



»54. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2020«

UPORABA NANODELCEV CINKOVEGA OKSIDA V GELSKIH STRUKTURAH

Kemija ali kemijska tehnologija
Raziskovalna naloga

Avtorica:

Aleksandra Vujanović

Mentorja:

Gregor Kravanja

Darja Kravanja

II. gimnazija Maribor



Maribor, 2020

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	2
KAZALO SLIK	3
KAZALO TABEL	4
POVZETEK	5
ZAHVALA	6
UVOD	7
1 TEORETIČNO OZADJE	8
1.1 GELSKE STRUKTURE V BIOMEDICINI	8
1.2 HITOZAN	8
1.2.1 KEMIJSKE IN FIZIKALNE LASTNOSTI HITOZANA	10
1.3 POLIVINILPIROLIDON (PVP)	11
1.3.1 KEMIJSKE IN FIZIKALNE LASTNOSTI POLIVINIL PIROLIDONA (PVP)	12
1.4 KOVINSKI NANODELCI V GELSKIH STRUKTURAH	12
2 METODOLOGIJA	15
2.1 MATERIAL	15
2.2 PRIPRAVA GELSKIH STRUKTUR	15
2.3 VAKUUMSKO SUŠENJE Z ZAMRZOVANJEM	16
2.4 KARAKTERIZACIJA VEZAVE TEKOČINE	17
2.5 OKOLJSKI SKENIRAJOČ ELEKTRONSKI MIKROSKOP (ESEM)	17
2.6 FOURIERJEVA TRANFORMACIJSKA INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA (FTIR)	19
2.7 PROUČEVANJE ANTIMIKROBNOSTI GELSKIH STRUKTUR Z DISK DIFUZIJSKO METODO	20
3 REZULTATI	22
4 INTERPRETACIJA REZULTATOV	28
5 IZBOLJŠAVE	30
6 ZAKLJUČEK	30
7 DRUŽBENA ODGOVORNOST	32
8 VIRI IN LITERATURA	33

KAZALO SLIK

Slika 1: Kemijska formula hitina.....	9
Slika 2: Kemijska formula hitozana	10
Slika 3: Kemijska formula polivinilpirolidona	11
Slika 4: Shema antibakterijskega mehanizma kovinskih nanodelcev ter kovinskih oksidov nanodelcev	13
Slika 5: Komora za vakuumsko sušenje z zamrzovanjem.....	16
Slika 6: Okoljski vrstični elektronski mikroskop (ESEM).....	18
Slika 7: Vpetje vzorca v ESEM	19
Slika 8: Uporaba Fourierjeve transformacijske infrardeče spektroskopije (FTIR).....	20
Slika 9: Plošče z agarjem pred nanosom vzorcev gelskih struktur	21
Slika 10: Inkubator	21
Slika 11: Nabrekanje (vezava vode) vzorcev različnih gelskih struktur	22
Slika 12: Mikrostruktura gelske strukture vidne z ESEM (80-kratna povečava)	24
Slika 13: Vezava Zn^{2+} ionov na gelsko strukturo (200-kratna povečava).....	25
Slika 14: Z metodo FTIR analiziran spekter gelske strukture brez dodanega n(ZnO) ..	26
Slika 15: Z metodo FTIR analiziran spekter gelske strukture z dodanim 0,05 % n(ZnO)	26
Slika 16: Določanje antimikrobnosti posameznih vzorcev gelskih struktur z disk difuzijsko metodo	27

KAZALO TABEL

Tabela 1: Masa vzorcev gelske strukture brez dodatka n(ZnO) po določenih časovnih intervalih	23
Tabela 2: Masa vzorcev gelske strukture z dodanim 0,01% n(ZnO) po določenih časovnih intervalih	23
Tabela 3: Masa vzorcev gelske strukture z dodanim 0,05% n(ZnO) po določenih časovnih intervalih	24
Tabela 4: Premer (mm) inhibicijske cone določenega vzorca gelske strukture pri določanju antimikrobnosti z disk difuzijsko metodo	27

POVZETEK

Pri raziskovalni nalogi smo sintetizirali biokompatibilne gelske strukture (hidrogele) in vanje vezali različne koncentracije nanodelcev cinkovega oksida, n(ZnO). Pridobljenim gelskim strukturam smo izmerili nabrekanje – količino vezane tekočine in proučevali mikrostrukturo z metodo ESEM. Analizirali smo tudi spektre z metodo FTIR ter preverjali antimikrobno delovanje na gram negativni bakteriji *Escherichia coli* z disk difuzijsko metodo. Ugotovili smo, da imajo vse sintetizirane gelske strukture zaradi porozne strukture visoko sposobnost vezave tekočine. Iz rezultatov mikroanalize predvidevamo, da je prišlo do vezave Zn^{2+} ionov na karboksimetilno skupino, ki je sestavni del gelske strukture. Z disk difuzijsko metodo smo potrdili, da gelske strukture z vezanim n(ZnO) delujejo inhibinatorsko proti bakteriji *Escherichia coli*. Ugotovili smo tudi, da z večanjem koncentracije n(ZnO) narašča antimikrobna učinkovitost.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju in mentorici za vso strokovno pomoč, čas in trud, ki sta ga posvečala med nastajanjem moje raziskovalne naloge.

Zahvaljujem se tudi Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru, da mi je omogočila izvajanje eksperimentalnega dela v svojem laboratoriju.

Zahvala gre tudi Fakulteti za strojništvo Univerze v Mariboru za uporabo ESEM metode.

Vljudno se zahvaljujem tudi svojemu profesorju slovenščine za lektoriranje raziskovalne naloge.

UVOD

Leta 1928 se je z odkritjem penicilina zelo povečala uporaba antibiotikov za doseganje ustreznega antibakterijskega učinka. Z razvojem javne higiene in biomedicinske tehnologije so z uporabo antibiotikov uspeli zatreti številne infekcije, kar je prispevalo k boljši kakovosti takratnega življenja. Kasneje je bilo ugotovljeno, da uporaba antibiotikov v določenih primerih lahko predstavlja težavo, saj lahko vodi do nastanka odpornosti mikroorganizmov na uporabljene antibiotike.

Zelo aktualne so tudi številne raziskave na področju biomedicine, ki nakazujejo na možno uporabo gelskih struktur v različne namene; med njimi je trenutno najbolj priljubljena uporaba teh kot alternative antibiotikom, prav tako naj bi bile primeren material za izdelavo obližev za oskrbo ran, izdelavo očesnih leč, v tkivnem inženirstvu itn.

V dosedanjih raziskavah so ugotovili, da imajo gelske strukture ali hidrogeli veliko dobrih lastnosti, zaradi katerih so vsestransko uporabne in predstavljajo enega izmed najpomembnejših materialov prihodnosti.

Namen raziskovalne naloge je sinteza biokompatibilnih gelskih struktur in vezava različnih koncentracij nanodelcev cinkovega oksida, $n(\text{ZnO})$ v gelske strukture. Cilji raziskovalne naloge so tudi izmeriti nabrekanje – količino vezane tekočine, proučiti mikrostrukturo gelskih struktur, analizirati spekter gelske strukture ter proučiti njihovo antimikrobno delovanje na bakteriji *Escherichia coli*, ki je zelo pogosto prisotna pri infekcijah v človeškem telesu.

Pred začetkom raziskovanja smo si zastavili nekaj hipotez:

H1: Gelske strukture z dodanim 0,05 % volumskim deležem $n(\text{ZnO})$ bodo imele večje nabrekanje kot druge gelske strukture.

H2: Zn^{2+} ioni se bodo vezali na gelsko strukturo.

H3: Graf spektra gelske strukture z dodanim 0,05 % $n(\text{ZnO})$, pridobljen z metodo FTIR, se bo razlikoval v več podrobnostih v primerjavi s grafom spektra gelske strukture brez dodanega $n(\text{ZnO})$.

H4: Gelske strukture z dodanim 0,05 % $n(\text{ZnO})$ bodo imele v primerjavi z drugimi gelskimi strukturami največjo antimikrobnost.

1 TEORETIČNO OZADJE

1.1 GELSKE STRUKTURE V BIOMEDICINI

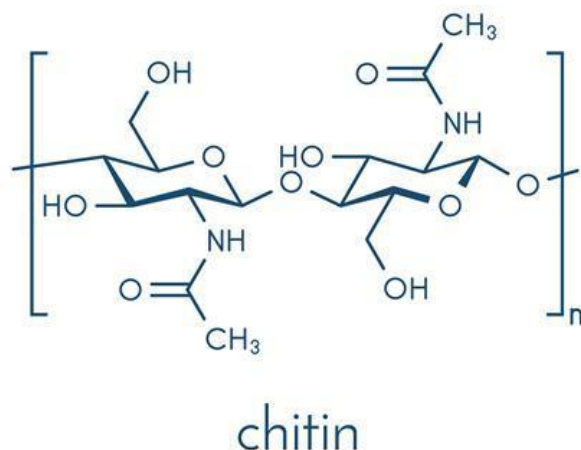
Gelske strukture imajo zelo dobro sposobnost nabrekanja, hkrati pa lahko imajo tudi antibakterijski učinek, zato jih uporabljajo v biomedicini. Raziskave kažejo, da so lahko gelske strukture dobra alternativa določenim spojinam, ki so trenutno v uporabi. Prednost uporabe gelskih struktur je tudi, da so izjemno biokompatibilne, biorazgradljive, porozne, hkrati pa imajo ustrezno mehansko moč. Gelske strukture se trenutno uporabljajo tudi v tkivnem inženirstvu, prav tako dosedanje raziskave kažejo na možnost uporabe gelskih struktur tudi kot samozdravilnih materialov, kot sredstvo za vnos zdravil v človeško telo ter kot biosenzorjev. Najbolj znana je uporaba gelskih struktur za izdelavo očesnih leč, higienskih izdelkov, v sistemih za dostavo spojin v telo, za obvezovanje ran ter v tkivnem inženirstvu (CALO, 2015).

Kljub vsem dobrim lastnostim, je uporaba še vedno omejena, ker imajo gelske strukture preveč krhko strukturo ter nekoliko preslabo mehansko moč (CHAI et al, 2017).

Namesto naravno pridobljenih gelskih struktur ponekod še vedno uporabljajo sintetične hidrogelne, saj imajo v primerjavi z naravnimi daljšo življenjsko dobo, absorbirajo več vode iz vodnega medija ter imajo večjo mehansko moč (CHAI et al, 2017).

1.2 HITOZAN

Hitozan je eden izmed naravnih polimerov. Pridobivamo ga iz hitina, ki je celulozi podoben ogljikov hidrat in je tudi sestavni del eksoskeleta lupinarjev (školjk, rakov itn.). Letno bi lahko pridobili približno 50000 ton hitina iz letne svetovne količine školjk ter rakov (KAISERBERGER, 2010).



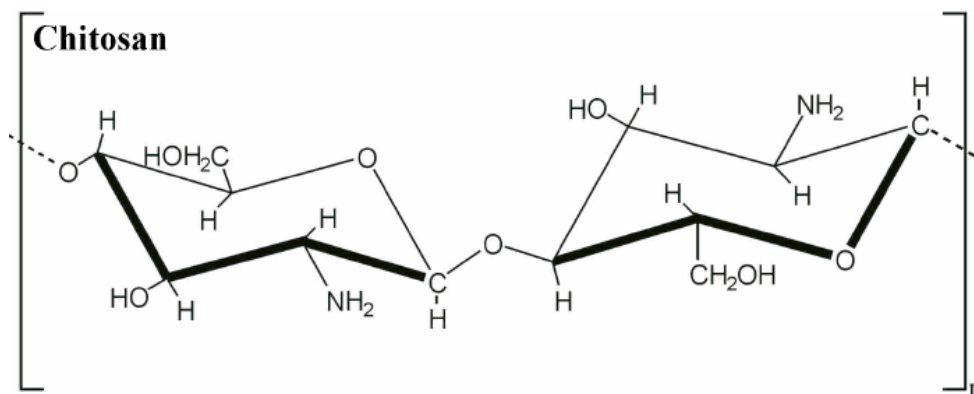
Slika 1: Kemijska formula hitina

(STOYE, 2013)

Hitin uvrščamo v skupino polisaharidov in je sestavljen iz 2-acetamino-2-deoksi- β -D-glukoznih enot, ki so povezane z β -1,4 vezjo. Hitin ima v primerjavi s celulozo dokaj podobno strukturo; razlikujeta se le v tem, da ima hitin namesto hidroksilne skupine na drugem ogljikovem atomu acetilamin (KAISERBERGER, 2010).

Hitozan je bil odkrit leta 1859, ko je profesor Rouget kuhal hitin v alkalnem mediju. Po končanem postopku kuhanja hitina je ugotovil, da je makromolekula hitozana pravzaprav zgrajena iz glukozamino enot s prostimi amino skupinami. Za te je značilno, da lahko v kislem mediju protonirajo. Zaradi sposobnosti protoniranja ima hitozan določene lastnosti (KAISERBERGER, 2010).

Hitozan je opredeljen kot linearni polisaharid in je sestavljen iz dveh monosaharidnih enot: 2-amino-2-deoksi- β -D-glukopiranoze (D-glukozamina) in 2-acetamino-2-deoksi- β -D-glukopiranoze (N-acetil glukozamin). Monosaharidni enoti sta povezani z 1,4- β -glikozidnimi vezmi. Hitozan pridobivajo v komercialni proizvodnji z deacetilacijo hitina, kar pomeni, da iz njegove molekule odstranijo acetilno skupino. Pridobivanje hitozana iz hitina z deacetilacijo poteka v 40 % raztopini NaOH, pri 120 °C in poteka približno 1-3 ure. Tako dobimo 70 % deacetiliran hitozan (PLOŠNIK, 2012).



Slika 2: Kemijska formula hitozana

(LOPEZ-GARCA, 2014)

Hitozan je zaradi netoksičnosti, biokompatibilnosti, biodegradibilnosti, adsorpcijskih lastnosti ter velikega deleža vsebnosti dušika (6,89 %) precej zanimiv za uporabo. V hitozanu so pomembne aminske skupine, saj te v kislem mediju tvorijo amonijeve soli, zaradi česar ima hitozan veliko zmožnost inhibiranja rasti bakterij, gliv in virusov. Hitozan lahko deluje protimikrobno z dvema možnima mehanizmoma. Prvi mehanizem deluje, tako da polikationi hitozana vplivajo moteno na delovanje bakterijskega metabolizma z vključevanjem v bakterijsko celično steno. Drugi mehanizem temelji na vezavi hitozana na DNK, kar inhibira sintezo mRNK. Pri obeh mehaniznih protimikrobnega delovanja hitozana je učinkovitost protimikrobnosti odvisna od določenih dejavnikov, in sicer od stopnje deacetilacije, razmerja med protoniranimi in neprotoniranimi aminskimi skupinami ter molske mase (PLOŠNIK, 2012).

1.2.1 KEMIJSKE IN FIZIKALNE LASTNOSTI HITOZANA

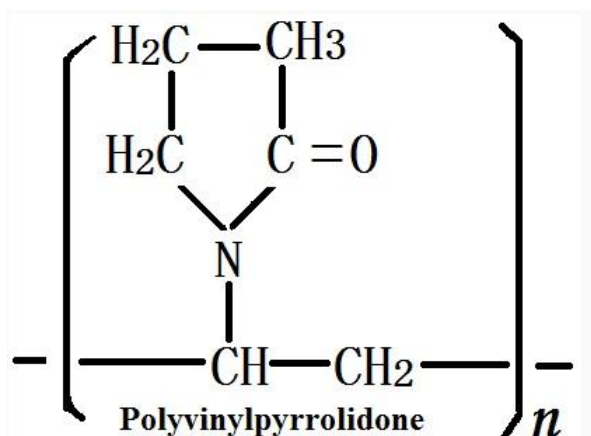
Iz zgoraj prikazanih kemijskih formul hitina (Slika 1) ter hitozana (Slika 2) je razvidno, da sta si spojini dokaj podobni. Omenjena polimera sta si podobna, saj oba vsebujeta reaktivne hidroksilne skupine. Znano je, da je hitozan v primerjavi s hitinom občutljivejši za reagente in topila, saj je običajno manj kristalin. Najpogosteje uporabljani topila za raztapljanje hitozana sta metanojska in etanojska kislina. Tako hitozan kot tudi hitin nimata določenega tališča, saj se že pred doseženo točko tališča med segrevanjem razgradita (STRNAD et al., 2007).

Kemijske in fizikalne lastnosti so zelo odvisne od stopnje deacetilacije (ang. DD- degree of deacetylation). Pri večji stopnji deacetilacije je na voljo več prostih ioniziranih skupin, ki

vplivajo na boljšo protimikrobno učinkovitost. Dosedanje raziskave so pokazale, da ima tudi molska masa velik vpliv na protimikrobno učinkovitost hitozana. Ugotovili so, da je večja molska masa hitozana uspešneje reducira bakterije. Hitozan je deacetiliran do te stopnje, da je topen v šibkejših oziroma razredčenih kislinah. Sem uvrščamo metanojsko, etanojsko in mlečno kislino ter razredčene raztopine anorganskih kislin (HCl in CH₃COOH). Za povečanje topnosti hitozana v vodi, ki je veliko slabša, moramo dodati kislino, da znižamo pH-vrednost (PLOŠNIK, 2012).

Hitozan je tako kot hitin šibka kislina, in zato z njim potekajo reakcije nevtralizacije v alkalnih medijih. Zaradi prostih elektronskih parov na amski skupini je hitozan opredeljen kot nukleofil, in zato reagira z večino aldehydov, pri čemer nastanejo amini. Za hitozan je značilno, da ima pozitivno polarne molekule, ki privlačijo negativno nabite molekule. Kljub temu da večina reakcij poteka na amskih skupinah, se lahko tudi hidroksilne skupine selektivno preoblikujejo (STRNAD et al., 2007).

1.3 POLIVINILPIROLIDON (PVP)



Slika 3: Kemijska formula polivinilpirolidona

(CHEMICAL BOOK, 2017)

Polivinilpirolidon (Slika 3), znan tudi kot PVP, je polimer, ki je zgrajen iz vinilpirolidona. Njegova molekulska masa znaša med 8000 in 10000 mol/kg. Je ena izmed najpomembnejših pomožnih snovi ali ekscipientov v farmaciji. Uporablja se tudi kot topilo za tablete in granule, prav tako je pogosto uporabljen kot sredstvo za pridobivanje tekočih pripravkov, barvil ... Polivinilpirolidon je tudi dobro gelirno sredstvo za prekinitev poteka polimerizacije (XIONGFENG, 2017).

Najpogosteje uporabljen polimer za pripravo amorfnih trdnih disperzij je polivinilpirolidon (PVP). Zaradi svoje biokompatibilnosti, amorfности ter vodotopnosti je nadvse primeren kot nosilec. Polivinilpirolidon (PVP) tvori z drugimi molekulami vodikove vezi. Znano je, da polivinilpirolidon (PVP) zaustavlja kristalno rast kot nukleacijo, saj se adsorbira na kristal in tako upočasni kristalno rast (MARKOJA, 2018).

1.3.1 KEMIJSKE IN FIZIKALNE LASTNOSTI POLIVINIL PIROLIDONA (PVP)

Je spojina v trdnem agregatnem stanju, njena molekulska masa znaša med 8000 in 10 000 mol/kg. Spojina je belo ali belo-rumene barve in ima pH-vrednost med 3 in 5, prav tako je topna v vodi in je higroskopna. Vrelišče ima med 90–93°C in tališče pri približno 165 °C (DAI XIONGFENG, 2017).

1.4 KOVINSKI NANODELCI V GELSKIH STRUKTURAH

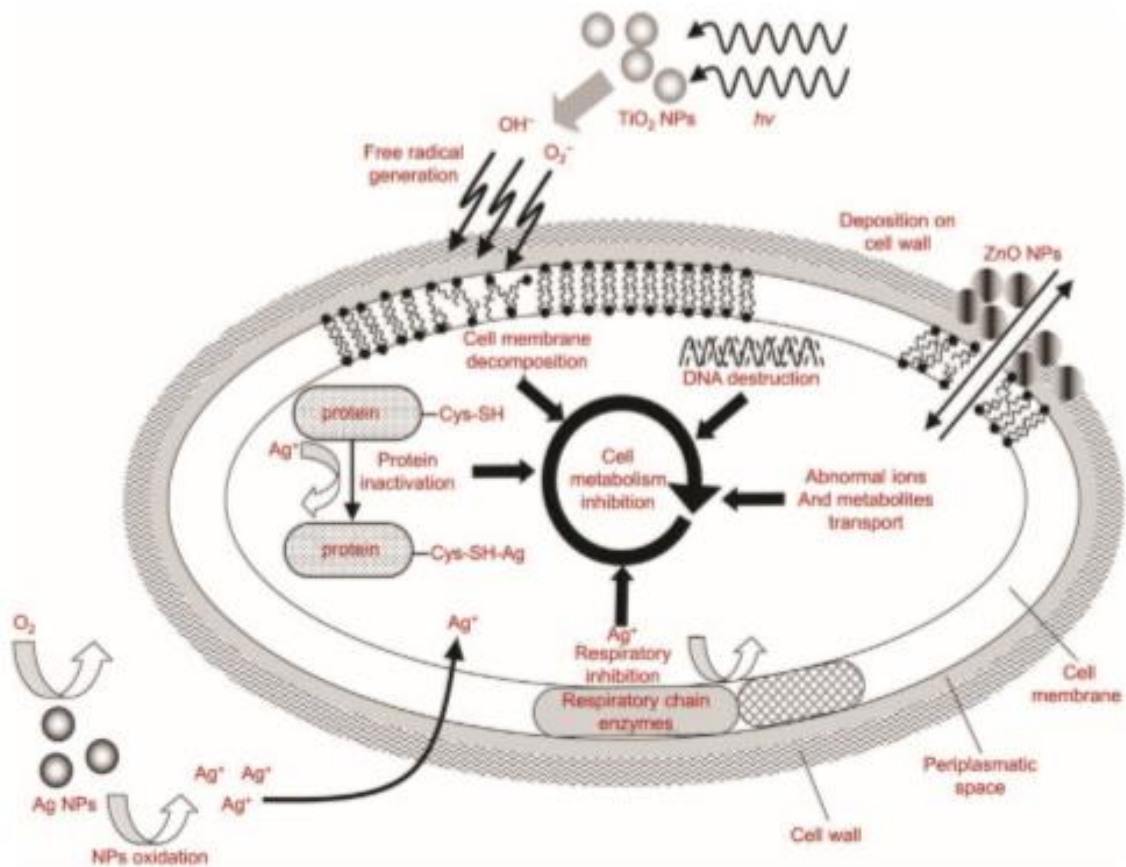
V gelske strukture lahko dodamo kovinske nanodelce in kovinske okside nanodelcev. Najpogosteje uporabljeni kovinski ioni so ioni srebra (Ag), zlata (Au) ter bakra (Cu), pri kovinskih oksidih pa so to cinkov oksid (ZnO), titanov oksid (TiO₂) ter nikljev oksid (NiO). Ugotovili so, da imata med vsemi naštetimi najboljši antibakterijski učinek kovinski ioni srebra (Ag) ter cinkov oksid (ZnO) (SHUQIANG, L et al, 2018).

Vstavljeni kovinski nanodelci v gelske strukture ne izboljšujejo le antibakterijskega učinka, temveč tudi ohranjajo antibakterijski učinek za daljše časovno obdobje, kar zmanjšuje verjetnost nastanka odpornosti bakterije (SHUQIANG, L. et al, 2018).

Slika 4 ponazarja shemo delovanja možnega antibakterijskega mehanizma kovinskih nanodelcev ter kovinskih oksidov nanodelcev. Antibakterijski mehanizem delovanja kovinskih nanodelcev ter kovinskih oksidov nanodelcev deluje, tako da povzroča poškodbe bakterijske celične membrane in poškodbe posameznih organelov v celici. Določeni mehanizmi delovanja so še vedno nekoliko nezanesljivi in potrebujejo nadaljnje raziskave ter diskusije (SHUQIANG, L. et al, 2018).

Kovinski oksidi nanodelcev imajo dober antibakterijski učinek, prav tako pa se od drugih kovinskih nanodelcev razlikujejo po mehanizmu delovanja. Glavni antibakterijski mehanizem delovanja kovinskih oksidov nanodelcev, predvsem titanovega dioksida (TiO₂), je fotokataliza. Ob ultravijoličnem osvetljevanju iz sončne svetlobe nastane zelo velika količina prostih

radikalov na površini kovinskih oksidov nanodelcev, in sicer nastanejo hidroksilni radikali ter kisikovi radikali (SHUQIANG, L. et al, 2018).



Slika 4: Shema antibakterijskega mehanizma kovinskih nanodelcev ter kovinskih oksidov nanodelcev

(SHUQIANG, L. et al, 2018)

Ko proste radikale izpostavimo mikroorganizmom, organska snov slednjih oksidira v ogljikov dioksid (CO₂), torej tako kovinski oksidi nanodelcev uničijo mikroorganizme v kratkem času (SHUQIANG, L. et al, 2018)

Nanodelci cinkovega oksida se zaradi svojega izjemno dobrega antibakterijskega učinka ter netoksičnosti (ob ustrezni koncentraciji) uporablja pri izdelavi številnih kozmetičnih proizvodov. V eni izmed raziskav (KUMAR et al) so raziskovali gelske strukture z dodanim cinkovim oksidom, n(ZnO) ter njih vpliv na celjenje ran in kopičenje kolagena. Ugotovili so, da takšna gelska struktura antibakterijsko učinkuje tako na gram negativni kot tudi na gram

pozitivni bakteriji, prav tako so ob uporabi gelske strukture bakterijske spore odporne na višje temperature in višji tlak. V drugi raziskavi (MOHANDAS et al) so ugotovili, da ima gelska struktura z vstavljenim n(ZnO) povečano sposobnost nabrekanja, strjevanja krvi ter antibakterijskega učinka (SHUQIANG, L. et al, 2018).

Zelo dobra antibakterijska učinkovitost gelskih struktur z dodanim n(ZnO) je bila dokazna na bakterijah, kot so *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* in *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Ob nanosu gelske strukture z dodanim n(ZnO) na človeški koži, natančneje na fibroblast kožnih celic, so ugotovili, da n(ZnO) ni toksičen pri manjših koncentracijah (SHUQIANG, L. et al, 2018).

V raziskavi (YODOLLAHI et al), v kateri so za izdelavo gelske strukture uporabili karboksimetil celulozo ter bakrov oksid, pri čemer je ta prispeval nanodelce, so prav tako dokazali antibakterijski učinek gelske strukture na gram negativni in gram pozitivni bakteriji (SHUQIANG, L. et al, 2018).

Kovinski nanodelci in kovinski oksidi nanodelcev, ki jih vstavimo v gelske strukture, imajo relativno stabilno antibakterijsko učinkovitost, prav tako so odporne na višje temperature. Pomanjkljivost gelskih struktur z vstavljenimi kovinskimi nanodelci in kovinskimi oksidi nanodelcev je, da imajo lahko nezadovoljivo biokompatibilnost za nanos na človeško telo. Alternativa je uporaba organskih antibakterijskih sredstev v sintetičnih antibakterijskih gelskih strukturah. Organsko antibakterijsko sredstvo se običajno razvrsti v majhno molekulo antibakterijskega sredstva in polimer antibakterijskega sredstva. Osnova gelske strukture je lahko sestavljena iz naravnega polimera in njegovih derivatov, med katerimi so pogosto uporabljeni želatina in karboksimetil celuloza, med sintetičnimi polimeri pa se uporabljata predvsem polivinilpirolidon ter polivinil acet (SHUQIANG, L. et al, 2018).

2 METODOLOGIJA

2.1 MATERIAL

- 0,1 M etanojska (ocetna) kislina
- hitozan
- karboksimetil hitozan
- polivinilpirolidon (PVP)
- glutaraldehid (zamreževelec)

2.2 PRIPRAVA GELSKIH STRUKTUR

V prvi čaši raztopimo 0,7 g hitozana in 0,7 g karboksimetil hitozana v 7 ml očetne kisline, s koncentracijo 1 mol/L. Očetno kislino uporabimo, da raztopimo v vodi netopen hitozan. V drugi čaši pripravimo raztopino iz 0,12 g polivinilpirolidona (PVP) v 3 ml destilirane vode. S pomočjo homogenizatorja nato obe raztopini homogeniziramo 10 minut in dodamo po kapljah 0,5 ml zamreževalca glutaraldehida ter nato 120 minut mešamo s pomočjo magnetnega mešala pri sobnih pogojih. Ob dodatku zamreževalca prične nastajati hidrogel, ki je vedno bolj viskozen.

Osnova za pripravo gelske strukture z dodanim $n(\text{ZnO})$ je enaka osnovi za pripravo gelske strukture brez dodanega $n(\text{ZnO})$.

Pripravili smo gelsko strukturo brez dodatka $n(\text{ZnO})$, gelsko strukturo z dodanim 0,05 % $n(\text{ZnO})$ in gelsko strukturo z dodanim 0,01 % $n(\text{ZnO})$.

2.3 VAKUUMSKO SUŠENJE Z ZAMRZOVANJEM

Ko smo končali z dvournim mešanjem vzorcev hidrogelov, smo nadaljevali z vakuumskim sušenjem z zamrzovanjem (t. i. liofilizacijo). Gre za postopek sušenja, pri katerem odstranimo tekočo fazo iz hidrogela, s čimer dobimo porozno strukturo. Pri vakuumskem sušenju z zamrzovanjem se material in vsebujoča tekoča faza zamrzeta. Nato se v komori (slika 5) zniža tlak in dovaja ustrezna količina toplote, da voda sublimira.



Slika 5: Komora za vakuumsko sušenje z zamrzovanjem

(lasten vir)

Vakuumsko sušenje z zamrzovanjem je v primerjavi z običajnim sušenjem precej dolgotrajnejši proces in v primerjavi z običajnim sušenjem porabi tudi več energije.

Vakuumsko sušenje z zamrzovanjem je pri našem eksperimentalnem delu potekalo 3 dni pri temperaturi $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter podtlaku 10^{-3} mb .

2.4 KARAKTERIZACIJA VEZAVE TEKOČINE

Dobljenim gelskim strukturam smo izmerili karakteristike nabrekanja. To smo preverjali s potapljanjem liofiliziranih vzorcev v 10 ml fosfatni pufer, ki predstavlja medij za vezavo tekočine in ima pH-vrednost 7,4. Za pripravo PBS-pufra smo zatehtali 8,00 g natrijevega klorida, 0,20 g kalijevega klorida, 1,44 g dinatrijevega hidrogen fosfata in 0,24 g kalijevega dihidrogen fosfata. V litrsko bučko smo nato dolili destilirano vodo in z 0,1 M klorovodikovo kislino ter 0,1 M natrijevim hidroksidom umerili pH-vrednost raztopine na 7,4. Po pretečenih določenih časovnih intervalih smo iz pufra vzeli vzorce gelskih struktur ter jih po površini posušili s filtrirnim papirjem, da smo odstranili odvečno vlago. Pri tem smo jih vsakič stehali, preden smo jih položili nazaj v pufer.

Nabrekanje smo vsem vzorcem izračunali na podlagi formule:

$$N = \frac{m_n - m_p}{m_n}$$

pri čemer predstavljajo:

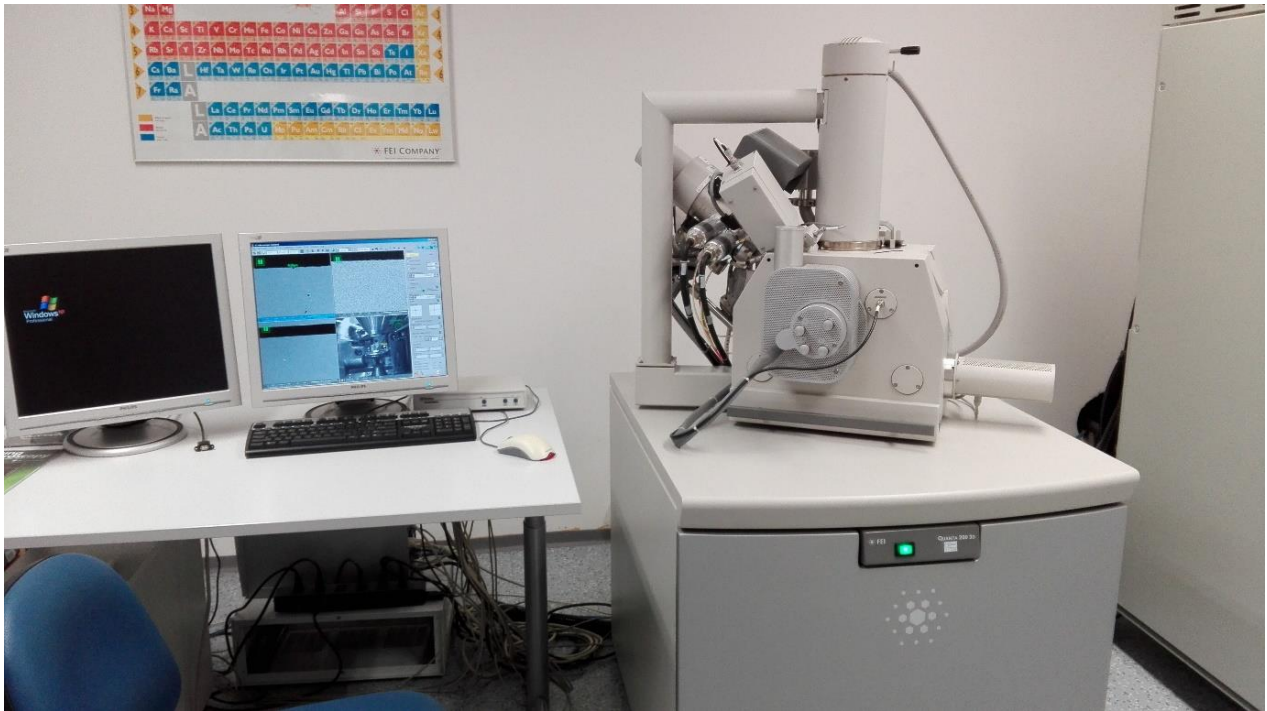
N – nabrekanje

m_n – masa nabreklega vzorca (g)

m_p – masa posušenega vzorca (g)

2.5 OKOLJSKI SKENIRAJOČ ELEKTRONSKI MIKROSKOP (ESEM)

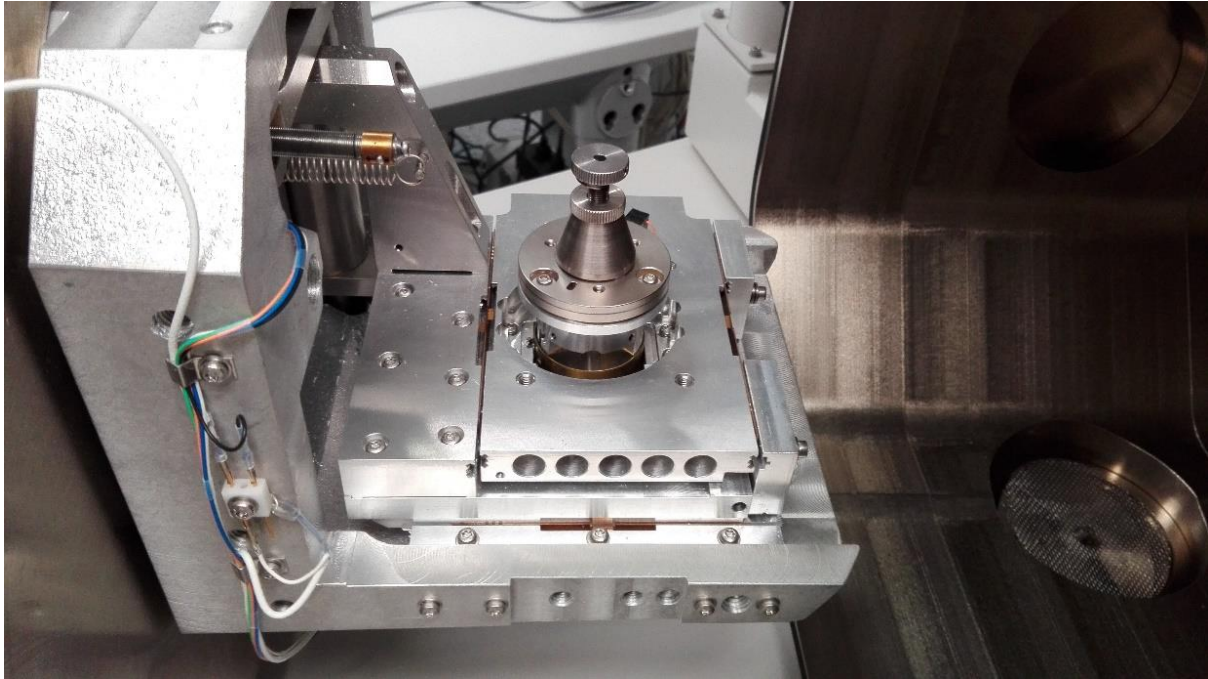
Uporabljeni okoljski vrstični elektronski mikroskop, znan tudi kot ESEM (angl. Environmental Scanning Electron Microscope), se nahaja na Fakulteti za strojništvo Univerze v Mariboru in je različica klasičnega visokovakuumskega mikroskopa. ESEM (Slika 6) ima v primerjavi s klasičnim visokovakuumskim mikroskopom višji tlak oziroma manjši vakuum.



Slika 6: Okoljski vrstični elektronski mikroskop (ESEM)

(lasten vir)

Glavni elementi mikroskopa, s katerim lahko mikroskopiramo tudi mokre vzorce, so posebne zaslonke, ki razmejujejo področje elektronske kolone z visokim vakuumom in komore z nizkim vakuumom. Za delovanje ESEM so zelo pomembni tudi vakuumski sistem z dodatno rotacijsko črpalko in sistemom za dodajanje vodne pare ali drugih plinov ter detektorji, ki delujejo tudi v plinskem okolju. Uporaba ESEM se je uveljavila predvsem za materiale, ki niso zgolj neprevodni, ampak tudi občutljivi za visok vakuum. To so večinoma materiali, za katere je značilno, da so vlažni, mehki, porozni, vzorci teh pa so hlapljivi ter topljivi pri sobni temperaturi (BONČINA, 2011).



Slika 7: Vpetje vzorca v ESEM

(lasten vir)

Posamezni vzorec gelske strukture smo predhodno vpeli na ležaj (Slika 7) v ESEM, da smo opravili analizo mikrostrukture posameznega vzorca pri 80-kratni povečavi.

2.6 FOURIERJEVA TRANSFORMACIJSKA INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA (FTIR)

Fourierjeva transformacijska infrardeča spektroskopija, znana tudi kot FTIR (Slika 8), je infrardeča spektroskopija, ki je metoda za identifikacijo organskih spojin in je namenjena tako kvantitativni kot kvalitativni analizi spojin.



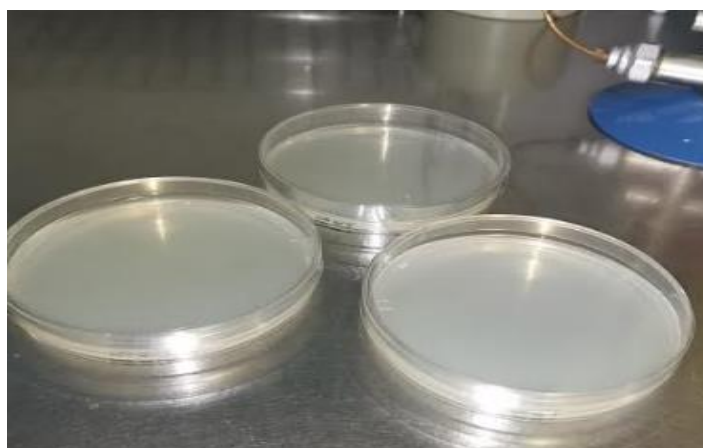
Slika 8: Uporaba Fourierjeve transformacijske infrardeče spektroskopije (FTIR)

(lasten vir)

Pri tej metodi gre za proučevanje rotacijskih in vibracijskih sprememb molekul in prisotnosti funkcionalnih skupin v molekuli. Za večino funkcionalnih skupin je značilno, da imajo lasten način vibriranja, s čimer jih ločimo od drugih molekul. Pri infrardečem področju elektromagnetnega valovanja imajo fotoni manjšo energijo sevanja kot v vidnem področju, zaradi česar pri infrardeči absorpciji molekula ostane v istem elektronskem stanju.

2.7 PROUČEVANJE ANTIMIKROBNOSTI GELSKIH STRUKTUR Z DISK DIFUZIJSKO METODO

Antimikrobno delovanje posameznih vzorcev gelskih struktur smo določali s Kirby-Bauer disk difuzijsko metodo, pri čemer smo določali občutljivost bakterije na različne antimikrobne vzorce. Antimikrobnost posameznega vzorca gelske strukture smo določili, tako da smo različne vzorce gelskih struktur izpostavili gram negativni bakteriji *Escherichia coli*. Bakteriji *Escherichia coli* so bili izpostavljeni vzorci gelske strukture, ki je imela dodanega 0,01 % n(ZnO), gelske strukture z dodanim 0,05 % n(ZnO) ter gelske strukture brez dodanega n(ZnO). (MARKOJA, 2018)



Slika 9: Plošče z agarjem pred nanosom vzorcev gelskih struktur

(lasten vir)

Pred pričetkom izvajanja metode smo agarje razdelili na tri dele in jih ustrezno označili. Razdelek 13 predstavlja gelsko strukturo brez dodanega n(ZnO), v razdelku 11 se nahaja gelska struktura z dodanim 0,01 % n(ZnO), v razdelku 12 pa je gelska struktura z dodanim 0,05 % n(ZnO) (Slika 16). Nato smo na agarje ob gorilniku pod aseptičnimi delovnimi pogoji nanesti 100 μ l razredčene bakterije (*Escherichia coli*) izhodne koncentracije 10^5 CFU/ml, ki smo jo enakomerno nanesti na agar. Na vsak razdelek inokulirane agar plošče smo položili lificirani vzorec posamezne gelske strukture v velikosti 10 mm. Plošče smo nato dali v inkubator (Slika 10), v katerem je optimalna temperatura $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ za rast bakterije. Čez natanko 24 ur smo preverili učinek inhibicije bakterij pri posameznem vzorcu gelske strukture in izmerili povprečni premer inhibicijske cone.

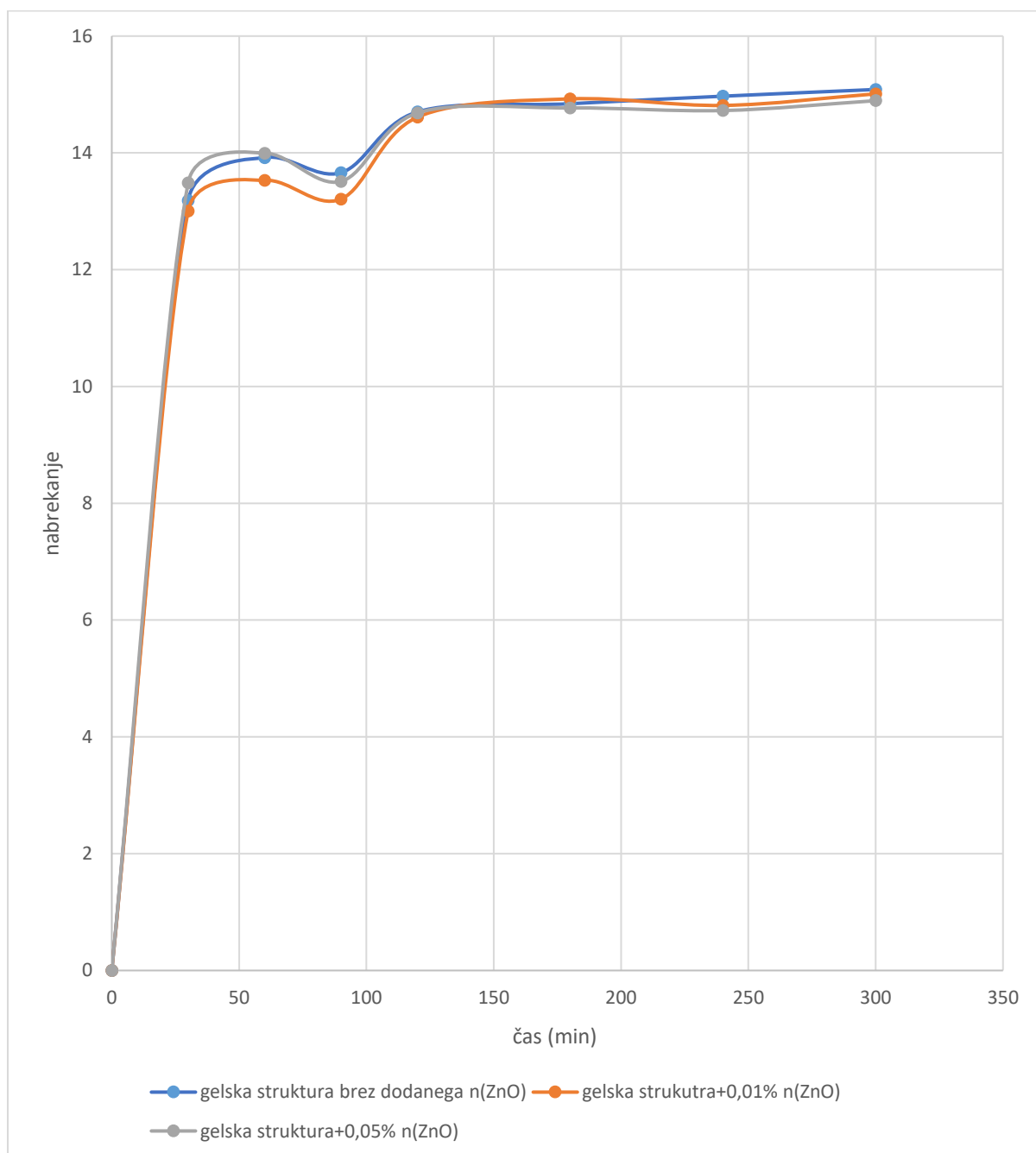


Slika 10: Inkubator

(lasten vir)

3 REZULTATI

V raziskovalnem delu smo pridobili podatke, ki prikazujejo rezultate nabrekanja posameznih gelskih struktur, mikrostrukturo na mikro nivoju pri 80-kratni povečavi z metodo ESEM, spekter gelskih struktur, pridobljen z metodo FTIR, ter rezultate preverjanja antimikrobnega delovanja z disk difuzijsko metodo na gram negativni bakteriji *Escherichia coli*.



Slika 11: Nabrekanje (vezava vode) vzorcev različnih gelskih struktur

(lasten vir)

Tabela 1: Masa vzorcev gelske strukture brez dodatka n(ZnO) po določenih časovnih intervalih

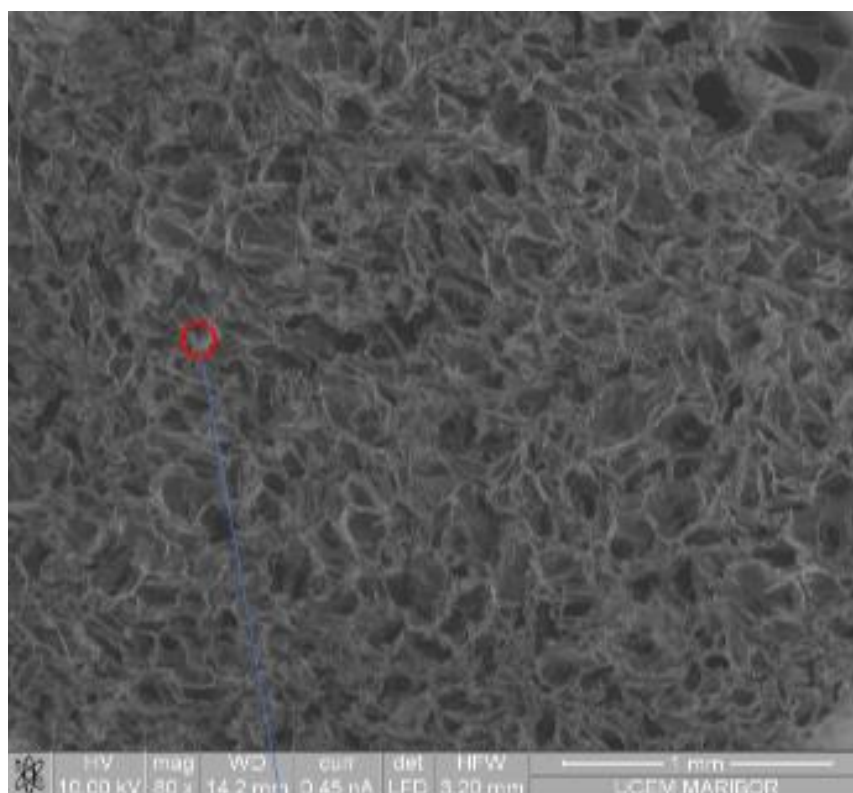
t (min)	m1 (g)	m2 (g)	m3 (g)	m (povprečna) (g)	nabrekanje
0	0,0451	0,0429	0,0447	0,0442	0
30	0,6305	0,5865	0,6654	0,6275	13,18538
60	0,6708	0,6567	0,6521	0,6599	13,91786
90	0,6223	0,6381	0,6851	0,6485	13,66089
120	0,6983	0,6367	0,7486	0,6945	14,70158
180	0,7213	0,6469	0,7340	0,7007	14,84175
240	0,7025	0,6811	0,7357	0,7064	14,97061
300	0,7179	0,6893	0,7273	0,7115	15,08515

Tabela 2: Masa vzorcev gelske strukture z dodanim 0,01% n(ZnO) po določenih časovnih intervalih

t (min)	m1 (g)	m2 (g)	m3 (g)	m (povprečna) (g)	nabrekanje
0	0,0451	0,0419	0,0437	0,0436	0
30	0,6105	0,5835	0,6644	0,6195	13,00452
60	0,6602	0,6267	0,6411	0,6427	13,52901
90	0,6133	0,6281	0,6441	0,6285	13,20874
120	0,6973	0,6267	0,7476	0,6905	14,61115
180	0,7233	0,6569	0,7330	0,7044	14,92464
240	0,6925	0,6711	0,7347	0,6994	14,81236
300	0,719	0,6793	0,7263	0,7082	15,01055

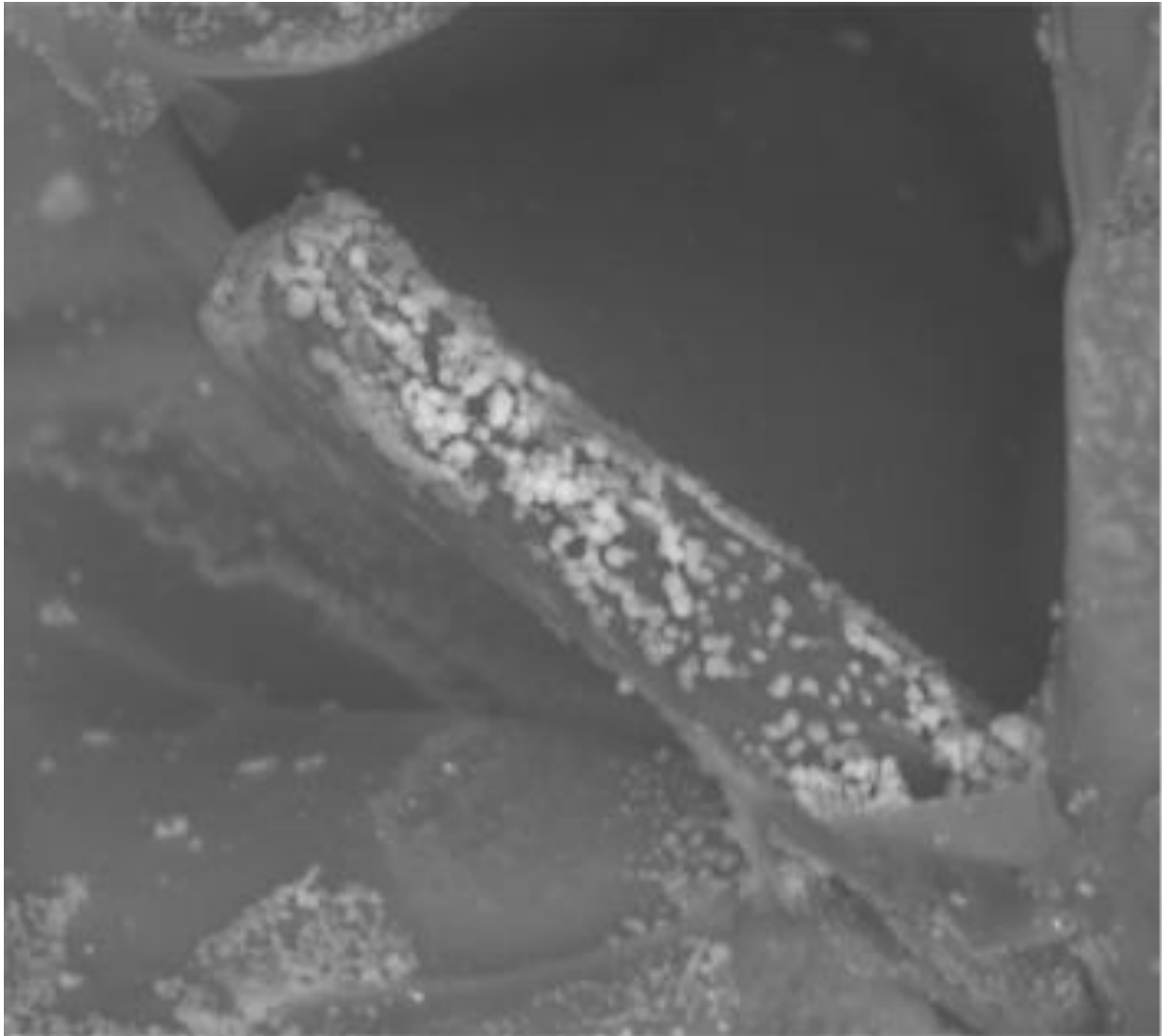
Tabela 3: Masa vzorcev gelske strukture z dodanim 0,05% n(ZnO) po določenih časovnih intervalih

t (min)	m1 (g)	m2 (g)	m3 (g)	m (povprečna) (g)	nabrekanje
0	0,0441	0,0421	0,0447	0,0436	0
30	0,6295	0,6275	0,6654	0,6408	13,48681
60	0,6698	0,6678	0,6521	0,6632	13,99397
90	0,6213	0,6193	0,6851	0,6419	13,51168
120	0,6573	0,6953	0,7286	0,6937	14,6835
180	0,7203	0,7183	0,6540	0,6975	14,7694
240	0,7015	0,6995	0,6857	0,6956	14,72494
300	0,6969	0,7049	0,7073	0,7030	14,89375

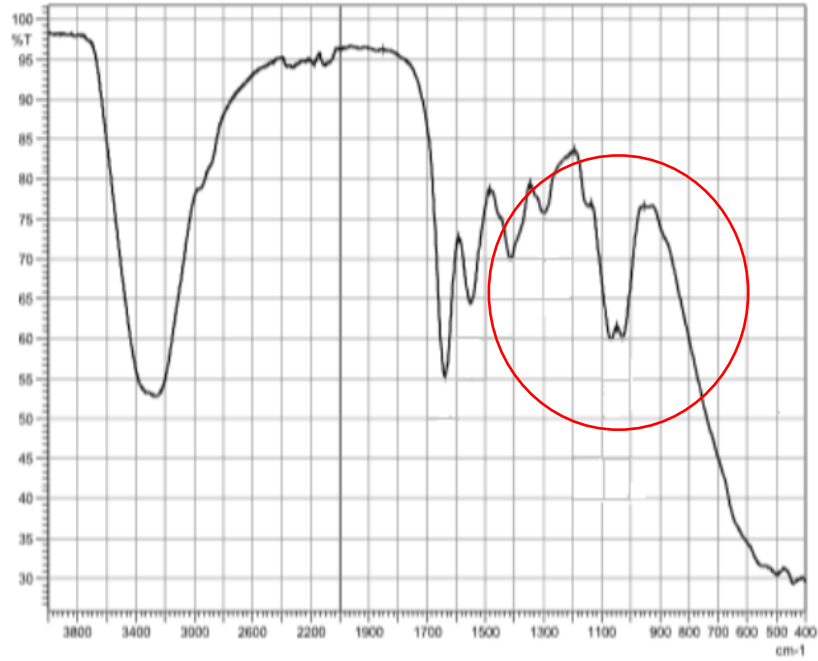


Slika 12: Mikrostruktura gelske strukture vidne z ESEM (80-kratna povečava)

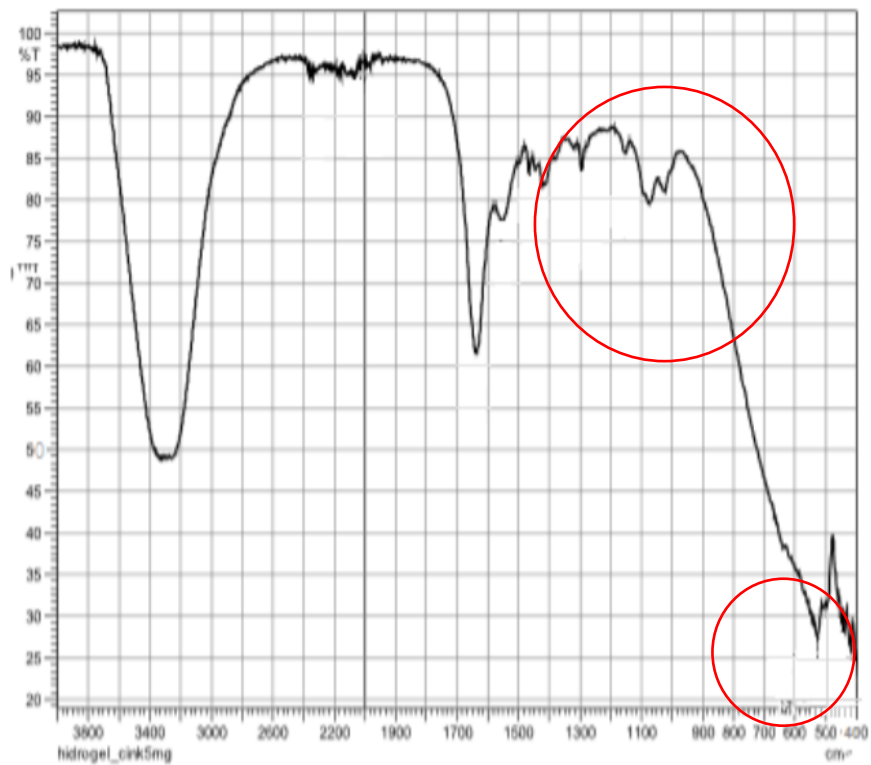
(lasten vir)



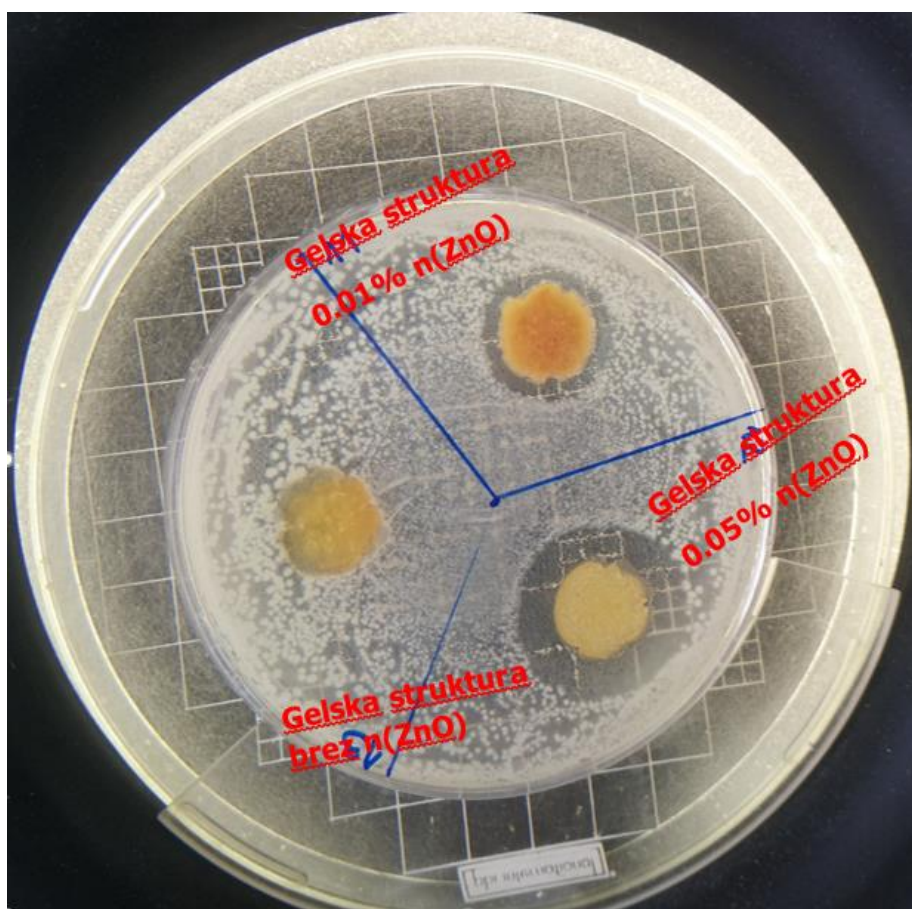
Slika 13: Vezava Zn²⁺ ionov na gelsko strukturo (200-kratna povečava)
(lasten vir)



Slika 14: Z metodo FTIR analiziran spekter gelske strukture brez dodanega n(ZnO)
(lasten vir)



Slika 15: Z metodo FTIR analiziran spekter gelske strukture z dodanim 0,05 % n(ZnO)
(lasten vir)



Slika 16: Določanje antimikrobnosti posameznih vzorcev gelskih struktur z disk difuzijsko metodo

(lasten vir)

Tabela 4: Premer (mm) inhibicijske cone določenega vzorca gelske strukture pri določanju antimikrobnosti z disk difuzijsko metodo

	gelska struktura brez n(ZnO)	gelska struktura+0,01 % n(ZnO)	gelska struktura+0,05 % n(ZnO)
inhibicijska cona (mm)	/	13 mm	23 mm

4 INTERPRETACIJA REZULTATOV

Iz slike 11 je razvidno, da imajo pripravljene gelske strukture zelo dobro sposobnost nabrekanja, saj je ta sprva znašala 0, po določenem časovnem intervalu, ki je bil v našem primeru 300 min, pa na grafu opazimo približno 15-kratno povečanje. Razvidno je, da imajo gelske strukturo z dodanimi $n(\text{ZnO})$ nekoliko manjšo vezavo vode, zato je tudi vrednost nabrekanja nekoliko manjša. Dejstvo je, da je ta razlika v vezavi vode posameznih vzorcev gelskih struktur relativno majhna, torej sta tako vezava vode kot nabrekanje posameznih vzorcev različnih gelskih struktur primerljivi. Pri karakterizaciji vezave tekočine smo na vzorcih gelskih struktur uporabili PBS pufer s $\text{pH}=7,4$, ki ima podobne karakteristike kot človeška kri. Predvsem zaradi dobre vezave tekočine bi lahko bile te gelske strukture zelo uporabne v aplikaciji kot obliž za oskrbo ran.

Z mikroskopsko metodo ESEM smo pri 80-kratni povečavi ugotovili, da je mikrostruktura (Slika 12) gelske strukture porozna, pri čemer so vidne pore na mikronivoju. Pri mikroskopiranju je opazno tudi bistveno svetlejšo obarvanje skupine posameznih delcev, ki pravzaprav predstavljajo Zn^{2+} ione (Slika 13), ki so vezani na gelsko strukturo. Ta ugotovitev je bila za nadaljnje raziskovanje pomembna, saj smo ugotovili, da smo izbrali ustrezne nanodelce kovinskih oksidov, saj je prišlo do vezave med nanodelci cinkovega oksida, $n(\text{ZnO})$ ter gelsko strukturo. Sklepamo, da so se Zn^{2+} ioni vezali na gelsko strukturo s pomočjo karboksimetilne skupine, ki je precej ugodna za vezavo s Zn^{2+} ioni.

Meritve s Fourierjevo transformacijsko infrardečo spektroskopijo (FTIR) prikazuje Slika 14, ki prikazuje analiziran spekter vzorca gelske strukture brez dodatka $n(\text{ZnO})$, in Slika 15, ki prikazuje analiziran spekter gelske strukture z dodanim 0,05 % $n(\text{ZnO})$. Razvidno je, da sta si grafa dokaj podobna in da se razlikujeta zgolj v določenih podrobnostih. Pri obeh grafih je precej opazno raztezanje okoli valovne dolžine 3400 cm^{-1} , ki je značilno za OH^- funkcionalno skupino in potrjuje njeno prisotnost v vzorcih naših gelskih struktur. Na obeh grafih je prav tako zelo očitno raztezanje okoli valovne dolžine 1650 cm^{-1} , kar nakazuje na prisotnost C-O-O vezi. Razvidno je tudi, da so pri približno 1500 cm^{-1} vibracije C-O vezi, (Slika 14) nekoliko intenzivnejše. Vibracije (Slika 15) okoli valovne dolžine 1300 cm^{-1} , ki so intenzivnejše, ponazarjajo deformacijo CH_2 skupine. Na podlagi tega lahko sklepamo, da ima vzorec (Slika 15) nekoliko več C-O vezi, ki so zelo ugodne za vezavo Zn^{2+} ionov, zaradi česar bo na ta vzorec prišlo do (boljše) vezave Zn^{2+} ionov. Razvidno je tudi (Slika 15), da je okoli valovne dolžine

500 cm⁻¹ obsežnejše območje intenzivnejših vibracij, za katere obstaja možnost, da so bistveno intenzivnejše v primerjavi z vibracijami na sliki 14, saj bi jih lahko povzročila vezava Zn²⁺ ionov na karboksimetilno skupino.

Pri določanju antimikrobnega delovanja posameznih vzorcev različnih gelskih struktur z disk difuzijsko metodo smo čez 24 ur opazili, da so posamezni vzorci gelskih struktur v inkubatorju pri optimalni temperaturi (37 °C) razvili različno velike inhibicijske cone.

Izmerili smo (Tabela 4) inhibicijske cone posameznih vzorcev gelskih struktur na agarju in ugotovili, da gelska struktura brez n(ZnO) ni ustvarila inhibicijske cone, torej znaša ta 0 mm. Vzorec gelske strukture z dodanim 0,01 % n(ZnO) je ustvaril inhibicijsko cono v premeru 13 mm, vzorec gelske strukture z dodanim 0,05 % n(ZnO) pa inhibicijsko cono, katere premer meri kar 23 mm. Ugotovili smo, da gelska struktura brez dodanega n(ZnO), ki je bila hkrati tudi osnova za pripravo gelskih struktur z dodanim n(ZnO), nima nikakršnega antimikrobnega delovanja. Antimikrobno delovanje smo določili pri obeh vzorcih z dodanim n(ZnO) v gelske strukture, pri čemer je inhibicijska cona vzorca z dodanim 0,05 % n(ZnO) približno 1,77-krat večja, kar vsekakor predstavlja veliko razliko; tako v velikosti inhibicijske cone kot tudi v antimikrobnem delovanju. Iz dobljenih rezultatov sklepamo, da bi pri dodajanju še večje koncentracije n(ZnO) v gelske strukture v primerjavi z uporabljenimi tovrstni vzorci ustvarili še večjo inhibicijsko cono, torej bi imeli tudi boljšo antimikrobnost. Zelo dobro je, da smo vzorcem gelskih struktur z dodanim n(ZnO) določili antimikrobno delovanje, saj je to pomembno pri večini okoliščin, v katerih uporabljamo gelske strukture, obenem pa ta koristna lastnost nakazuje na možnost vsestranske uporabe gelskih struktur z vstavljenim n(ZnO). Dokazana antimikrobnost gelskih struktur je izjemno pomembna predvsem za uporabo gelskih struktur kot alternativo antibiotikom, obližev za oskrbo ran in očesnih leč.

5 IZBOLJŠAVE

V nadaljnjih raziskavah bi lahko za izdelavo gelskih struktur uporabili še nekatere druge polisaharidne polimere, kot na primer karboksimetil dekstran, prav tako bi lahko analizirali vzorce gelskih struktur z večjo koncentracijo dodanega $n(\text{ZnO})$. V prihodnje bi lahko v gelske strukture vstavili tudi nekatere druge nanodelce kovin ali kovinskih oksidov, kot so: srebro, zlato ter bakrov oksid, saj se v literaturi navaja njihovo dobro antimikrobno delovanje in vezava tekočine v gelskih strukturah. Zelo koristno bi bilo raziskati, kakšna je interakcija nanodelcev z živim tkivom, pri čemer bi izvedli *in vitro* teste. V nadaljnjih raziskavah bi lahko namesto kovinskih nanodelcev ali nanodelcev kovinskih oksidov uporabili tudi naravne ekstrakte, antibiotike in določene sintetične spojine z antimikrobnim delovanjem, pri čemer bi lahko medsebojno primerjali med rezultati nabrekanja in antimikrobnega delovanja, tako da bi ugotovili, kateri vstavljeni material je najprimernejši za uporabo v biomedicini. Zanimivo bi bilo tudi proučiti antimikrobno delovanje gelskih struktur z vstavljenimi nanodelci na gram pozitivni bakteriji *Staphylococcus aureus*, ki se pogosto nahaja na človeški koži.

6 ZAKLJUČEK

V raziskovalnem delu smo na podlagi različnih metod proučevali nabrekanje, mikrostrukturo, spekter (rotacijske in vibracijske spremembe molekul) ter antimikrobno delovanje posameznih vzorcev gelskih struktur. Ugotovili smo, da imajo vse sintetizirane gelske strukture zaradi porozne strukture visoko sposobnost vezave tekočine. Pri analizi spektra vzorcev gelskih struktur z metodo FTIR smo ugotovili, da sta sliki 14 in 15 dokaj podobni in se razlikujeta v samo določenih podrobnostih. Na sliki 14 smo pri določenih valovnih dolžinah opazili intenzivnejše vibracije v primerjavi s sliko 15. Precej pomembna je ugotovitev, da ima slika 15, kjer je analiziran spekter gelske strukture z dodanim 0,05 % $n(\text{ZnO})$, zelo izrazito deformacijo CH_2 skupine, kar je na grafu ponazorjeno z intenzivnejšimi vibracijami okoli valovne dolžine 1500 cm^{-1} . Na podlagi te ugotovitve sklepamo, da je v gelski strukturi z dodanim 0,05 % $n(\text{ZnO})$ prisotnih veliko več C-O vezi, ki so zelo pomembne, saj se Zn^{2+} ioni vežejo na gelsko strukturo preko karbonilne skupine, torej je C-O omogočala vezave nanodelcev $n(\text{ZnO})$ na gelsko strukturo. Med raziskovanjem smo kasneje ugotovili, da je vezava Zn^{2+} ionov na gelsko strukturo ključna za antimikrobnost gelskih struktur, saj Zn^{2+} ioni stabilizirajo vezavo nanodelcev $n(\text{ZnO})$ v gelske strukture. Pri proučevanju mikrostrukture posameznih vzorcev

gelskih struktur z ESEM-metodo smo ugotovili, da so gelske strukture zelo porozne, zato imajo dobro vpojnost vode, kar je zelo koristno pri uporabi teh v biomedicinske namene. Predvidevamo tudi, da se Zn^{2+} ioni vežejo na gelsko strukturo, kar opazimo kot pripetje številnih svetlih delcev. Na podlagi izvedene disk difuzijske metode smo ugotovili, da imajo gelske strukture z dodanimi nanodelci n(ZnO) antimikrobno delovanje. Na podlagi izmerjenih premerov nastalih inhibicijskih con smo ugotovili, da je antimikrobno delovanje najučinkovitejše pri gelski strukturi z dodanim 0,05 % n(ZnO), saj je inhibicijska cona merila kar 23 mm. Skoraj dvakrat manjša inhibicijska cona je nastala okoli vzorca gelske strukture z dodanim 0,01 % n(ZnO), pri vzorcu gelske strukture pa brez dodanega n(ZnO) pa inhibicijske cone sploh ni bilo. Na podlagi tega sklepamo, da je velikost premera inhibicijske cone odvisna od dodane koncentracije n(ZnO) v gelsko strukturo. Večja kot je dodana koncentracija n(ZnO), večji je premer nastale inhibicijske cone ob vzorcu določene gelske strukture. Antimikrobno delovanje smo proučevali na bakteriji *Escherichia coli*, ki je zelo pogosta pri infekcijah v človeškem telesu, kar nakazuje na zelo uporabno vrednost gelskih struktur z dodanim n(ZnO) na področju biomedicine.

V raziskovalnem delu smo potrdili večino hipotez, ki smo si jih zastavili, in s tem dosegli namen naloge.

Hipoteze, ki smo si jih zastavili na začetku raziskovanja, smo ovrednotili:

H1: Gelske strukture z dodanim 0,05 % volumskim deležem n(ZnO) bodo imele večje nabrekanje kot druge gelske strukture. To hipotezo smo **v celoti ovrgli**, saj je tudi iz rezultatov, prikazanih na sliki 11, razvidno, da je nabrekanje gelske strukture z dodanim 0,05 % n(ZnO) v določenem časovnem intervalu nekoliko manjše v primerjavi z nabrekanjem vzorcev drugih gelskih struktur, vendar je ta razlika zelo majhna in velja, da so razlike med vrednostmi nabrekanja minimalne, zato so vrednosti nabrekanj medsebojno primerljive.

H2: Zn^{2+} ioni se bodo vezali na gelsko strukturo. To hipotezo smo **v celoti potrdili**, saj so na posnetkih mikrostruktur gelskih struktur z dodanim n(ZnO) zelo očitno prisotni svetli delci, ki predstavljajo Zn^{2+} ione, vezane na gelsko strukturo.

H3: Graf spektra gelske strukture z dodanim 0,05 % n(ZnO), pridobljen z metodo FTIR, se bo razlikoval v več podrobnostih v primerjavi s grafom spektra gelske strukture brez dodanega n(ZnO). To hipotezo smo **v celoti potrdili**, saj se sliki 14 in 15 razlikujeta v več podrobnostih. Slika 15 ima pri določenih enakih valovnih dolžinah precej intenzivnejše vibracije, zaznane z metodo FTIR. S slike 15 smo pri valovni dolžini 1500 cm^{-1} opazili intenzivnejšo deformacijo CH_2 skupine, na podlagi česar sklepamo, da je v tej gelski strukturi prisotnih veliko več C-O

vezi, ki so zelo ugodne za vezavo Zn^{2+} ionov. S slike 15 je razvidno tudi pri valovni dolžini približno 500 cm^{-1} obsežnejše območje intenzivnejših vibracij, ki je izrazitejše v primerjavi s sliko 14.

H4: Gelske strukture z dodanim 0,05 % n(ZnO) bodo imele v primerjavi z drugimi gelskimi strukturami največjo antimikrobnost. To hipotezo smo **v celoti potrdili**, saj smo z disk difuzijsko metodo ugotovili, da je ob nanosu posameznih vzorcev gelskih struktur na agar na plošči čez 24 ur v inkubatorju pri optimalni temperaturi največja inhibicijska cono nastala ob vzorcu gelske strukture z dodanim 0,05 % n(ZnO), in sicer je premer meril približno 23 mm.

7 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Raziskovalna naloga je družbeno odgovorna, saj ponuja tako individualno družbeno korist kot družbeno korist določenih organizacij. Opravljeni eksperimenti in ugotovitve v raziskovalni nalogi omogočajo uporabo gelskih struktur v številne biomedicinske namene, kar predstavlja družbeno korist tako za posameznika kot tudi za družbo in določene institucije, na primer bolnišnice, industrijo za izdelavo higienskih izdelkov itn. Tema raziskovalne naloge je aktualna in uporabna, obenem pa tudi ozavešča družbo na določene pomanjkljivosti trenutno večinsko uporabljanih spojin, med katerimi še zmeraj prevladujejo antibiotiki, prav tako ponuja številne izboljšave na tem področju. Raziskovalna naloga ima vsekakor pozitiven vpliv na družbo, saj bi lahko uporaba tovrstni gelskih struktur z dodanimi nanodelci kovin ali kovinskih oksidom družbi omogočila kakovostnejše življenje, kar bi se odražalo predvsem kot uporaba na splošno kakovostnejših, človeku in okolju prijaznejših, večinoma higienskih izdelkov. Raziskovalno delo je opravljeno v skladu z načeli etičnega obnašanja in spoštuje človekove pravice, prav tako ne posega v lastne interese posameznika in družbe.

8 VIRI IN LITERATURA

- BONČINA, T. (2011). *Elektronska vrstična mikroskopija pri povišanem tlaku (ESEM)*. Ljubljana: Društvo za vakuumsko tehniko Slovenije.
- CALO, E. V. (2014). Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, 1–12.
- CHAI, Q. et al. (2017). Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them. *Gels*, 1–6.
- Chemical Book*. (2017). Pridobljeno iz Polyvinylpyrrolidone:
https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_cb4209342.htm
- KAISERBERGER, M. (2010). *Funkcionalizacija površine PET (polietilen tereftalatne) folije za dosego protimikrobnih lastnosti*. Dipl. delo, Maribor, Univ. v Mariboru, Biotehniška fakulteta.
- LOPEZ-GARCA. (8. 5. 2014). *ResearchGate*. Pridobljeno iz Journal of Functional Biomaterials:
https://www.researchgate.net/publication/263324738_HaCaT_Keratinocytes_Response_on_Antimicrobial_Atelocollagen_Substrates_Extent_of_Cytotoxicity_Cell_Viability_and_Proliferation
- MARKOJA, M. (2018). *Vpliv ionske moči na prenasičenje in velikost oborjenih delcev diklofenaka med sproščanjem iz tablet s polivinilpirolidonom*. Mag. delo, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.
- PLOŠNIK, A. (2012). *ADSORPCIJA FORMULACIJE HITAZANA IN KURKUMINA NA VISKOZNE TKANINE ZA MEDICINSKE NAMENE*. Dipl. delo, Maribor, Univ. v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.
- SHUQIANG, L. et al. (2018). Antibacterial Hydrogels. *Advanced Science*, 2–7.
- STOYE, E. (14. 8. 2013). *Royal Society of Chemistry*. Pridobljeno iz Chitin:
<https://www.chemistryworld.com/podcasts/chitin/6478.article>
- STRNAD, S. et al. (2007). Hitozan-vsestransko uporaben biopolimer. *Tekstilec*, 243–249.
- XIONGFENG, D. (2017). *Chemical Book*. Pridobljeno 3. 2 2020 iz Polyvinylpyrrolidone:
https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB4209342_EN.htm