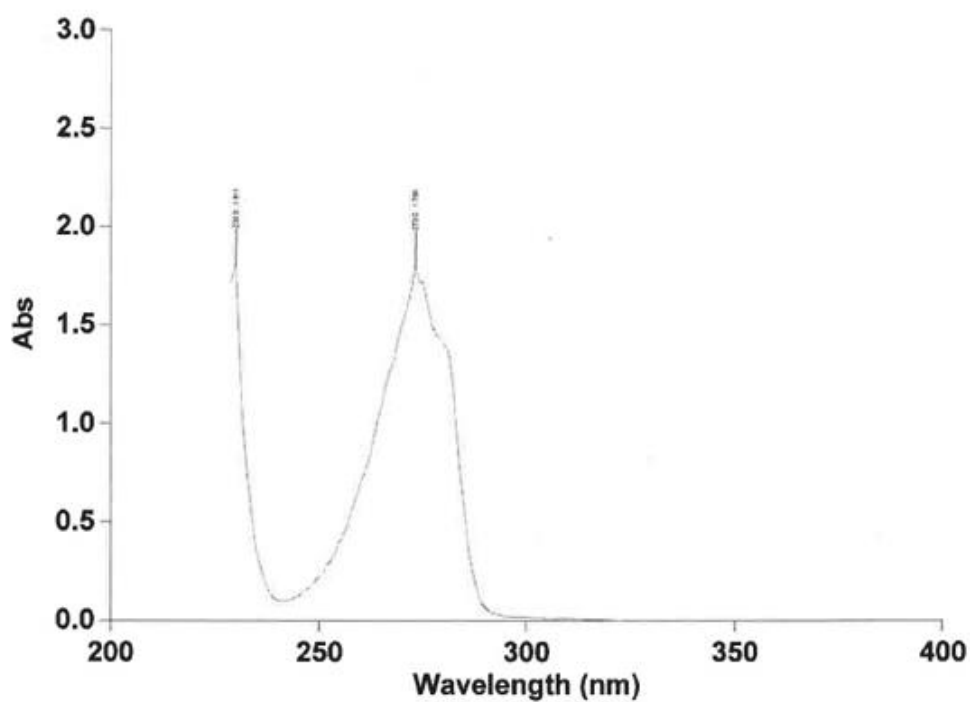
- merilne valje različnih velikosti
- kapalke
- petrijevke
- čaše različnih velikosti
- bučke različnih velikosti
- avtomatska pipeta
- 2 ml ročne brizge
- 0,45  $\mu\text{m}$  membranske PTFE filtre
- magnetni mešalnik
- napravo za superkritično sušenje z avtoklavom
- analizno tehtnico
- Farmameter USP 2 napravo za sproščanje aktivnih učinkovin
- UV spektrofotometer Varian

- Micromeritics ASAP 2020 napravo za določanje specifične površine z adsorpcijo dušika
- UV Cleaner Vevor

## 5 EKSPERIMENTALNI DEL

### 5.1 PREVERJANJE TOPNOSTI INZULINA

Najprej smo preverili topnost inzulina. Pripravili smo raztopini inzulina v vodi in etanolu (EtOH) ter ju homogenizirali na magnetnem mešalniku. Ugotovili smo, da se inzulini raztaplja v EtOH, v vodi pa ne. Izmerili smo absorbanco inzulina s spektrofotometrom in določili zanj značilen peak pri valovni dolžini 273 nm (Slika 10).



Slika 9: UV spekter inzulina



### 5.1.1 Priprava umeritvene krivulje topnosti inzulina v EtOH

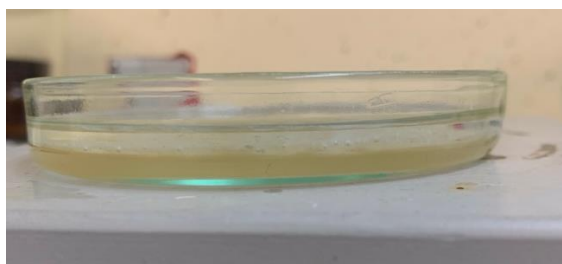
Pripravili smo tri raztopine inzulina v EtOH z različnimi koncentracijami (Slika 11). Raztopino, ki je imela koncentracijo 10 ml inzulina/L EtOH, smo razredčili na 5 in 1 ml inzulina/L EtOH. Nato smo vsem trem raztopinam izmerili absorbanco in iz dobljenih vrednosti narisali umeritveno krivuljo za topnost inzulina v EtOH.



Slika 10: Priprava raztopin

### 5.2 PRIPRAVA ALGINATNIH AEROGELOV Z INZULINOM

Pripravili smo 50 g 4 % raztopine alginata v vodi, jo eno uro homogenizirali na magnetnem mešalniku in v ultrazvočni kopeli odstranili zračne mehurčke. Raztopino smo nalili v dve petrijevki in prekrili z raztopino inzulina v EtOH, da smo sprožili tvorbo gela, pri čemer je inzulin prehajal v aerogel (Slika 12).

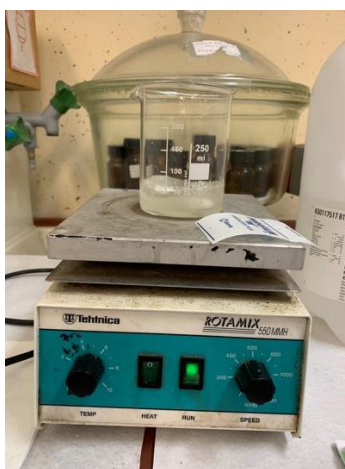


Slika 11: Alginatni aerogel in plast inzulina v EtOH

## 5.4 PRIPRAVA PREVLEKE IZ HITOZANA

Pripravljene aerogele smo prekrili s prevleko iz hitozana, ki smo jo pripravili po naslednjem postopku: 0,75 g hitozana smo raztopili v 0,6 g 0,2 M raztopine očetne kisline ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) in 48,65 g vode ter homogenizirali na magnetnem mešalniku (Slika 13). Očetno kislino smo uporabili, saj se hitozan raztaplja zgolj v kislem okolju, v nevtralnem pa ne.

Pripravili smo si še 2 M raztopino NaOH v EtOH. Nato smo pripravljeno alginatno tableto potopili v raztopino hitozana in takoj nato še v raztopino NaOH v EtOH, ki je sprožil geliranje hitozana. Po 15 min se je tvoril stabilni gel iz hitozana.



Slika 12: Mešanje raztopine hitozana

## 5.5 SUPERKRITIČNO SUŠENJE

Alginatni aerogel smo posušili s superkritičnim  $\text{CO}_2$  v napravi za superkritično sušenje z avtoklavom. Temperaturo v avtoklavu je bila okoli  $40\text{ }^\circ\text{C}$ , tlak pa 120 bar. Po 5 urah postopnega dodajanja  $\text{CO}_2$  se je postopek zaključil.

## 5.6 IN VITRO SPROŠČANJE

Alginatne aerogele z dodatkom inzulina in hitozansko prevleko smo testirali na napravi USP 2, v kateri smo pripravili simulacijo pogojev v želodcu in črevesju. Za SGF (ang. simulated gastric fluid oz. simulacijo želodčne tekočine) smo pripravili raztopino iz 8,3 ml HCl in 1 L  $\text{H}_2\text{O}$  s  $\text{pH}=1,2$ . Za simulacijo pogojev v črevesju smo pripravili PBS (ang. phosphate buffered saline – fosfatni pufer). Najprej smo raztopili 13,6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  v 500 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Raztopini v 2 L bučki smo dodali 224 ml 0,1M NaOH in dopolnili s  $\text{H}_2\text{O}$  do 2 L,  $\text{pH}$  nastale raztopine je tako znašal 6,8.

Najprej smo določili sproščanje v SGF. V dve posodi smo nalili po 900 ml SGF in v vsako dodali nekaj aerogelov, katerih masa je znašala 0,15 g. Temperaturala je znašala 37 °C, hitrost mešanja pa 50 obratov/min (rpm). Vzorčili smo po 5, 15, 30, 45, 60, 90 in 120 minutah. Odvzeli smo 2 ml vzorca, ki smo ga prefiltrirali skozi 0,45 µm PTFE membranski filter.

Po 120 minutah smo SGF zamenjali s PBS in nadaljevali postopek pri enakih pogojih. Vzorčili smo 2 ml vzorca prefiltriranega skozi 0,45 µm membranski filter po 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420 minutah in po 24 urah.

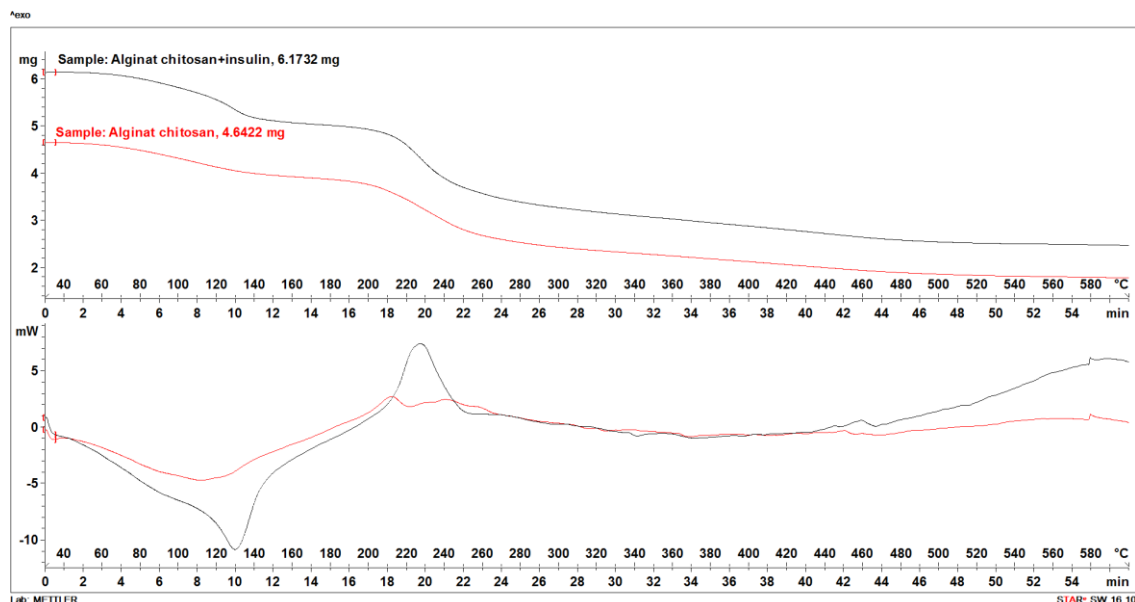
Po vsakem odvzemu vzorca smo odvzeto količino nadomestili s svežo raztopino SGF oz. PBS, torej se volumen raztopine za sproščanje ni spreminjal.

Posneli smo UV spekter insulina in določili njegov vrh pri 273 nm, zato smo odvzete vzorce po sproščanju analizirali na UV spektrofotometru pri 273 nm.

## 6 REZULTATI

### 6.1 VEZAVA INZULINA Z DIFUZIJO Z ETANOLOM

#### 6.1.1 TGA/DSC



Slika 13: TGA/DSC krivulje za alginatne aerogele

Vzorci smo analizirali s TGA/DSC metodo – segrevali smo jih do 600 °C in spremljali njihov razpad.

Krivulji prikazujeta razpad alginatnega aerogela z in brez insulina. Glede na primerjavo spodnjih dveh krivulj, ki prikazujeta rezultate DSC metode, lahko sklepamo, da je v aerogelu prisotno nekaj insulina. Zaznamo namreč zanj značilen peak, ki ga je verjetno povzročila kristalizacija.

### 6.1.2 IN VITRO SPROŠČANJE

S testi in vitro sproščanja smo želeli analizirati sproščanje inzulina iz aerogela v simuliranih pogojih želodca in črevesja. V tabeli 1 so prikazani rezultati.

<b>Pogoj</b>	<b>t/h</b>	<b>povprečna absorbanca</b>
SGF	0,08	0,0000
	0,25	0,0000
	0,5	0,0000
	1	0,0000
	1,5	0,0000
	2	0,0066
PBS	2,08	0,0013
	2,25	0,0046
	2,5	0,0033
	2,75	0,0023
	3	0,0042
	4	0,0059
	5	0,0056
	6	0,0000
	7	0,0039
	24	0,0063

Tabela 1: Rezultati in vitro sproščanja

Glede na rezultat TGA/DSC analize, ki dokazuje prisotnost inzulina v aerogelu in nično absorbanco v SGF sklepamo, da je inzulin zaščiten znotraj aerogela in se v kislem pH ne sprošča.

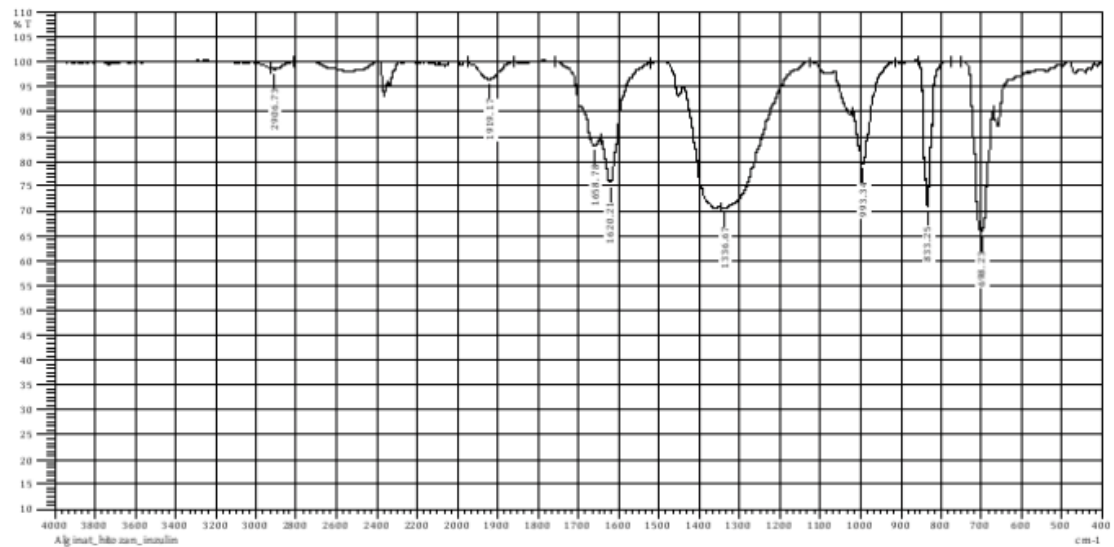
Iz rezultatov analize vzorcev na UV spektrofotometru, ki jih prikazuje tabela, smo ugotovili, da se je iz alginatnih aerogelov sprostila majhna količina inzulina. To dokazuje, da se je nekaj inzulina vezalo v aerogel z difuzijo z etanolom.

Učinkovina se ni sproščala kontrolirano, saj absorbanca s časom ne narašča.

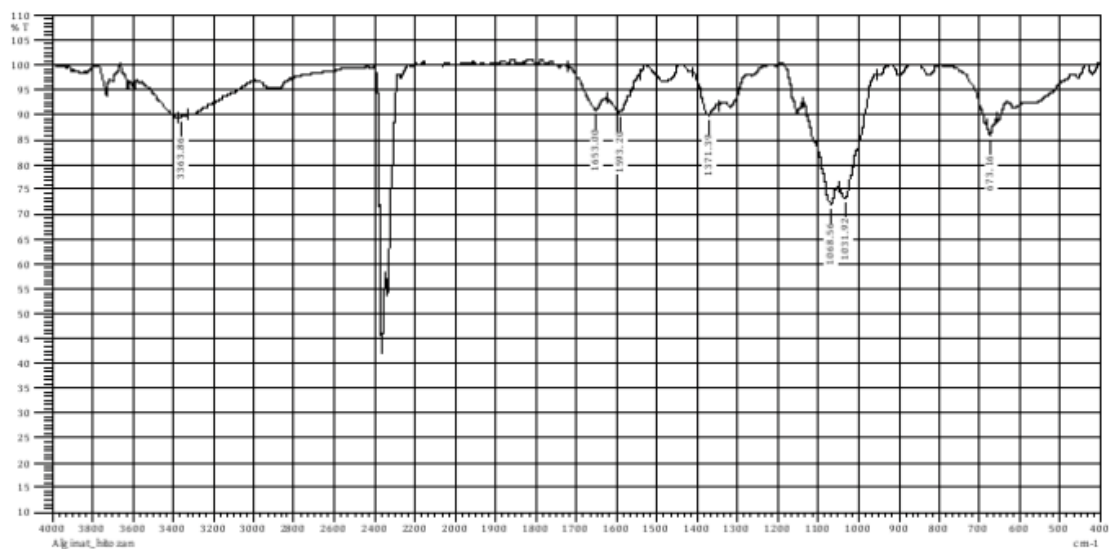
Ugotavljamo, da težave povzroča tudi detekcija inzulina v PBS in SGF. Z UV spektrofotometrijo nismo mogli natančno določiti absorbance v vzorcih, da bi lahko pripravili umeritveno krivuljo in izračunali koncentracijo sproščenega inzulina pri testih in vitro sproščanja. Zaradi tega ne moremo utemeljiti, če se je iz aerogelov sprostila

zadostna količina inzulina. UV spektrofotometrija torej ni dovolj natančna metoda za določitev koncentracije inzulina v vzorcu.

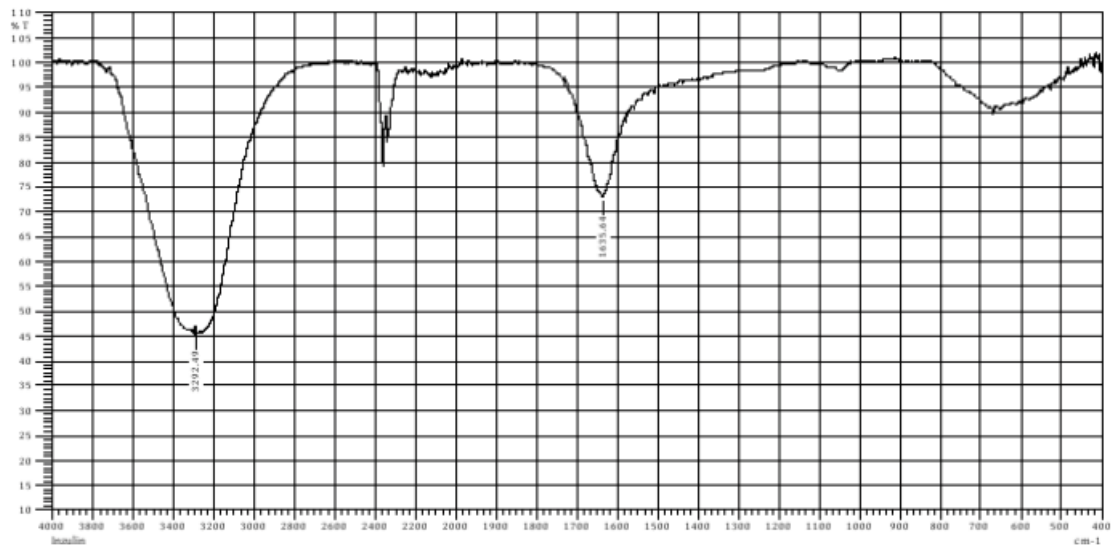
### 6.1.3 FTIR



Slika 14: FTIR spekter alginatnega aerogela z inulinom in prevleko iz hitozana



Slika 15: FTIR spekter alginatnega aerogela s prevleko iz hitozana



Slika 16: FTIR spekter inzulina

Slike 15, 16 in 17 prikazujejo FTIR spekter alginatnega aerogela z inulinom in prevleko iz hitozana, spekter alginatnega aerogela s prevleko iz hitozana ter spekter inzulina. Značilni peak inzulina se kaže pri 1630  $\text{cm}^{-1}$ , kar sovpada s peakom čistega aerogela.

#### 6.1.4 ADSORPCIJA DUŠIKA

vrsta aerogela	specifična površina
aerogel z inzulinom	91 m <sup>2</sup> /g
aerogel brez inzulina	193 m <sup>2</sup> /g

Tabela 2: Primerjava specifičnih površin por v aerogelih

Izvedli smo adsorpcijo dušika na napravi Micromeritics ASAP2020, s pomočjo tega pa smo izračunali specifično površino por v aerogelih. Specifična površina aerogela z inzulinom je nižja glede na specifično površino čistega aerogela. To dokazuje, da je inzulin zasedel določen volumen por, zaradi tega se je specifična površina znižala.

#### 6.2 VEZAVA INZULINA S SUPERKRITIČNO IMPREGNACIJO

Inzulin smo poskušali vezati v aerogele tudi s superkritično impregnacijo, vendar metoda ni bila uspešna. Inzulin je zelo slabo topen v superkritičnem CO<sub>2</sub>, zato so se pri postopku impregnacije aligatni aerogeli zgolj uničili.



## 7 ZAKLJUČEK

### **H1: Inzulin lahko v aerogel vnesemo z difuzijo v fazi priprave mokrega gela.**

Hipoteza je POTRJENA.

Hipotezo smo potrdili na podlagi primerjave rezultatov TGA/DSC analize, absorpcije dušika, FTIR analize in in vitro sproščanja .

Najprej smo dokazali topnost inzulina v etanolu z UV spektrofotometrijo, zato smo z difuzijo vnesli inzulin v alginatni aerogel.

Z različnimi analiznimi metodami smo karakterizirali aerogel in delno potrdili vsebnost le-tega v aerogelu.

S TGA/DSC analizo smo potrdili prisotnost inzulina v alginatnem aerogelu, saj smo na DSC krivulji zaznali karakteristični peak oziroma vrh inzulina, ki ga je verjetno povzročila kristalizacija.

S FTIR analizo je težko dokazati vsebnosti inzulina v aerogelu, saj se značilni peak inzulina kaže pri 1630  $\text{cm}^{-1}$ , kar sovpada s peakom čistega aerogela.

Z absorpcijo dušika smo izračunali specifično površino por v aerogelu in ugotovili, da je specifična površina por v aerogelu z dodanim inzulinom manjša, zato predvidevamo, da se je inzulin vezal v aerogel.

Tudi z rezultati in vitro sproščanja smo dokazali, da aerogel vsebuje inzulin, saj smo izmerili absorbanco pri zanj značilni valovni dolžini.

### **H2: Inzulin je možno vnesti v aerogel z impregnacijo s superkritičnim CO<sub>2</sub>.**

Hipoteza je OVRŽENA.

Inzulin smo poskušali v aerogel vnesti še s superkritično impregnacijo, vendar metoda ni bila uspešna, saj so se aerogeli pri metodi uničili. Sklepamo, da je do sledečega rezultata prišlo, ker je inzulin slabo topen v superkritičnem CO<sub>2</sub>.

### **H3: V kislem pH želodca se inzulin iz aerogela ne sprošča**

Hipoteza je DELNO POTRJENA.

S TGA/DSC analizo smo potrdili prisotnost inzulina v aerogelu. Z in vitro testi sproščanja ga v SGF v kislem pH želodca nismo zaznali. To lahko pomeni, da se inzulin dejansko ni sproščal iz aerogela, ali pa ga UV ni zaznal.

### **H4: Inzulin se v PBS sprošča kontrolirano.**

Hipoteza je OVRŽENA.

Z UV spektrofotometrom smo sicer dokazali manjšo količino sproščenega inzulina, vendar se ves inzulin ni sprostil oziroma ga nismo mogli dokazati z UV spektrofotometrijo. Prav tako ne moremo potrditi, da se je inzulin sproščal kontrolirano.

Skozi raziskovalno nalogo smo želeli vnesti inzulin v alginatne aerogele in jih dodatno zaščititi s hitozanom. Cilj naloge je bil zaščititi inzulin pred sproščanjem v kislem pH želodca in sprožiti njegovo sproščanje v bazičnem pH črevesja. Uspešno smo pripravili alginatne aerogele s hitozansko prevleko, v katere smo z difuzijo z etanolom uspešno vnesli inzulin. Različne karakteristične metode so nam potrdile prisotnost inzulina po superkritičnem sušenju. Da bi preverili sproščanje inzulina v telesu smo se odločili za USP2 napravo. Po opravljenih meritvah lahko zaključimo, da in-vitro testi sproščanja po USP2 metodi niso optimalni. V prihodnje bi tako morali preizkusiti druge metode sproščanja, da bi tako ugotovili profil sproščanja inzulina iz aerogelov. Ena takih metod bi bila mikro-BCA metoda za analizo proteinov. V nadaljevanju raziskav bi poizkusili še z vezavo večje količine inzulina, na aerogele bi vezali čisti inzulin skupaj z antiproteolitskimi encimi.

## 8 VIRI IN LITERATURA

- [1] G. Tkalec, *Priprava pektinskih aerogelov za oralno dostavo aktivnih učinkovin*. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2013.
- [2] H. Quinlan, "How Aerogels Work," 2010. [Online]. Available: <https://science.howstuffworks.com/aerogel.htm>. [Accessed: 11-Oct-2018].
- [3] G. Horvat, *Formation, Characterization and Application of Polysaccharide Aerogels*. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2013.
- [4] M. Pantić, *High Preassure Impregnations of Fat-soluble Vitamins into Polysaccharide Aerogels*. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2017.
- [5] P. Novak, M. Bogataj, and A. Mrhar, "Alginat v dostavnih sistemih s prirejenim sproščanjem," *Farmacevtski vestnik*, Ljubljana, 2008.
- [6] M. Golčer, *Funkcionalizacija celuloznih vlaken s formulacijo eugenola in hitozana v različnih strukturnih oblikah*. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2015.
- [7] M. Žižek, *Analiza sistemov za dostavo zdravilnih učinkovin iz medicinskih implantatov*. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2016.
- [8] M. Munda, *Elementarna karakterizacija funkcionaliziranih vlaken*. Maribor: Fakulteta za strojništvo, 2011.
- [9] M. Kolar, *Izdelava in karakterizacija hitozanskih nanodelcev za medicinsko uporabo*. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2010.
- [10] R. Utiger, "Insulin," 2019. [Online]. Available: <https://www.britannica.com/science/insulin>. [Accessed: 23-Dec-2019].
- [11] T. Logar Dolinšek, *Sladkorčki, Vse, kar ste želeli vedeti o sladkorni bolezni*. Ljubljana: Društvo za pomoč otrokom s presnovnimi motnjami, 2012.
- [12] "Vrste inzulinov." [Online]. Available: <https://sladkorna.si/inzulin-in-zdravila/vrste-inzulinov/>. [Accessed: 20-Dec-2019].
- [13] L. Heinemann and Y. Jacques, *Oral Insulin and Buccal Insulin: A Critical Reappraisal*. Diabetes Technology Society, 2009.
- [14] K. Wonderly, "Could Oral Insulin Be an Option Some Day?," 2016. [Online]. Available: <https://www.healthline.com/health/type-2-diabetes/oral-insulin>. [Accessed: 20-Dec-2019].
- [15] *Oral insulin delivery - challenges and strategies*. Elsevier, 2014.

- [16] J. Norman, "What is Type 1 Diabetes?" [Online]. Available: <https://www.endocrineweb.com/conditions/type-1-diabetes/type-1-diabetes>. [Accessed: 25-Feb-2020].
- [17] M. Gračnar, *Polisaharidni aerogeli za izboljšanje biodostopnosti v vodi slabo topnih substanc*. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2015.
- [18] M. Štumpf, *Priprava biorazgradljivih aerogelov za potencialne farmacevtske aplikacije*. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2014.
- [19] T. Prša, *Sinteza in lastnosti magnetnih tekočin na osnovi maghemita ( $\gamma$  - Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) oblečenega z cm – dekstranom*. Maribor: Fakulteta za naravoslovje in matematiko, 2009.
- [20] S. Colarič, *Hidrotermalna sinteza barijevega heksaferita v prisotnosti oleinske kisline*. Maribor: Fakulteta za naravoslovje in matematiko, 2009.
- [21] G. Rep, "Infrardeči spektrofotometer (FTIR)." [Online]. Available: [http://les.bf.uni-lj.si/fileadmin/lesarstvo\\_skupno/Raziskovalna\\_oprema/Les\\_2008\\_05\\_FTIR\\_spektrofotometer.pdf](http://les.bf.uni-lj.si/fileadmin/lesarstvo_skupno/Raziskovalna_oprema/Les_2008_05_FTIR_spektrofotometer.pdf). [Accessed: 14-Jan-2019].

## 8.1 VIRI SLIK

Slika 1: <http://enviroform-insulation.com/product/aerogel-sheets/> (pridobljeno: 15.12.2018)

Slika 3: <https://zdravljeizkine.com/tag/tiens-hitozan/> (pridobljeno: 15. 12. 2018)

Slika 4: <https://pdb101.rcsb.org/global-health/diabetes-mellitus/drugs/insulin/insulin>

Slika 5: <https://www.endocrineweb.com/conditions/type-1-diabetes/type-1-diabetes>

Slika 9:

[http://www.ffa.unilj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/magistrske/2014/Velkavrh\\_Katja\\_mag\\_nal\\_2014.pdf](http://www.ffa.unilj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/magistrske/2014/Velkavrh_Katja_mag_nal_2014.pdf) (pridobljeno: 14. 1. 2019)