

Utjecaj peludi na svojstva polimernih hidrogelova

Šaravanja, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:147750>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ana Šaravanja

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ana Šaravanja

**UTJECAJ PELUDI NA SVOJSTVA
POLIMERNIH HIDROGELOVA**

DIPLOMSKI RAD

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ljerka Kratofil Krehula

Članovi ispitnog povjerenstva:

izv. prof. dr. sc. Ljerka Kratofil Krehula, FKIT

prof. dr. sc. Emi Govorčin Bajsić, FKIT

prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac, FKIT

Zagreb, rujan 2023.

Zahvala

Od srca zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Ljerki Kratofil Krehula, na vodstvu i podršci, dijeljenju znanja i datim smjernicama tijekom izrade ovog diplomskog rada. Sve to učinilo je cjelokupni proces ne samo edukativnim, već i ugodnim.

Također, posebnu zahvalu upućujem onima koji su pomogli prilikom raznih mjerenja, a to su: asistentica Elza Štefanović, prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac i dr. sc. Monika Šabić Runjavec za određivanje antimikrobnih svojstava i snimanje svjetlosnim mikroskopom, asistentica Angela Kapitanović za pomoć pri određivanju vodljivosti hidrogelova te gđa Marina Krejča Curkovečki koja je odredila mehanička svojstva uzoraka.

*Dio istraživanja u ovom radu (ispitivanje vodljivosti hidrogelova) izrađen je u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost "Razvoj novih rješenja za karakterizaciju i zaštitu brončane kulturne baštine izložene vanjskom okolišu" (IP-2019-04-5030),
voditeljica: prof. dr. sc. Helena Otmačić Ćurković,
Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije.*

UTJECAJ PELUDI NA SVOJSTVA POLIMERNIH HIDROGELOVA

SAŽETAK

U ovom su radu pripremljeni hidrogelovi na bazi polimera poli(vinil-alkohola) uz dodatak peludi. Kao komponenta za pripremu hidrogelova, korišten je i natrijev alginat. Hidrogelovi su vrsta materijala pogodna za primjenu u medicini jer su netoksični, imaju mogućnost upijanja i zadržavanja velike količine vode te se mogu regenerirati.

Hidrogelovi su pripremljeni metodom zamrzavanje/odmrzavanje. Za karakterizaciju hidrogelova, koristile su se različite metode. Određen im je udio vode, stupanj bubrenja, antimikrobna i mehanička svojstva. Vodljivost hidrogelova određena je elektrokemijskom impedancijskom spektroskopijom (EIS), a za karakterizaciju je korištena i infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR). Rezultati mjerenja pokazali su da se stupanj bubrenja povećava dodatkom peludi u hidrogelove što predstavlja potencijal primjene hidrogelova s peludi kao obloga i dijelova zavoja za rane. Pokazalo se i da pelud posjeduje antimikrobnu aktivnost. Rezultati mehaničkih ispitivanja pokazali su da hidrogelovi s peludi imaju višu vrijednost lomnog produljenja od čistog polimernog hidrogela što ih čini postojanijima za rukovanje i upotrebu.

Ključne riječi: hidrogel, natrijev alginat, pelud, poli(vinil-alkohol)

THE INFLUENCE OF POLLEN ON THE PROPERTIES OF POLYMER HYDROGELS

SUMMARY

In this thesis, hydrogels based on the polymer polyvinyl alcohol, with the addition of pollen, were prepared. The preparation of hydrogels also included sodium alginate as a component. Because of their non-toxicity, ability to absorb and keep large amounts of water, and self-regeneration abilities, hydrogels are a material that is suitable for medical use.

The hydrogels were prepared by the freezing/thawing method. The characterization of prepared hydrogels required different tools and techniques. The hydrogels were characterized by determining their water content, swelling behaviour as well as antimicrobial and mechanical properties. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) was used to measure the conductivity of prepared hydrogels. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) was also used for characterization. The measurement results showed that adding pollen to the hydrogels increased the degree of swelling. This represents the potential for applying hydrogels with pollen as medical coatings and parts of wound dressings. It has also been shown that pollen has antimicrobial activity. The results of mechanical tests showed that hydrogels with pollen have a higher value of elongation at break than pure polymer hydrogels, which makes them more stable for handling and use.

Key words: hydrogel, pollen, polyvinyl alcohol, sodium alginate

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Hidrogelovi.....	2
2.1.1. Postupci pripreme hidrogelova	3
2.1.2. Upotreba hidrogelova	5
2.2. Poli(vinil-alkohol).....	10
2.3. Natrijev alginat	13
2.4. Pelud.....	15
2.5. Hidrogelovi s peludi.....	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	20
3.1. Materijali	20
3.2. Priprema hidrogelova.....	20
3.3. Karakterizacija hidrogelova i peludi.....	23
3.3.1. Sušenje hidrogelova	24
3.3.2. Bubrenje hidrogelova	24
3.3.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR).....	24
3.3.4. Određivanje vodljivosti hidrogelova.....	25
3.3.5. Snimanje svjetlosnim mikroskopom	26
3.3.6. Određivanje antimikrobnih svojstava hidrogelova i peludi.....	27
3.3.7. Praćenje pojave plijesni na hidrogelovima	29
3.3.8. Ispitivanje zacjeljivosti hidrogelova	29
3.3.9. Određivanje mehaničkih svojstava hidrogelova	29
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. Određivanje sadržaja vode u hidrogelu sušenjem	30

4.2. Određivanje ravnotežnog stupnja bubrenja	32
4.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)	37
4.4. Određivanje vodljivosti hidrogelova.....	42
4.5. Snimanje svjetlosnim mikroskopom.....	44
4.6. Određivanje antimikrobnih svojstava hidrogelova i peludi	51
4.7. Praćenje pojave plijesni na hidrogelovima.....	56
4.8. Ispitivanje zacjeljivosti hidrogelova	59
4.9. Određivanje mehaničkih svojstava hidrogelova.....	60
5. ZAKLJUČAK	61
6. POPIS SIMBOLA	63
7. LITERATURA.....	64
8. ŽIVOTOPIS	69

1. UVOD

Hidrogel je materijal kojeg čini mreža hidrofilnih polimernih lanaca zajedno s vodom ili vodenom otopinom. Zbog velike količine vode koju može prihvatiti, kompatibilan je s ljudskim tkivom (kožom, očima, čak i unutrašnjim organima). To je svojstvo, zajedno s inertnosti, od velike koristi u medicini. Osim u medicini, značajna je njihova primjena u farmaciji, u izradi kontaktnih leća, higijenskih proizvoda (pelene, ulošci), papira, eksploziva, senzora i ambalaže, zatim u poljoprivredi te u različitim tehnologijama pročišćavanja.

U ovom su radu pripremljeni hidrogelovi na bazi poli(vinil-alkohola) (PVA) i natrijevog alginata (Na-alginat) u destiliranoj vodi kao otapalu, uz dodatak peludi. Ove su kemikalije odabrane zbog lake dostupnosti i netoksičnosti. Bilo je potrebno analizirati utjecaj peludi na svojstva hidrogelova.

Pčelinja pelud vrijedan je apiterapijski proizvod i ima mnoga korisna svojstva poput antioksidativnih i antibakterijskih djelovanja. Alginat je prirodan i jeftin polimer. Oba spomenuta prirodna materijala pokazuju dobru kompatibilnost s ljudskim tkivima, što je značajno za biomedicinske primjene, te nemaju toksični učinak na okoliš. PVA je hidrofilni sintetski linearni polimer koji također ima korisna svojstva kao što su niska toksičnost, topljivost u vodi, biokompatibilnost i biorazgradljivost.

Za karakterizaciju hidrogelova, koristile su se metode sušenja, bubrenje hidrogelova (u destiliranoj vodi i fiziološkoj otopini), FTIR spektroskopija, elektrokemijska impedancijska spektroskopija (EIS), snimanje mikroskopom, određivanje antimikrobnih svojstava, praćenje pojave plijesni, ispitivanje zacjeljivosti hidrogelova te određivanje mehaničkih svojstava.

2. OPĆI DIO

2.1. Hidrogelovi

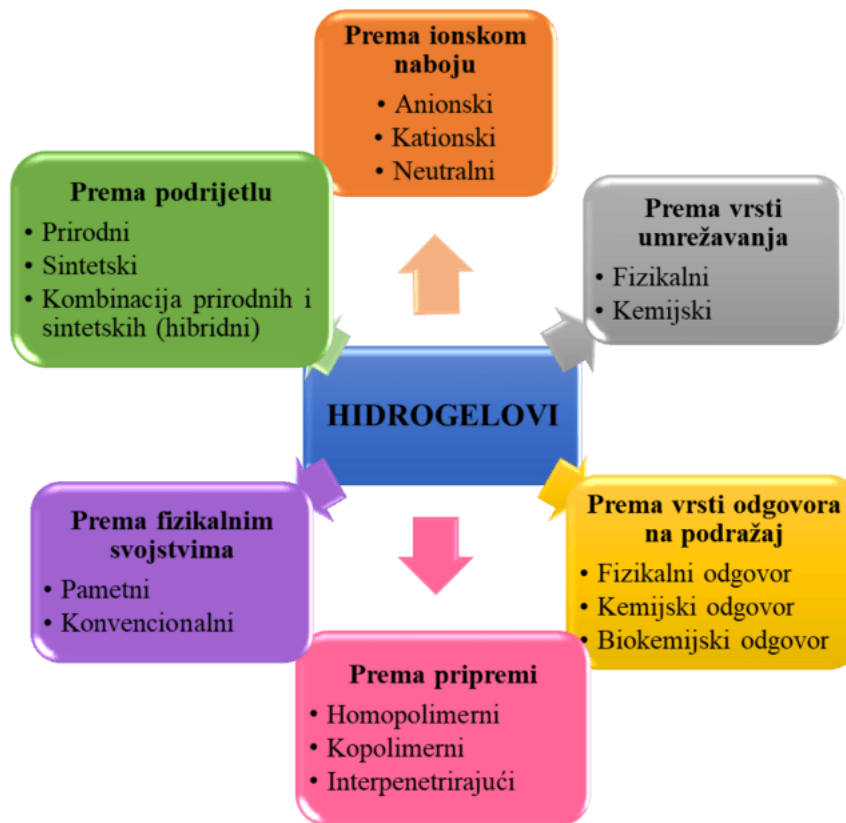
Hidrogelovi su trodimenzionalne mreže sastavljene od hidrofilnih polimernih lanaca, koje upijaju i zadržavaju velike količine vode (od 30 % pa do 99 % i više ukupne mase)¹. Zbog karakteristične umrežene strukture, hidrogelovi se ne otapaju već bubre, a količina pohranjene vode u strukturi hidrogela ovisi o njegovom kemijskom sastavu te prirodi i stupnju umreženja².

Hidrogelovi se mogu klasificirati na različite načine, primjerice prema sastavu, porijeklu, vrsti poprečnih veza između polimernih lanaca, metodi umrežavanja, odgovoru na podražaje te ionskom naboju (slika 1)³.

Raznolika svojstva hidrogelova posljedica su njihovog kemijskog sastava i strukture. Njihovo najvažnije svojstvo je sposobnost upijanja velikih količina vode te propusnost^{1,4}. Zbog značajnog udjela vode u strukturi, vrlo su slični prirodnim mekim tkivima. Poprečne veze između polimernih lanaca rezultiraju viskoelastičnim, a ponekad i čistim elastičnim ponašanjem⁴. Hidrogelovi mogu značajno mijenjati volumen kao odgovor na određene podražaje (temperatura, električno ili magnetsko polje, tlak, pH, sastav otapala itd)². Svojstvo hidrogelova da bubre u biološkim uvjetima čini ih idealnim kandidatima za biomedicinske primjene, kao što je isporuka lijekova te inženjerstvo tkiva. Njihova netopljiva umrežena struktura omogućuje učinkovitu imobilizaciju i otpuštanje aktivnih tvari i biomolekula⁵. Biokompatibilnost je još jedno vrlo važno svojstvo hidrogelova⁴. Hidrogelovi na bazi prirodnih polimera (polisaharida i proteina) slični su izvanstaničnom matriksu zbog svog prirodnog porijekla te ih stanice mogu lako identificirati, što ih čini biokompatibilnima⁶. Osim toga, hidrogelove odlikuje i svojstvo inertnosti što znači da ne reagiraju u dodiru s ljudskim tkivom¹, a njihova elastična i mekana priroda smanjuje iritaciju susjednih tkiva⁴.

Hidrogelovi se, osim u medicini, upotrebljavaju i u farmaciji, u izradi papira, eksploziva, senzora i ambalaže. Posebno treba istaknuti njihovu upotrebu u obliku kontaktnih leća, higijenskih proizvoda (pelene, ulošci), zatim za prekrivanje rana na koži, u poljoprivredi te u različitim tehnologijama pročišćavanja¹.

Kao gotov produkt, dolaze u obliku granulata, tankih ravnih ili zakrivljenih opni ili se mogu oblikovati u željeni oblik implantata¹.



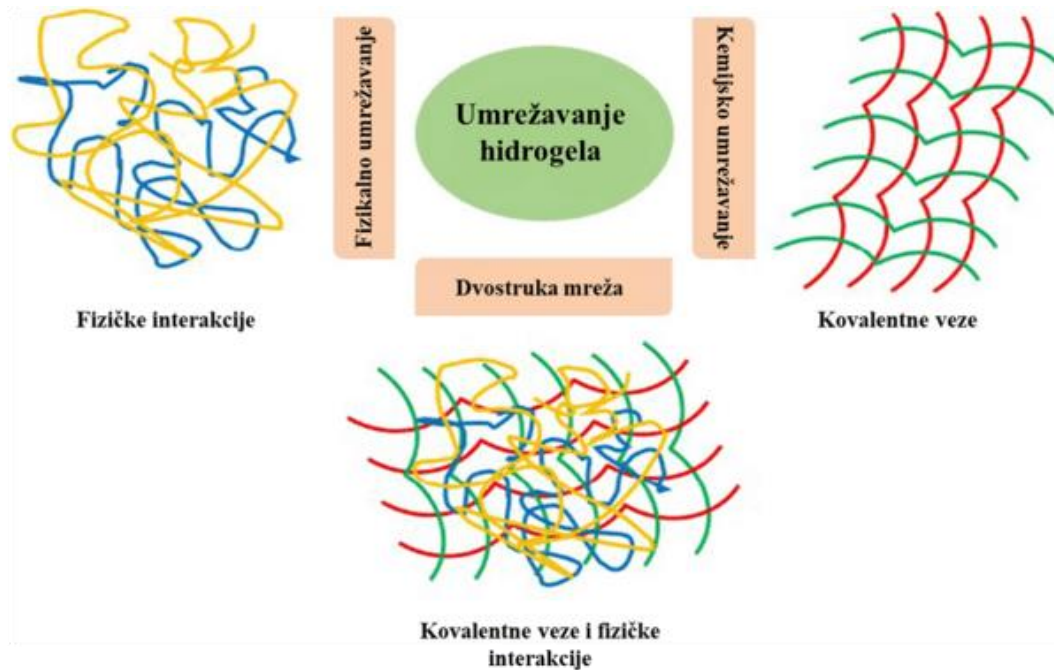
Slika 1. Podjela hidrogelova³

2.1.1. Postupci pripreme hidrogelova

Hidrogelovi se obično pripremaju od hidrofilnih polarnih monomera. Polazni materijali mogu biti prirodni i sintetski polimeri te njihove kombinacije². Od prirodnih polimera, koriste se hitin, kitozan, celuloza, škrob, alginat itd. koji predstavljaju temelj proizvodnje hidrogelova⁷. Općenito su hidrogelovi na bazi prirodnih polimera netoksični te se obilato prodaju po niskoj cijeni, no njihov je glavni nedostatak što su krhki. Kako bi se poboljšala njihova mehanička svojstva, prirodni se polimeri u umrežuju, cijepa monomerima ili miješaju sa sintetskim polimerima. Na primjer, sintetski polimer poli(vinil-alkohol) (PVA) može se koristiti kao sredstvo za miješanje za povećanje mehaničke čvrstoće i fleksibilnosti prirodnih polimera. Od sintetskih se polimera, pored PVA, često koriste i polikaprolakton, poli(vinil-pirolidon) (PVP), poli(mliječna kiselina) (PLA) i poli(etilen-glikol) (PEG)⁶.

Geliranje („sol-gel“ prijelaz) ili umrežavanje najvažniji je proces u mehanizmu nastanka hidrogela, a podrazumijeva međusobno povezivanje makromolekularnih lanaca, odnosno prijelaz konačnih razgranatih polimera u „beskonačni polimer“, odnosno mrežu.. U početnoj fazi nastaje „sol“, mješavina polidisperznih razgranatih topljivih polimera. Nastavak procesa

rezultira povećanjem veličine razgranatog polimera uz smanjenje topljivosti pri čemu nastaje „gel“, mreža prožeta konačnim razgranatim polimerima. Kritična točka gdje se gel prvi put pojavljuje naziva se „gel točka“. Geliranje se može odvijati fizikalnim umrežavanjem (fizikalno geliranje) ili kemijskim umrežavanjem (kemijsko geliranje) (slika 2). Fizikalno umreženi hidrogelovi imaju nestalne veze koje proizlaze iz zapletaja polimernih lanaca ili fizičkih interakcija dok kemijski umreženi hidrogelovi imaju stalne veze unutar svoje mreže⁴.



Slika 2. Shematski prikaz metoda umrežavanje hidrogela⁸

Fizikalno umreženi hidrogelovi ili reverzibilni hidrogelovi zanimljivi su zbog relativno lake proizvodnje i prednosti neupotrebe sredstava za umrežavanje kod njihove pripreme, pa su prikladni za upotrebu u prehrambenoj industriji⁴. Fizikalno umrežavanje ostvaruje se ionskim interakcijama, vodikovim vezama, kristalizacijom, preko hidrofobiziranih polisaharida, interakcijama proteina itd. Ovakve fizičke poprečne veze nisu stalne, ali su u principu dovoljne da hidrogelove učine netopljivim u vodenom mediju⁵. Međutim, zagrijavanjem se fizikalni hidrogelovi obično mogu otopiti u vodi i organskim otapalima⁶. U strukturi fizikalno umreženih hidrogelova prilikom pohranjivanja vode može doći do pojave nehomogenosti ili mrežnih defekata zbog slobodnih krajeva lanaca ili lančanih petlji. Jedna od metoda fizikalnog umrežavanja, metoda umrežavanja kristalizacijom, uključuje procese zamrzavanja i odmrzavanja koji dovode do stvaranja čvrstih i visoko elastičnih hidrogelova⁵. Hidrogelovi na

bazi PVA mogu se primjerice jednostavno pripremiti kroz cikluse zamrzavanja i odmrzavanja, gdje se umrežavanje postiže stvaranjem kristalita na niskim temperaturama. Broj i stabilnost kristalita povećava se ponavljanjem ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja⁹. Glavni nedostatak ovog pristupa dugo je vrijeme procesa (3 ili 4 dana)¹⁰.

Kemijski procesi umrežavanja mnogo su brži od fizikalnih¹⁰. Kemijsko umrežavanje uključuje stvaranje kovalentnih veza i rezultira hidrogelom s jakim vezama⁴, a poprečne veze nastaju kemijskim i radikalskim reakcijama¹⁰. Kemijsko umrežavanje uključuje cijepljenje monomera na okosnicu polimera ili upotrebu sredstava za umrežavanje, kao što su primjerice glutaraldehid formaldehid, epoksi spojevi, dialdehid^{4,5}. Tehnike polimerizacije kod stvaranja kemijski umreženih hidrogelova su lančana polimerizacija (polimerizacija slobodnih radikala), stupnjevita polimerizacija (kondenzacijska i adicijska polimerizacija) te polimerizacija zračenjem (polimerizacija elektronskim i gama zračenjem)^{5,7}. Ovakvim umrežavanjem mogu se modificirati neka od svojstava hidrogela, primjerice svojstvo bubrenja, mehanička čvrstoća ili biorazgradljivost⁶.

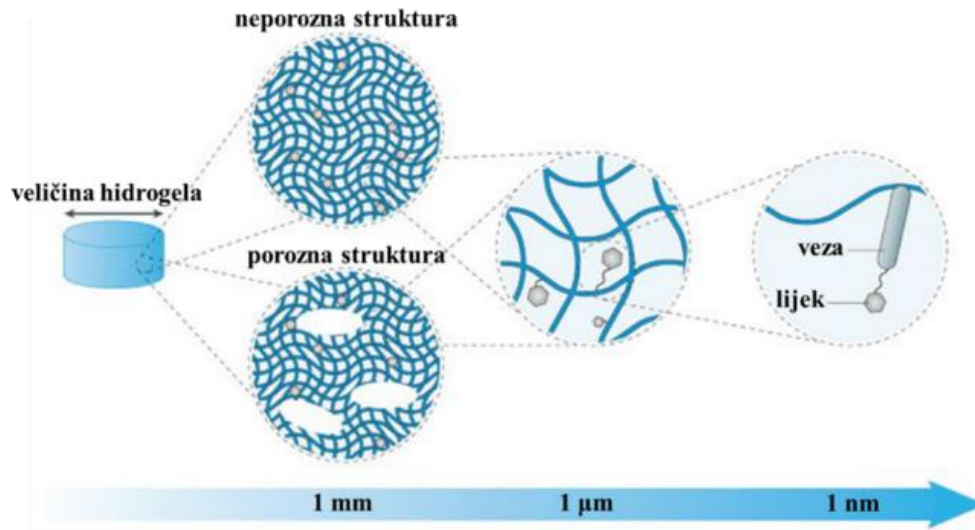
2.1.2. Upotreba hidrogelova

Hidrogelovi su pogodni za upotrebu u mnogim područjima zbog svoje specifične strukture i kompatibilnosti u različitim uvjetima. Fleksibilnost hidrogelova omogućuje njihovu primjenu i u industrijskim i u biološkim područjima. Brojne vrste hidrogelova koriste se u biološkim okruženjima ponajviše zbog svojstva biokompatibilnosti i netoksičnosti, odnosno njihova se primjena proširuje na medicinske svrhe³.

Hidrogelovi za kontrolirane sustave dostave lijekova

Izvanredna svojstva hidrogelova čine ih odličnim izborom za primjene u naprednim formulacijama lijekova. Sustavi kontrolirane dostave lijekova (eng. *Drug Delivery Systems*), osiguravaju isporuku lijekova u tijelo tijekom dugog vremenskog razdoblja uz poboljšanje sigurnosti i učinkovitosti, kontroliranjem mjesta, brzine i vremena otpuštanja. Porozna struktura hidrogela visoko je propusna i može se puniti lijekovima koji se, u odgovarajućim uvjetima, otpuštaju iz hidrogelova. I fizikalne (elektrostatske interakcije) i kemijske (kovalentna veza) metode umrežavanja mogu se koristiti za poboljšanje vezanja između lijeka i matrice hidrogela kako bi se produžilo trajanje otpuštanja lijeka. Hidrogelovi mogu pohraniti i zaštititi lijekove od vanjskih utjecaja te ih otpuštati željenom brzinom. Oslobođanje lijeka može se aktivirati na

zahtjev, lokalnim promjenama temperature, pH, prisutnošću specifičnih enzima ili daljinskim fizikalnim podražajima³.



Slika 3. Interakcija lijeka s polimernim lancima u hidrogelu (kovalentna veza)¹¹

Bojila i uklanjanje iona teških metala

Proučavana je primjena hidrogelova kao adsorbensa za uklanjanje bojila, teških metala i toksičnih komponenti iz otpadnih voda koje mogu predstavljati ozbiljnu prijetnju ljudskom zdravlju i ekološkim sustavima. Za uklanjanje teških metala mogu se koristiti sintetski umreženi poliakrilatni hidrogelovi, no njihova primjena u velikim razmjerima nije praktično rješenje jer su vrlo skupi. Pokazalo se da su hidrogelovi odlični materijali za adsorpciju bojila, posebice metilenskog modrila. U uklanjanju iona teških metala, polielektroliti su kao materijali koji tvore hidrogel posebno značajni zbog sposobnosti vezanja suprotno nabijenih metalnih iona u komplekse. Adsorbensi s karboksilnim, sulfonskim, fosfonskim i dušikovim skupinama na površini pogoduju adsorpciji metalnih iona. Za uklanjanje metalnih iona iz vodenih medija koriste se i hidrogelovi na bazi biopolimera, npr. kitozana, alginata, škroba i celuloze. Primjerice hidrogelovi na bazi kitozana primjenjivi su za uklanjanje iona teških metala zbog prisutnosti više amino (NH_2) i hidroksilnih (OH) skupina u svojoj strukturi, jer metalni ioni imaju sklonost tvoriti kelate s amino skupinama. Kemijska modifikacija ovih funkcionalnih skupina može poboljšati adsorpcijski kapacitet, ali i fizikalno-kemijska svojstva kitozana³.

Nosači u inženjerstvu tkiva

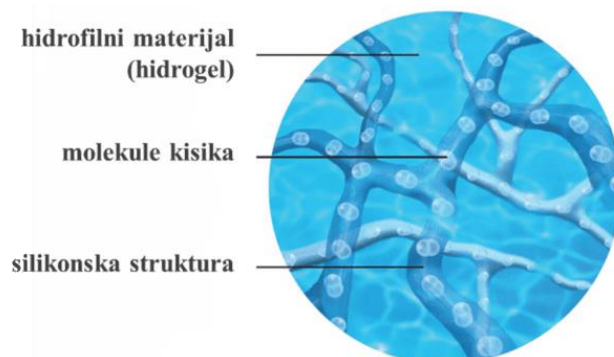
Tkivno inženjerstvo je disciplina u kojoj se uz pomoć inženjerstva i biologije nastoji izraditi funkcionalne zamjene za tkiva i organe. Koristi kombinaciju stanica, inženjeringa i materijala za održavanje, poboljšanje ili zamjenu različitih vrsta tkiva i organa. Uključuje pronalaženje odgovarajućih tipova stanica i njihov uzgoj na prikladnoj konstrukciji – nosaču (skeli), u odgovarajućim uvjetima za formiranje novog održivog tkiva. Hidrogelovi imaju sličnu strukturu kao izvanstanične matrice mnogih tkiva pa su atraktivan materijal za nosače. Mogu se koristiti kao sredstva za popunjavanje praznih prostora, nosači za isporuku bioaktivnih molekula te 3D-strukture koje djeluju kao potpora stanicama i pomažu u stvaranju savršenog tkiva. Za izradu hidrogelova, koji će se koristiti kao nosači u tkivnom inženjerstvu, mogu se koristiti i sintetski i prirodni materijali. Sintetski hidrogelovi (poli(etilen-oksidi), poli(vinil-alkohol), poli(propilen-fumarat)) zanimljivi su zbog mogućnosti kontrole njihovog sastava i strukture čime se direktno utiče na njihova svojstva. Prirodni polimeri (alginat, kitozan) ili čine prirodne komponente izvanstanične matrice ili pak imaju svojstva slična tim matricama te međusobno djeluju na povoljan način. Optimalan dizajn nosača i izbor materijala za svaku specifičnu primjenu ovisi o nekoliko čimbenika (fizičkim i biološkim svojstvima, svojstvima prijenosa tvari), a određuje se predviđenom primjenom nosača i okolinom u koju će on biti postavljen³.

Kontaktne leće

Još jedno važno područje primjene sintetskih hidrogelova je oftalmologija, konkretno izrada kontaktnih leća. Hidrogelovi koji se koriste za izradu kontaktnih leća moraju udovoljiti nizu zahtjeva za upotrebu u različitim fiziološkim uvjetima. Ti zahtjevi uključuju količinu sadržaja vode, dobra mehanička svojstva, propusnost prema kisiku, mogućnost vlaženja površine, dobru optičku sposobnost, stabilnost prema hidrolizi i sterilizaciji, netoksičnu prirodu i biološku toleranciju za žive stanice. Kako bi se povećao sadržaj vode u hidrogelu i postigao pojačani učinak bubrenja, mogu se koristiti različite vrste monomera, a najčešće su to metakrilna kiselina, akrilamidi i mnoge drugi³.

Razvoj hidrogelova doveo je do proizvodnje silikonskih hidrogelova kao materijala za kontaktne leće. Zahvaljujući svojoj strukturi (slika 4) u kojoj su hidrofobni silikoni povezani hidrofilnim lancima, dobiven je kompozit pogodan i mehanički i optički, koji ima dobra svojstva bubrenja i visoku propusnost prema kisiku. Visoka propusnost prema kisiku postiže se

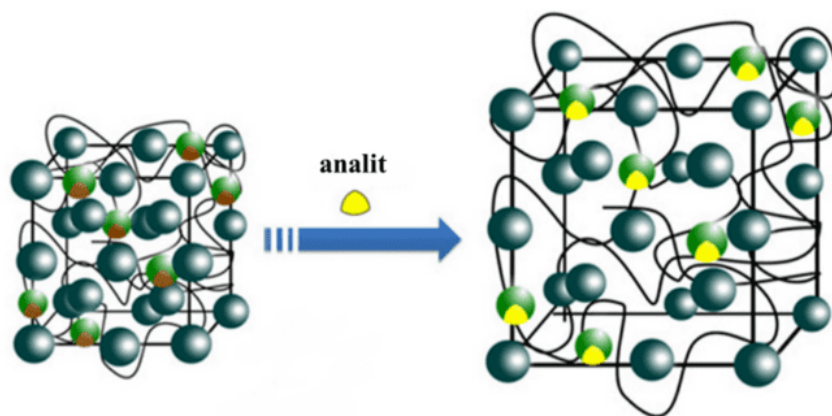
siloksimetakrilatnim monomerom koji se obično naziva "TRIS". Metilenske skupine u strukturi TRIS-a predstavljaju mjesta za hidrofilnu modifikaciju³.



Slika 4. Prikaz građe silikonske-hidrogel leće¹²

Biosenzori

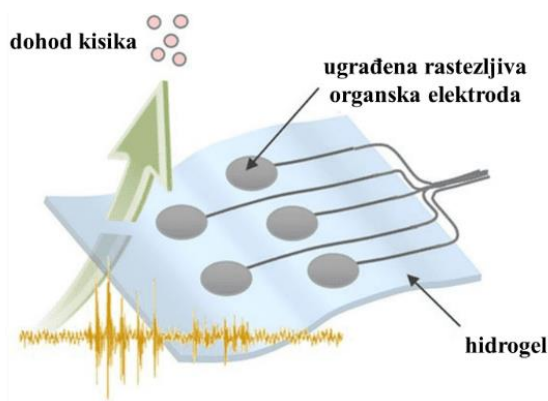
Biosenzori koriste kombinaciju fizikalnih i kemijskih senzora te dijelove za biološko prepoznavanje koji omogućuju analizu bioloških informacija. Pokrivaju širok raspon područja primjene uključujući kućnu dijagnostiku i praćenje stanja okoliša. Biosenzori i senzorski uređaji obično su izrađeni od nerazgradljivih senzorskih materijala i supstrata, pa ekološki osjetljive mreže hidrogela, čije su poprečne veze razgradljive hidrolizom, mogu imati značajnu prednost u odnosu na nerazgradljive materijale. Zbog visokog sadržaja vode i hidrofilne prirode, hidrogelovi su slični komponenti izvanstanične matrice što ih čini biokompatibilnima. Hidrogelovi se u biosenzorima primjenjuju u funkciji zaštite i oblaganja dijelova senzora kako bi se spriječila neželjena interakcija s biološkim molekulama ili stanicama. Mogu se koristiti kao imobilizacijski medij za bioosjetljive elemente te su povoljna okruženja za enzime i druge biomolekule kako bi se očuvala njihova aktivna i funkcionalna struktura. Još jedan primjer primjene hidrogela u biosenzorima je detekcija patogena³. Interakcija analita i senzora rezultira promjenom volumena kao odgovor na ciljanu komponentu što je temelj prepoznavanja u sensorima na bazi hidrogela (slika 5). Postoji mnogo metoda za pretvaranje promjene volumena hidrogelova koji reagiraju na podražaje u signal koji je lako čitljiv. Uz pomoć pretvornika, mikrosenzori na bazi hidrogelova mogu generirati izlazne podatke u obliku optičkih, elektroničkih i magnetskih singala¹³.



Slika 5. Povećanje volumena biosenzora na osnovi hidrogela kao odgovor na analit³

Hidrogelovi kao vodiči

Ugradnjom iona u hidrofилnu hidrogelnu matricu dobivaju se ionski vodljivi hidrogelovi koji predstavljaju obećavajuću materijalnu platformu za nove fleksibilne uređaje za pohranu energije. Vodljivi polimeri kao što su polianilin, polipirol i njihovi derivati posjeduju jedinstvena električna svojstva metala ili poluvodiča, kao i povoljna svojstva konvencionalnih polimera poput jednostavnosti sinteze i prilagodljivosti u obradi³. Zbog svoje fleksibilnosti hidrogel se može koristiti za elektrode ili komponente kolektora struje te stvara superkondenzatore s velikom rastezljivošću i kompresibilnošću. U usporedbi s konvencionalnim kondenzatorima, u superkondenzatoru na bazi hidrogela sučelje elektroliti/elektrode neće se odvojiti tijekom značajnih deformacija zbog visoke viskoznosti hidrogela. Zahvaljujući široko podesivim fizikalno-kemijskim svojstvima, komponente elektrolita na bazi hidrogela s visokom ionskom vodljivošću mogle bi imati nekoliko dodatnih funkcija uključujući ultravisoku rastezljivost, snažnu sposobnost samozacjeljivanja i toleranciju na niske temperature, što će višenamjenskim superkondenzatorima omogućiti primjenu u ekstremnim radnim okruženjima. Ipak, obećavajući superkondenzatori na bazi hidrogela s različitim odličnim svojstvima i dalje se suočavaju s određenim tehnološkim izazovima¹⁴.



Slika 6. Shema elektrode rađene na bazi hidrogela¹⁵

2.2. Poli(vinil-alkohol)

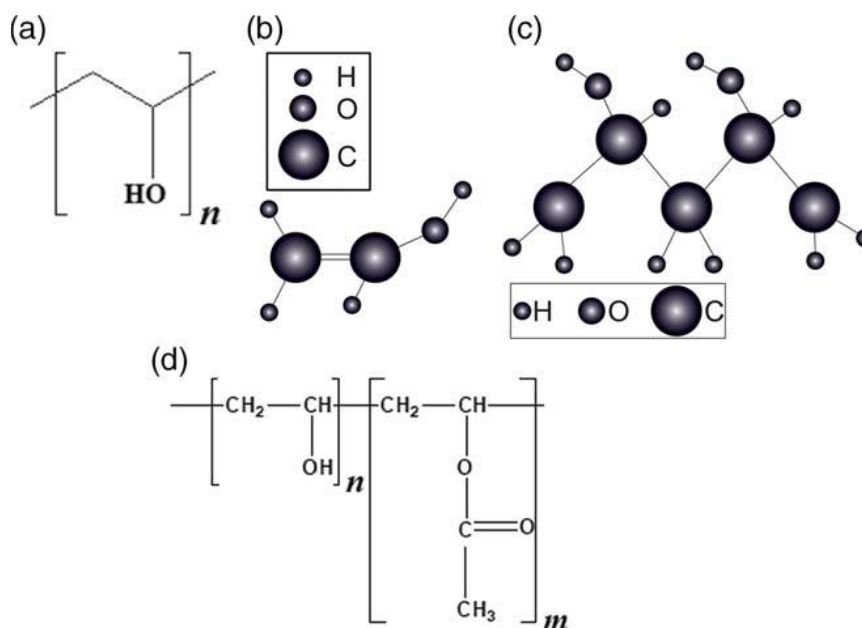
Poli(vinil-alkohol) jedan je od vrlo važnih sintetskih polimera te najvažniji komercijalni vodotopljivi polimer koji se naširoko primjenjuje već nekoliko desetljeća. Označava se kao PVOH, PVA ili PVAL. Kemijska formula PVA može se prikazati kao $(C_2H_4O)_n$, gdje se stupanj polimerizacije n kod komercijalno dostupnih vrsta nalazi u rasponu od 500 do 5000, što je ekvivalentno molekulskoj masi u rasponu od 20 000 do 200 000¹⁶.

PVA dolazi kao prozirni, bijeli ili žućkasti granulirani ili praškasti materijal bez mirisa i okusa^{16,17}. PVA se obično dijeli u dvije kategorije: djelomično hidrolizirani i potpuno hidrolizirani. Primjerice, u prehrambenoj se industriji koristi djelomično hidrolizirani PVA¹⁶. Na tržištu su dostupne različite vrste PVA, ovisno o stupnju polimerizacije, viskoznosti i stupnju hidrolize^{17,18}.

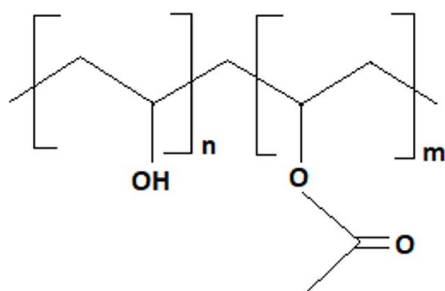
PVA je jedinstven među polimerima jer se ne dobiva polimerizacijom svog strukturnog monomera, vinil-alkohola, zbog njegove nestabilne prirode^{16,17}. Osnovna sirovina, tj. monomer za komercijalnu proizvodnju PVA je vinil-acetat¹⁷. Strukture PVA monomera te potpuno i djelomično hidroliziranog PVA prikazane su na slici 7. Za sintezu PVA provodi se otapanje poli(vinil-acetata) (PVAc) u alkoholu kao što je metanol i obrada alkalnim katalizatorom kao što je natrijev hidroksid. Rezultirajuća reakcija hidrolize ili "alkoholize" uklanja acetatne skupine iz molekula PVAc bez narušavanja dugolančane strukture, odnosno dolazi do kemijske modifikacije acetatnih skupina u alkoholne skupine. Budući da je ova reakcija često nedovršena, PVA također može biti kratica za kopolimer vinil-acetata i vinil-alkohola, P(VAc-co-VA) (slika 8). Kada se reakcija odvije do kraja, dobije se produkt koji je visoko topljiv u vodi i praktički netopljiv u svim organskim otapalima. Nepotpuno uklanjanje acetatnih skupina

daje produkte koje su manje topljivi u vodi, a više topljivi u određenim organskim otapalima¹⁶. Duljina vremenskog razdoblja reakcije saponifikacije određuje stupanj hidrolize PVA¹⁷.

Mnoštvo hidroksilnih skupina u PVA lancu dovodi do stvaranja vodikovih veza između molekula i unutar molekula, što utječe na kretanje molekularnog lanca i kristalizaciju PVA. Kristalnost u određenoj mjeri utječe na fizikalna i mehanička svojstva, kao što su tvrdoća, prozirnost, vlačna čvrstoća i otpornost na otapala¹⁹. Vodikova veza u PVA kontrolira topljivost u vodi jer amorfna područja mogu nabubriti ulaskom vode, no polimer se neće otopiti dok se ne razgradi kristalna struktura. PVA se otapa u vodi na temperaturi između 80 i 90 °C uz 30 min neprekidnog miješanja¹⁶. Zbog višestrukih hidroksilnih i jakih vodikovih veza, temperatura taljenja viša je od temperature razgradnje, odnosno PVA se razgrađuje prije taljenja, a područje termoplastične obrade je usko. Za poboljšanje kristalnosti PVA i modifikaciju fizikalnih i kemijskih svojstava, često mu se dodaju različiti plastifikatori, anorganska sredstva za nukleaciju i nanopunila¹⁹. Temperatura staklastog prijelaza PVA iznosi 85 °C, a temperatura taljenja 230 °C¹⁶.



Slika 7. (a) PVA monomerna struktura / potpuno hidrolizirani PVA, (b) struktura vinilnog alkohola, (c) struktura PVA i (d) djelomično hidrolizirani PVA¹⁷



Slika 8. Poli(vinil-alkohol)-ko-poli(vinil-acetat)¹⁶

Svojstva i specifična primjena PVA ovise o stupnju polimerizacije i stupnju hidrolize, odnosno broju hidroksilnih skupina prisutnih u PVA polimeru. Stupanj hidrolize određuje mnoga mehanička svojstva PVA. Primjerice, vlačna čvrstoća 99 % hidroliziranog PVA je u rasponu 67-110 MPa, dok se smanjenjem stupnja hidrolize za samo 10 % vlačna čvrstoća spušta na 24-79 MPa. Topljivost PVA u vodi jako se pogoršava kada je stupanj hidrolize ispod 30 mol %. Drugi važan aspekt koji utječe na mehanička svojstva je molekulska masa polimera. Molekulska masa komercijalno dostupnog PVA, u rasponu od 30 000 do 200 000, relativno je niska molekulska masa za radikalski polimer što se može objasniti činjenicom da zbog hidrolize vrlo često dolazi do cijepanja lanca¹⁶.

PVA karakteriziraju kemijska otpornost, velika vlačna čvrstoća, fleksibilnost, tvrdoća i visoka barijerna svojstva spram plinova i mirisa. Biorazgradljiv je, biokompatibilan i netoksičan što ga čini idealnim kandidatom za biomedicinske primjene. Posjeduje odlična optička svojstva, veliku dielektričnu čvrstoću i sposobnost pohranjivanja naboja¹⁷. U vlažnim uvjetima, njegova su svojstva umanjena zbog plastificirajućeg djelovanja molekula vode. Niske je cijene što ga čini dostupnijim od brojnih drugih polimera. Često se upotrebljava i pomiješan s ostalim polimerima, kao što su biopolimeri i ostali polimeri s hidrofilnim svojstvima, jer poboljšava svojstva formiranja filma²⁰.

Glavni proizvođači PVA su Europa, Japan, SAD i Kina¹⁷. Za proizvodnju PVA filma koriste se dvije tehnologije – lijevanje iz viskozne vodene otopine ili ekstruzija puhanjem iz taline. Plastični predmeti na bazi PVA filma uglavnom se dobivaju tehnikama lijevanja. Međutim, zbog interesa za biorazgradljivim filmovima na bazi PVA, razvijena je tehnologija obrade taljenjem. Neposredna blizina točke taljenja i temperature raspadanja glavna je poteškoća kod PVA termičke ekstruzijske obrade. Toplinska degradacija PVA obično počinje na oko 150 °C

ili iznad, ovisno o vrsti PVA (stupnju hidrolize i pH). Kako bi se poboljšala toplinska stabilnost i svojstva obrade PVA, koriste se razni plastifikatori¹⁸.

PVA se, pored medicine, primjenjuje u industrijskim, komercijalnim i prehrambenim sektorima gdje se koristi kao vezivo, premaz, emulgator i adheziv. Značajna je njegova primjena u papirnoj i tekstilnoj industriji kod premazivanja papira i dimenzioniranja tekstila^{18,19}.

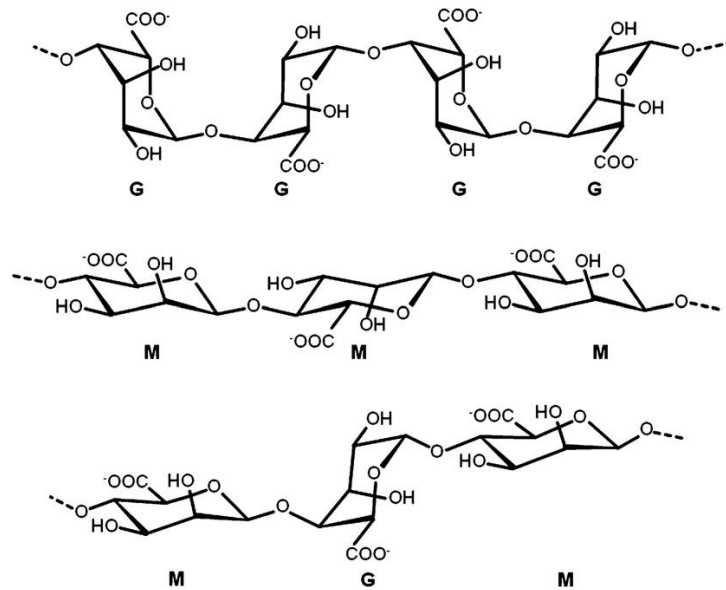
2.3. Natrijev alginat

Natrijev alginat natrijeva je sol alginske kiseline. To je prirodni polisaharid linearne strukture povoljan za primjenu u širokom rasponu industrijskih područja zbog svojih dobrih svojstava. Označava se kao SA (engl. *sodium alginate*). Niske je cijene i jednostavan je za obradu, a karakteriziraju ga svojstva netoksičnosti, biorazgradljivosti, biokompatibilnosti te efekt stvaranja gela²¹. Siguran je za organizam te pruža čvrstoću i fleksibilnost tkivu pa se koristi i u naprednim područjima kao što je medicina²².

Komercijalno dostupni natrijev alginat obično se ekstrahira iz stanične stijenke raznih vrsta smeđih algi (lat. *Phaeophyceae*). Najprije se prikupljene alge osuše i usitne nakon čega slijedi obrada vodenim otopinama lužina, a to je najčešće NaOH. Smjesa se filtrira, a filtratu se dodaje natrijev klorid kako bi se istaložio natrijev alginat. Nakon daljnjeg pročišćavanja i pretvorbi, dobiva se natrijev alginat u obliku bijelog ili žućkastog praha, koji je topljiv u vodi. Natrijev alginat može se prevesti u alginsku kiselinu obradom razrijeđenom kloridnom kiselinom. Za biomedicinske je primjene posebno važno provesti kemijsku obradu i pročišćavanje alginata kako bi se uklonile nečistoće (teški metali, proteini, ugljikohidrati i polifenoli)^{22,23}.

Alginat se također može proizvesti iz dviju bakterijskih kultura: *Azotobacter* i *Pseudomonas*. Nedavni napredak u regulaciji biosinteze alginata iz bakterija te relativna lakoća modifikacije bakterija omogućavaju proizvodnju alginata s prilagođenim svojstvima i širokom primjenom u biomedicini²³.

Prema strukturi, natrijev alginat polianionski je kopolimer čija je kemijska formula $(C_6H_7NaO_6)_n$. To je natrijeva sol alginske kiseline, kiseline koja se sastoji od nekoliko uzastopnih frakcija (blokova) dviju uronskih kiselina: β -D-manuronske kiseline (M) i α -L-glukuronske (G), koje su međusobno linearno povezane 1-4 glikozidnim vezama (slika 9). Omjer u kojem su te dvije frakcije prisutne u strukturi varira, ovisno o prirodnom izvoru²².



Slika 9. Kemijske strukture G-bloka, M-bloka i izmjeničnog bloka u alginatu²²

Postoji oko 200 različitih vrsta alginata s različitim molekulskim masama i/ili kemijskim sastavom elemenata²⁴. Svojstva alginata mogu varirati ovisno o prirodnom izvoru iz kojeg su ekstrahirani kao i o godišnjem dobu i geografskom položaju s kojeg je biljka ubrana. Komercijalni natrijev alginat ima molekulsku masu između 32 000 i 400 000. Na fizikalno-kemijska svojstva alginata, utječe nekoliko parametara, npr. sastav i raspored G i M blokova u strukturi, molekulska masa alginata, vrste funkcionalnih skupina u strukturi itd²².

Natrijev alginat ima sposobnost formiranja gela (želiranja) u prisutnosti dvovalentnih iona (Ca^{2+}). Alginatni hidrogelovi imaju loša mehanička svojstva, osobito kada su hidratizirani u vodi, a ona se obično poboljšavaju povećanjem duljine G-bloka i molekulske mase. Imaju vrlo nisku električnu i toplinsku vodljivost, vrlo slabu aktivnost vezanja stanica te nemaju antibakterijsko djelovanje što je bitno za različite napredne primjene kao što je inženjerstvo tkiva. Ako se navedena svojstva poboljšaju, područja primjene ovog biopolimera mogu se povećati²⁴.

FDA (engl. *Federal Drug Administration*) odobrila je upotrebu natrijevog alginata u prehrambenoj, biomedicinskoj i farmaceutskoj industriji zbog njegove netoksičnosti i biokompatibilnosti. Može se primjenjivati kao pomoćna tvar za različite farmaceutike namijenjene oralnoj primjeni jer je siguran, netoksičan i ne nakuplja se u tijelu. Zbog svoje sposobnosti keliranja, može se vezati za razne teške metale prisutne u crijevima štiteći tijelo od njihovih učinaka. Za primjene alginata u biomedicinskom i farmaceutskom području, nužno je

da bude siguran za tijelo i biokompatibilan, odnosno da ima visoku čistoću. Što se tiče biorazgradljivosti, kod sisavaca enzimska razgradnja alginata nije moguća zbog odsutnosti enzima alginaze te se alginati srednje ili visoke molekulske mase ne mogu u potpunosti eliminirati bubrezima jer se sporije filtriraju²². Zbog toga se kod alginatnih hidrogelova prethodno kontrolira kinetika razgradnje, npr. variranjem molekulske mase alginata i ugradnjom biorazgradljivih poprečnih veza. Drugi je pristup za ubrzanje razgradnje alginata sinteza oksidiranih alginata, budući da povećanje stupnja oksidacije može povećati osjetljivost alginatnih hidrogelova na hidrolizu²⁵.

Osim već spomenutih primjena u medicini i farmaciji, značajna je primjena natrijevog alginata u kemijskoj, tekstilnoj, ambalažnoj i građevinskoj industriji gdje se koristi za proizvodnju kozmetike, tekstilne tinte, biorazgradljive ambalaže, deterdženata, ljepila te za zavarivanje i izolaciju zgrada²⁴.

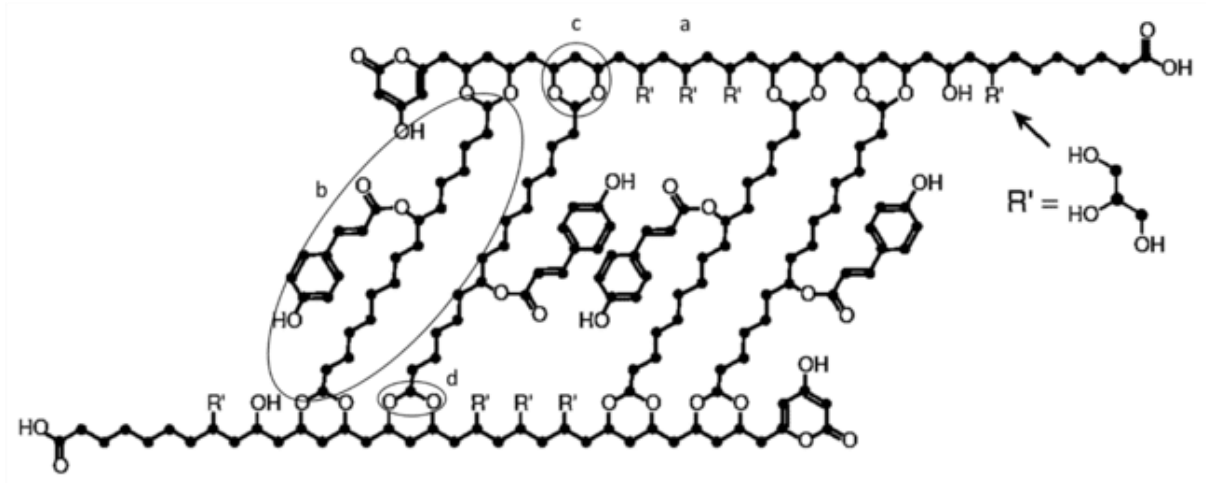
2.4. Pelud

Peludna zrnca nalaze se u prašnicima biljaka te se razlikuju po obliku, boji, veličini i masi, ovisno o biljnoj vrsti. Veličina im je obično od 2,5 do 250 μm , a boja raznolika, od svijetložute do crne. Pelud je vrlo raznolik biljni proizvod bogat biološki aktivnim tvarima. Njezin kemijski sastav uvelike ovisi o biljnom izvoru i geografskom porijeklu, zajedno s drugim čimbenicima kao što su klimatski uvjeti, vrsta tla te rasa i aktivnost pčela. U peludnim zrcima različitih biljnih vrsta pronađeno je oko 250 tvari. U skupini osnovnih kemijskih tvari nalaze se bjelančevine, slobodne aminokiseline, ugljikohidrati, lipidi (trigliceridi, fosfolipidi) i masne kiseline, polifenolni spojevi (flavonoidi), enzimi i koenzimi te vitamini i bioelementi²⁶.

Zrnca peludi obavijena su dvoslojnom stijenkom. Unutarnja stijenka naziva se intin, a vanjska eksin²⁶. Eksin je uglavnom građen od sporopolenina, visokootpornog biopolimera na bazi lipida i fenola. Kod nekih biljnih vrsta može biti obojen te sadržavati karotenoide i flavonoide koji mogu zaštititi zrnca peludi od štetnih učinaka Sunčevog zračenja. Osim toga, flavonoidi mogu štititi peludna zrna od napada patogena^{27, 28}.

Upravo zbog izražene kemijske otpornosti sporopolenina, pelud ima sposobnost prenošenja na velike udaljenosti i preživljavanja nepovoljnih okolišnih uvjeta. Ipak, takva ekstremna kemijska inertnost sporopolenina predstavlja izazov kod određivanja strukture te je, unatoč važnosti sporopolenina, njegova struktura sve do nedavno bila neistražena²⁹.

U studiji iz 2019. godine, metodama tioacidolize i NMR-a čvrstog stanja, detaljno je određena molekulska struktura sporopolenina smolastog bora (*Pinus rigida*) (slika 10). Pokazano je da sporopolenin ove vrste bora u svojoj strukturi, između ostalog, sadrži velikim dijelom i jedinice poli(vinil-alkohola)²⁹.



Slika 10. Strukturni model sporopolenina bora (*P. rigida*) s naglašenim glavnim skupinama i vezama²⁹

U svojoj unutrašnjosti, peludna zrnca sadrže muške spolne stanice³⁰ dok se na površini vanjskog omotača eksina nalazi sloj balzama što olakšava lijepljenje peludi na tijelo pčela te brojni otvori i brazde²⁶. Mekani otvori, tzv. aperture, područja su u ljusci gdje je sloj eksina istanjen ili ga uopće nema³¹. Taj se materijal aperture naziva intinom³², većinom je građen od celuloze i pektina što ga posljedično čini mekšim od eksina pa se aperture ponašaju kao fleksibilna područja u inače krutom omotaču³¹. U kontaktu peludnog zrnca s vrhom (njuškom) tučka, iz aperture počinje rasti peludna cijev. Peludna cijev raste od vrha tučka do dna tučka (plodnice), te može biti od 80 do 100 puta duža od peludnog zrnca. Njezin rast omogućen je zahvaljujući nutrijentima koje uzima s njuške tučka. Kroz tu cijev dolazi do prijenosa muške spolne stanice iz zrna peludi do ženske spolne stanice na dnu tučka. Tu se događa oplodnja, a nakon toga rast ploda³⁰.

Postoje dva različita evolucijska smjera u formaciji peludnih zrna i u njihovoj mehanici; jedan tip peludnih zrnaca razvio je trend izduženih apertura dok je kod drugih područje aperture značajno reducirano i obično je kružnog oblika. Izdužene aperture ili „kolpusi“ značajni su za

entomofilne biljke, odnosno biljke koje oprašuju kukci. Cirkularna apertura ili „pora“ karakteristična je za anemofilne biljke, tj. biljke koje se oprašuju vjetrom³².

Izmjena vode između peludnog zrnca i okoline uglavnom se odvija kroz aperture³¹. Primjerice, u suhom okruženju dolazi do njihovog zatvaranja i popratnog izduživanja što je mehanički odgovor koji sprečava daljnje isušivanje i uništavanje zrna. Biljke evoluiraju na mehanički način, u smislu da su sposobne ublažiti deformaciju i kolaps zrna uslijed isušivanja tako da ta deformacija bude polagana i povratna, tj. da se pelud vrati natrag u svoje početno stanje kada dođe u kontakt s vodom³⁰. Kada zrno dosegne određenu razinu hidratacije aperture će, kao mekši, slabiji dijelovi stanične stijenke zrna, prve puknuti jer prolaze kroz brzo napuhavanje kada zrno nabubri do kritične mjere. Napuhavanje se javlja kao nagli prijelaz te može izazvati pucanje zrna i oslobađanje njegovog citoplazmatskog sadržaja. Razumijevanje pucanja peludi važno je ne samo iz perspektive održivosti zrna i oplodnje biljaka, već i u kontekstu ljudskog zdravlja jer puknuta zrna u zraku mogu osloboditi fragmente koji mogu izazvati alergijske reakcije kod ljudi (alergeni). Zrnca, a posebno fragmenti citoplazme koje ispuštaju kada se rasprsnu, također mogu djelovati kao učinkovita mjesta nukleacije za kondenzaciju oblaka što može utjecati na oborine. Pucanje peludnih zrnaca u atmosferi zato je i meteorološki relevantno. Pucanje zrna presudno ovisi o prisutnosti pora, tj. o veličini pora i njihovoj mekoći. Manje pore manje su sklone pucanju jer se pucanje neće dogoditi sve dok zrno ne nabubri u velikom opsegu³¹. Dakle, što je apertura mekša, a otvor veći, apertura će ranije ekspanzirati. Bilo bi poželjno da je apertura što veća ili da ih ima u većem broju kako bi došle u direktni kontakt s tučkom. S druge strane, aperture su mehanička slabost jer se povećava vjerojatnost da se oplodni potencijal zrna izgubi dok su peludna zrnca u zraku³⁰.

Dokazan je niz povoljnih djelovanja peludi, poput antifungalnog, antimikrobnog, antivirusnog, protuupalnog i imunostimulirajućeg djelovanja. Također ima djelovanje kao lokalni analgetik, a olakšava i proces zacjeljivanja opekline rane. Uz to, vrijedan je dodatak prehrani pri čemu je zrnca preporučljivo mehanički usitniti ili namočiti kako bi nabubrila i ispustila svoj sadržaj²⁶.

Etanolni ekstrakti peludi imaju prilično jaku antimikrobnu aktivnost koja je učinkovita na Gram-pozitivne bakterije, na primjer na *Staphylococcus aureus*, i na Gram-negativne bakterije kao što je *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa* te na gljive kao što je *Candida albicans*. Odgovornost za ovu aktivnost leži u flavonoidima i fenolnim kiselinama, ali i masne kiseline i fitosteroli sudjeluju u procesu uništavanja mikroorganizama²⁶.

2.5. Hidrogelovi s peludi

Još uvijek nema dovoljno studija o hidrogelovima s peludi. U jednom istraživanju iz 2015. godine sintetiziran je hidrogel s akrilnom matricom modificiran pčeljinom peludi te je razmatran potencijal upotrebe modificiranog hidrogela u biomedicinske svrhe. Akrilni hidrogelovi već se koriste kao materijali za zavoje, a daljnja bi se ispitivanja trebala usredotočiti na prednosti dodavanja peludi u matrice hidrogela. Očekuje se da bi tako modificirani zavoji imali protuupalna i antiseptička svojstva, a također bi ubrzali vrijeme cijeljenja rane. U spomenutoj studiji, analizom SEM fotografija peludi uočeno je da površina peludi nije glatka i na njoj se nalaze pore. Zbog toga se, kako je bilo i očekivano, postiglo relativno dobro prijanjanje matrice akrilnog hidrogela na takvu površinu. Svojstva bubrenja akrilnog hidrogela nisu se značajno promijenila dodatkom peludi. Stoga postoji velik potencijal da se hidrogel modificiran peludi može koristiti u istim primjenama kao i nemodificirani hidrogel. Stabilnost dobivenih hidrogelova modificiranih peludi, ispitana je pH mjerenjima tijekom 32 dana inkubacije u određenim tekućinama. Provedena pH mjerenja tijekom inkubacije pokazuju značajne promjene pH vrijednosti samo prva četiri dana. Nisu nastupile značajne promjene u pH u modificiranim hidrogelovima prilikom inkubacije tijekom duljeg vremenskog razdoblja što potvrđuje da se matrica hidrogela ne bi razgradila u uvjetima tipičnim za biomedicinske primjene³³.

U jednoj drugoj studiji²¹ iz 2021., također je razmatran utjecaj peludi na svojstva dobivenog materijala. Proizveden je nano-strukturirani vlaknasti mat od natrijevog alginata i poli(vinil-alkohola) s pčelinjom peludi. Zbog povoljnih svojstava peludi i biokompatibilnosti alginata, ovaj materijal ima potencijal za upotrebu u različitim medicinskim primjenama. U pripremi je kao otapalo korištena voda što je pokazalo da se pelud može inkapsulirati u nanovlakna na bazi alginata bez upotrebe štetnih otapala pa takav pristup nema negativnih posljedica za ljudsko zdravlje i ekološki je prihvatljiv. Viskoznost otopine povećavala se kako se povećavala koncentracija peludi što može biti posljedica stvaranja vodikovih veza između peludi i smjese polimera SA/PVA. Prisutnost peludi u SA/PVA otopini povećala je vodljivost otopine. SEM slike pokazale su da površina SA/PVA nanovlakana s peludi ima nekoliko defektnih struktura s prosječnim promjerom od oko 100 nm. Sićušna vlakna i vrlo porozna struktura nanovlakana prednost su u medicinskim primjenama kao što su zavoji za rane i implantati. Zbog ovih značajki, nanovlakna mogu oponašati izvanstaničnu matricu normalne kože ili tkiva i pomoći u promicanju rasta i širenja stanica. DSC termogram pokazao je da je dodavanje pčelinje peludi u otopinu SA/PVA polimera izazvalo značajnu promjenu u temperaturi staklastog prijelaza.

Može se pretpostaviti da je pelud smanjila pokretljivost segmenata polimera, a nefleksibilne skupine povećale su staklište nanovlaknastog materijala. Stvaranje vodikovih veza između pčelinje peludi i SA/PVA uzrokuje poboljšanje kompaktnosti i pravilnosti polimernih lanaca. Ova studija pokazuje kako se ekološki prihvatljivi nanovlaknasti materijali s peludi mogu dizajnirati za upotrebu u širokom rasponu područja, uključujući medicinske primjene kao što su zavoji za rane. Međutim, ove je materijale potrebno detaljnije istražiti²¹.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

- Poli(vinil-alkohol), PVA, $(C_2H_4O)_n$, molekulska masa = 22 000, viskoznost (20 °C, 4 % vode) = 5,0-6,0 mPas, stupanj hidrolize = min 98 %, gubitak nakon sušenja = max 5 % (BDH Prolabo, Velika Britanija)
- Natrijev alginat, SA, $NaC_6H_7O_6$, viskoznost = niska (Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Njemačka)
- Pelud „Cvjetni prah Tikveško blago“, sastojci = cvjetni prah (pelud) 100 % (ekološki uzgoj) (PTO Lidera, Hrvatska)
- Razblaženi etanol (Aethanolum Dilutum 70 % V/V), CH_3CH_2OH (Gradska ljekarna Zagreb, Galenski laboratorij, Hrvatska)
- Fiziološka otopina, NaCl 0,9 % (B. Braun Adria d.o.o., Hrvatska)
- Destilirana voda, H_2O (Meteor d.d. Đakovo, Hrvatska)

3.2. Priprema hidrogelova

U sklopu ovog diplomskog rada, pripremljene su tri vrste hidrogela: hidrogel bez peludi, hidrogel s 5 % pročišćene peludi te hidrogel s 5 % nepročišćene peludi. Kao baza za sve tri vrste hidrogela, korišteni su praškasti poli(vinil-alkohol) i natrijev alginat (slika 11), u omjeru 10:1, dok se kao otapalo koristila destilirana voda. Kao dodatak koristila se pročišćena i nepročišćena pelud (slika 12).

Korišteno je sljedeće laboratorijsko posuđe i pribor: magnetna miješalica s grijanjem, vodena kupelj, laboratorijske čaše, satno stakalce i folija za poklapanje čaše, magnet za miješanje, menzura, plastične posudice za zamrzavanje hidrogelova, zaštitne rukavice i zaštitne naočale. Zaštitne rukavice na rukama, posudice u kojima će se oblikovati hidrogelovi, kao i sav pribor za rukovanje hidrogelovima (žličice, pincete itd.) prije upotrebe je bilo potrebno prebrisati vatom uronjenom u medicinski alkohol.

Nekoliko dana prije same pripreme hidrogelova, proveden je postupak pročišćavanja peludi. Na 10 g peludi dodano je 100 mL medicinskog alkohola, razblaženog etanola (70 % V/V). Suspenzija je postavljena na magnetnu miješalicu da se miješa 90 minuta na sobnoj temperaturi.

Nakon isteka zadanog vremena, suspenzija je prelivena na ravnu plohu (tanjur) i prekrivena poklopcem s rupicama te je ostavljena stajati nekoliko dana da se osuši.



Slika 11. Komponente za pripremu hidrogelova: poli(vinil-alkohol) (lijevo) i natrijev alginat (desno)



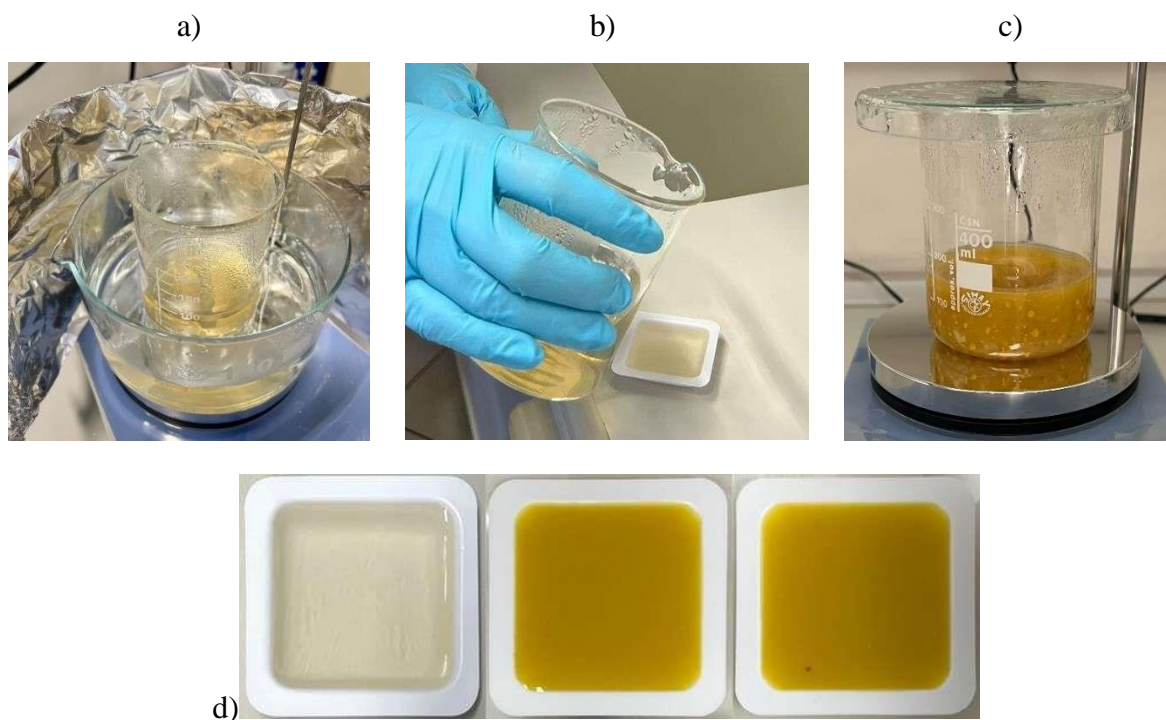
Slika 12. Nepročišćena pelud (lijevo) i pročišćena pelud (desno)

Postupak pripreme hidrogelova bio je sljedeći: na početku je bilo potrebno zagrijati otapalo, destiliranu vodu, na 95 °C. Nakon postizanja navedene temperature vode, u nju su stavljeni izvagani poli(vinil-alkohol) i natrijev alginat. Provedeno je miješanje na magnetnoj miješalici brzinom 250 o/min⁻¹ na 95 °C da se PVA i Na-alginat u potpunosti otope što je vremenski trajalo oko 45 minuta (slika 13a). Nakon toga je iz otopine izvađen magnet pomoću magnetnog štapića, a otopina je podijeljena na dva dijela:

a) 1/3 ukupnog volumena vruće otopine odmah je izlivena u prikladne posudice (slika 13b),

b) 2/3 ukupnog volumena ostavljene su da se ohlade do sobne temperature. Zatim se na miješalici umiješalo toliko pročišćene/nepročišćene peludi tako da njen udio u hidrogelu bude 5 mas % (slika 13c). Nastala suspenzija potom je također izlivena u posudice.

Pripremljene otopine u posudicama prikazane su na slici 13d, a njihov sastav dan je u tablici 1.



Slika 13. Postupak pripreme hidrogelova: a) otapanje PVA i Na-alginata u destiliranoj vodi, b) izlivanje vruće otopine u posudice, c) umješavanje peludi, d) posudice s pripremljenim otopinama (bez peludi, s pročišćenom peludi i s nepročišćenom peludi)

Tablica 1. Sastav pripremljenih hidrogelova

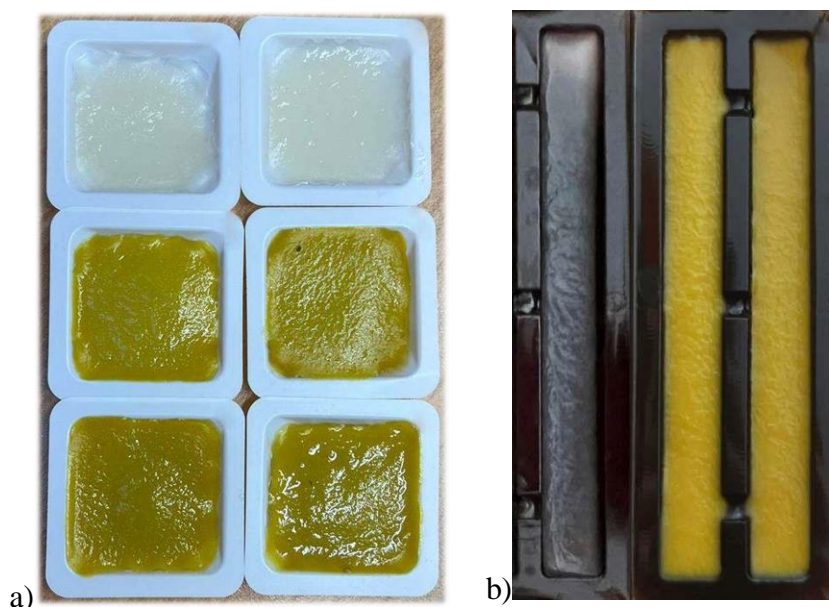
OZNAKA	BAZA HIDROGELA	OTAPALO	DODATAK
hidrogel 1	15 g PVA + 1,5 g Na-alginata	150 mL destilirane vode	/
hidrogel 2	15 g PVA + 1,5 g Na-alginata	150 mL destilirane vode	5 mas % pročišćene peludi (8,325 g)
hidrogel 3	15 g PVA + 1,5 g Na-alginata	150 mL destilirane vode	5 mas % nepročišćene peludi (8,325 g)

Geliranje hidrogelova provedeno je fizikalnim putem, ciklusima zamrzavanje/odmrzavanje. Posudice su prvo stavljene su zamrzivač ($T \approx -18 \text{ }^\circ\text{C}$) na 3 h, nakon čega su izvađene iz zamrzivača te ostavljene stajati 6 h na sobnoj temperaturi. Ciklus zamrzavanje 3 h / odmrzavanje 6 h ponovljen je još 5 puta. Dakle, provedeno je ukupno 6 ciklusa zamrzavanje/odmrzavanje. Nakon 6 ciklusa, posudice s formiranim hidrogelovima ostavljene su u hladnjaku sve do provođenja karakterizacije hidrogelova.

3.3. Karakterizacija hidrogelova i peludi

Nakon što su hidrogelovi pripremljeni postupkom zamrzavanja i odmrzavanja (slika 14), provedena je njihova karakterizacija, i to: određivanje sadržaja vode u hidrogelu sušenjem, bubrenje hidrogela u vodi i u fiziološkoj otopini, FTIR spektroskopija, određivanje vodljivosti hidrogela, snimanje mikroskopom, određivanje antimikrobnih svojstava, praćenje pojave plijesni na hidrogelu, ispitivanje zacjeljivosti, praćenje gubitka vode i regeneracija hidrogela, te određivanje mehaničkih svojstava (tvrdoća, lomno produljenje)

Na čistoj peludi provedena je FTIR spektroskopija, snimanje mikroskopom te određivanje antimikrobnih svojstava.



Slika 14. Pripremljeni hidrogelovi nakon 6 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja u kalupima: a) u kvadratnim posudicama, b) u posudicama u obliku epruveta za mehanička ispitivanja

3.3.1. Sušenje hidrogelova

Sušenje hidrogelova provodilo se pri 100 °C u sušioniku *Memmert* u trajanju od 24 h (slika 15). Mjerila su se tri uzorka svakog hidrogela. Uzorci su najprije izvagani te su potom stavljeni na Petrijevu zdjelicu i zatim u sušionik. Nakon 24 h, uzorci su ohlađeni na sobnu temperaturu te su ponovno izvagani.



Slika 15. Sušionik *Memmert*

3.3.2. Bubrenje hidrogelova

Bubrenje hidrogelova provodilo se u destiliranoj vodi i u 0,9 % NaCl fiziološkoj otopini. Za određivanje stupnja bubrenja u svakoj od tekućina, provedena su tri mjerenja za svaki hidrogel. Uzorci su najprije izvagani te su potom pojedinačno stavljeni u čaše, u koje je dodano 30 mL destilirane vode, odnosno 30 mL fiziološke otopine. Čaše su bile zatvorene aluminijskom folijom. Vaganje je slijedilo nakon 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 i 240 min te nakon 24 h. Prije svakog vaganja, uzorci su bili obrisani papirnatim ručnikom kako bi se uklonio višak tekućine s njihove površine.

3.3.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)

FTIR spektri snimljeni su za dobivene hidrogelove, pročišćenu i nepročišćenu pelud te za čisti poli(vinil-alkohol) i natrijev-alginat, na spektrofotometru Spectrum One Perkin Elmer (slika 16). Korištena je ATR komora, mjerno područje bilo je između 4000 i 650 cm^{-1} , a spektralna

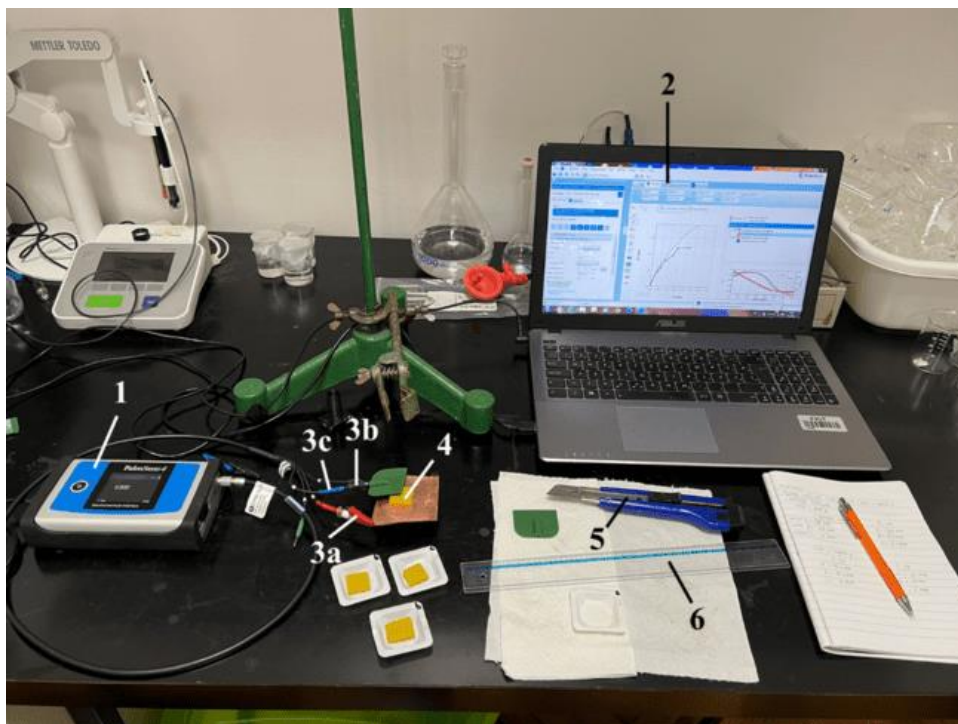
rezolucija 4 cm^{-1} . Prethodna priprema uzoraka nije bila potrebna. Kao rezultat mjerenja, na računalu su dobiveni FTIR spektri.



Slika 16. FTIR spektrometar *Spectrum One* (Perkin Elmer)

3.3.4. Određivanje vodljivosti hidrogelova

Elektrokemijska mjerenja provedena su na svježe pripremljenim hidrogelovima dobivenima nakon ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja. Vodljivost hidrogelova određena je elektrokemijskom impedancijskom spektroskopijom (EIS). Elektrokemijska impedancijska spektroskopija (EIS) pouzdana je i nedestruktivna metoda pogodna za mjerenja u elektrokemijskim sustavima. Na početku je svaki uzorak hidrogela bilo potrebno izrezati tako da ima što ravniju površinu kako bi se što bolje mogla odrediti vodljivost. Zatim su izrežanim uzorcima bile izmjerene dimenzije. Za svaki uzorak, provedena su dva mjerenja (kada se rezultati ne bi blisko poklapali, bilo je potrebno raditi i treće mjerenje). Raspon frekvencija prilikom mjerenja bio je između 0,01 i 100 000 Hz. Aparatura za mjerenje vodljivosti (slika 17) sastoji se od potencioštata *PalmSens4* spojenog kablovima s računalom (računalni program PStTrace 5.7) i s tri elektrode – radnom, referentnom i protuelektrodom. Mjerenja su se provodila na dva načina, između gumene pločice spojene s referentnom elektrodom i bakrene pločice koja predstavlja radnu elektrodu te između dvije gumene pločice spojene s elektrodama (radnom i referentnom).

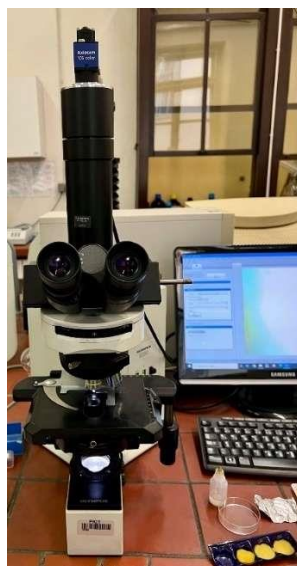


Slika 17. Aparatura za elektrokemijsko ispitivanje vodljivosti hidrogelova:

1) potencijostat *PalmSens4*, 2) računalo – softver *PSTrace*, 3) elektrode (a – radna, b – referentna, c – protuelektroda), 4) uzorak – hidrogel, 5) skalpel za rezanje uzorka, 6) ravnilo

3.3.5. Snimanje svjetlosnim mikroskopom

Morfologija pročišćene i nepročišćene peludi, hidrogela bez peludi i hidrogela s pročišćenom peludi praćena je primjenom svjetlosnog mikroskopa *Olympus BX50 DP10*, spojenog s digitalnom kamerom koja je povezana s računalom (slika 18). Snimljeni podaci obrađeni su računalnim programom *Stream Essentials*. Uzorak je nanesen na staklenu pločicu te je snimljena slika suhog uzorka i uzorka u kapljici vode, pri uvećanjima 100 i 400 puta.

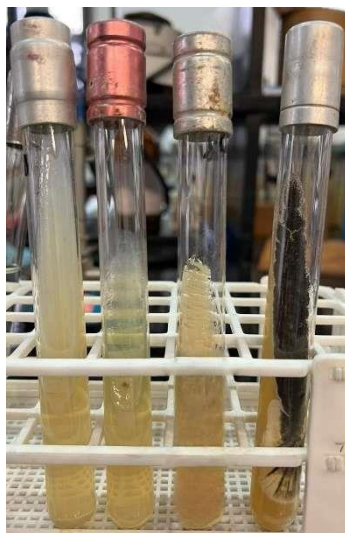


Slika 18. Svjetlosni mikroskop s digitalnom kamerom *Olympus BX50 DP10*

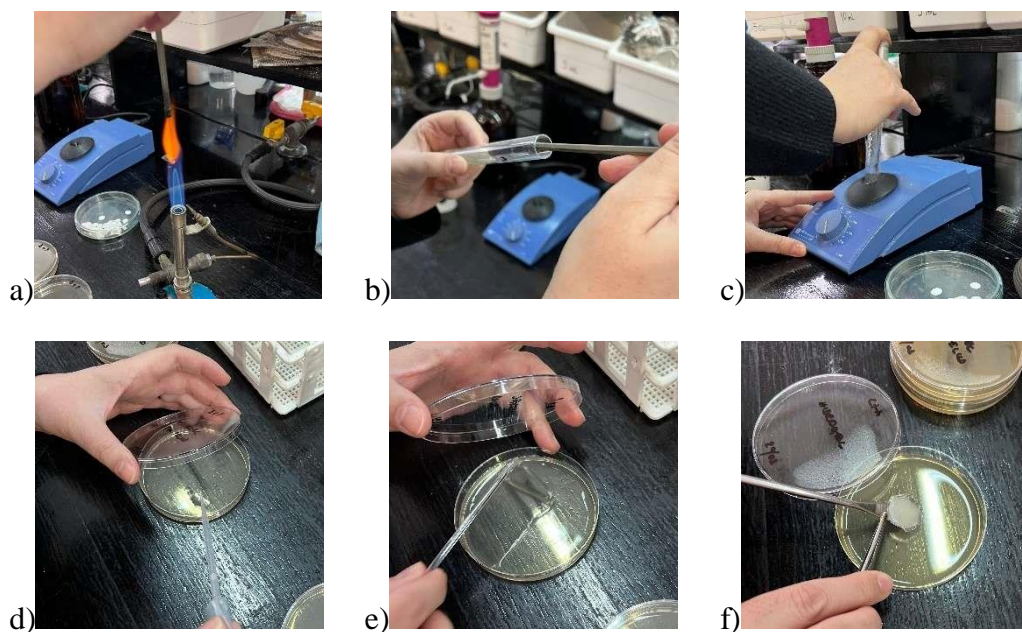
3.3.6. Određivanje antimikrobnih svojstava hidrogelova i peludi

Antimikrobna svojstva hidrogelova i pročišćene peludi ispitana su Kirby-Bauer disk difuzijskom metodom. Osnovni princip te metode difuzija je uzorka (obično je to disk od filter papira natopljenog uzorkom), za koji se pretpostavlja da ima antimikrobna svojstva, u krutu hranjivu podlogu na koju je postavljen, u kojoj se nalaze bakterijska ili gljivična kultura. Ako je bakterija ili gljivica osjetljiva na uzorak (lijek), ona neće rasti u zoni difuzije, tj. u zoni gdje je uzorak inhibirao njihov rast. Ta se zona naziva zona inhibicije i očitava se u mm milimetarskim mjerilom. Što je promjer zone širi, bakterijska ili gljivična vrsta više je osjetljiva na uzorak, i obrnuto. Na početku eksperimenta, dodatkom odabranih kultura u 10 mL sterilne demineralizirane vode, pripremljene su dvije suspenzije: suspenzija mješovitih bakterijskih i suspenzija mješovitih gljivičnih kultura. Od bakterija su se koristile dvije bakterijske vrste – *Bacillus subtilis* (gram-pozitivna bakterija) i *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativna bakterija) dok su se od kulture gljiva koristile *Candida lipolytica* (kvasac) i *Aspergillus niger* (plijesan) (slika 19). Sterilnom tehnikom rada 1 mL suspenzije kulture mikroorganizama preneseno je u sterilne Petrijeve zdjelice na prethodno pripremljenu hranjivu podlogu, Mueller-Hintonov agar. Uzorak svakog hidrogela postavljen je u sredinu Petrijeve zdjelice dok se pročišćena pelud rasporedila na 4 načina (disk od filter papira natopljen peludi, tor sa suhom peludi, tor s većom količinom peludi u kapljici vode te tor s manjom količinom peludi u kapljici vode). Postupak je ukratko prikazan na slici 20. Petrijeve zdjelice zatim su postavljene u obrnutom položaju u termostat ($T \sim 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ za kulturu gljiva, $T \sim 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ za kulturu bakterija)

na inkubaciju od 24 i 48 h, nakon čega su Petrijeve zdjelice izvađene iz termostata. Sve promjene zabilježene su i fotografirane te je izmjerena potencijalna zona inhibicije.



Slika 19. Dvije bakterijske vrste, *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas aeruginosa*, i dvije gljivične vrste, *Candida lipolytica* (kvasac) i *Aspergillus niger* (plijesan), slijeva nadesno na fotografiji



Slika 20. Postupak određivanja antimikrobnih svojstava: a) sterilizacija pribora, b) uzimanje čiste bakterijske kulture za suspenziju, c) homogenizacija suspenzije na vortex mikseru, d) nasijavanje suspenzije na hranjivu podlogu, e) nanošenje suspenzije ravnomjerno štapićem u obliku trokuta, f) postavljanje uzorka na površinu nasijane podloge

3.3.7. Praćenje pojave plijesni na hidrogelovima

Komadić hidrogela pincetom je stavljen u sterilnu posudicu koja je potom smještena u hladnjak. Praćena je pojava plijesni, hidrogel je fotografiran otprilike svakih mjesec dana tijekom izrade diplomskog rada.

3.3.8. Ispitivanje zacjeljivosti hidrogelova

Po jedan uzorak svakog hidrogela, prepolovljen je skalpelom, zatim su polovice stavljene u sterilnu posudicu na način da budu spojene pa u zamrzivač. Isto je ponovljeno još jednom, samo su posudice stavljene u hladnjak. Pratilo se hoće li hidrogel zacijeliti.

3.3.9. Određivanje mehaničkih svojstava hidrogelova

Prekidna čvrstoća i lomno produljenje ispitani su na uređaju *ZWICK Testing Machine*. Uzorci su bili duljine 100 mm i širine 10 mm, a mjerenje je provedeno brzinom istezanja 30 mm/min pri sobnoj temperaturi.

Tvrdoća hidrogelova nije se mogla odrediti jer su hidrogelovi u improviziranim posudicama bili predebeli i premekani te su se raspali prilikom vađenja iz posudica.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Određivanje sadržaja vode u hidrogelu sušenjem

Sadržaj (udio) vode u hidrogelu određen je gravimetrijski sušenjem uzoraka u sušioniku na 100 °C u trajanju od 24 h. Izražen je kao srednja vrijednost tri mjerenja. Na slici 21 prikazani su uzorci jednog od pripremljenih hidrogelova prije i poslije 24 h sušenja.

Sadržaj vode određen je u svim pripremljenim hidrogelovima, a računa se prema izrazu:

$$\text{sadržaj vode, \%} = \frac{m_{\text{prije sušenja}} - m_{\text{poslije sušenja}}}{m_{\text{prije sušenja}}} \cdot 100 \%$$

Primjer računa:

$$\text{sadržaj vode, \%} = \frac{(1,8306 - 0,2412) \text{ g}}{1,8306 \text{ g}} \cdot 100 \% = 86,82 \%$$

Rezultati mjerenja udjela vode u pripremljenim hidrogelovima dani su u tablici 2.

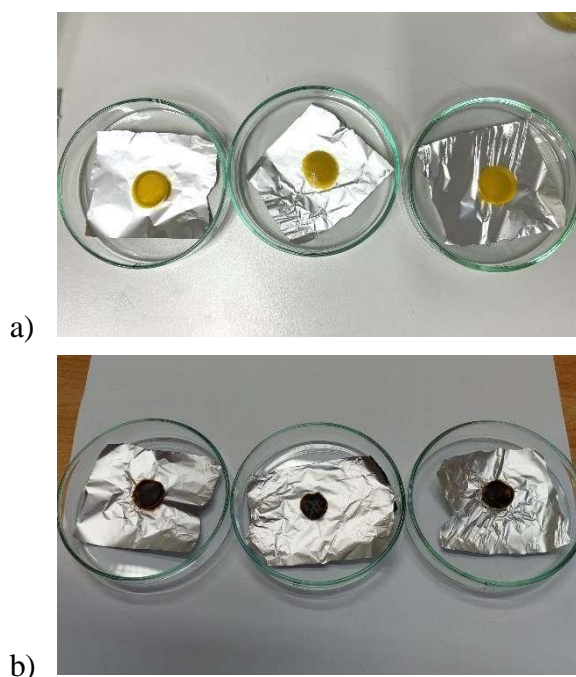
Tablica 2. Udio vode u pripremljenim hidrogelovima

HIDROGEL	bez peludi			s pročišćenom peludi		
masa prije sušenja / g	1,8306	2,1394	2,7662	0,9894	0,9001	1,1831
masa poslije 24 h sušenja / g	0,2412	0,2914	0,3534	0,1923	0,1949	0,2209
udio vode / %	86,82	86,38	87,22	80,56	78,35	81,33
udio vode / %	86,81			80,08		
HIDROGEL	s nepročišćenom peludi					
masa prije sušenja / g	0,4745	0,8829	0,6425			
masa poslije 24 h sušenja / g	0,1938	0,2593	0,2226			
udio vode / %	59,16	70,63	65,35			
udio vode / %	65,05					

Rezultati pokazuju da najveći sadržaj vode ima hidrogel bez peludi, a najmanji hidrogel s nepročišćenom peludi.

Sadržaj vode u hidrogelovima općenito može varirati u vrlo širokom rasponu, od 30 % pa do više od 99 % ukupne mase¹. Sadržaj vode može se mijenjati uslijed bubrenja/skupljanja pod utjecajem vanjskih uvjeta, kao što su temperatura, pH, ionska jakost, priroda otapala itd.³⁴. Hidrogelovi prolaze kroz značajnu promjenu volumena ili mase zbog promjene ukupnog sadržaja vode³⁵.

Voda u hidrogelu može biti u različitim stanjima: jako vezana (engl. *strongly bound water* – *SBW*) ili slabo vezana (engl. *weakly bound water* – *WBW*) za polimernu mrežu dok se određena količina ponaša kao slobodna (nevezana) voda (engl. *non-bound water* – *NBW*). Pokazalo se da količina slabo vezane vode najviše ovisi o strukturi i veličini otvora polimerne mreže, dok na sadržaj jako vezane vode uglavnom utječe kemijska struktura mreže³⁴.



Slika 21. Uzorci hidrogela s nepročišćenom peludi: a) prije sušenja, b) poslije 24 h sušenja

Općenito, kako se ukupni sadržaj vode u hidrogelu povećava, udio slobodne vode raste dok udio vezane vode opada. Svaki dodatak hidrofilnih skupina u hidrogelni sustav rezultira smanjenjem ukupnog sadržaja vode, budući da se smanjuje sadržaj slobodne vode zbog vezanja hidrofilnih skupina s molekulama vode³⁵.

Kao hidrofilni polimer, PVA sadrži mnogo hidrofilnih –OH skupina, koje mogu lako formirati vodikove veze sa slobodnim molekulama vode³⁵.

Kod hidrogelova s peludi, osim poli(vinil-alkohola) i natrijevog alginata, prisutna je i pelud. Hidrogelovi su pripremljeni u istim posudicama kao i hidrogelovi s peludi. U istom je volumenu prisutno manje mjesta koja može zauzeti slobodna voda. To je moguće objašnjenje zašto hidrogelovi s peludi imaju manji sadržaj vode od hidrogela bez peludi.

4.2. Određivanje ravnotežnog stupnja bubrenja

Stupanj bubrenja hidrogelova određen je nakon bubrenja uzoraka na sobnoj temperaturi u destiliranoj vodi i u 0,9 % NaCl fiziološkoj otopini, u periodu od 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 i 240 min te 24 h. Za svaki uzorak hidrogela, stupanj bubrenja izražen je kao srednja vrijednost tri mjerenja.

Stupanj bubrenja računa se prema izrazu:

$$\text{stupanj bubrenja } (\alpha), \% = \frac{m_{\text{poslije bubrenja}} - m_{\text{prije bubrenja}}}{m_{\text{prije bubrenja}}} \cdot 100 \%$$

Primjer računa (za hidrogel bez peludi poslije 30 min bubrenja):

$$\text{stupanj bubrenja } (\alpha), \% = \frac{0,9091 \text{ g} - 0,8091 \text{ g}}{0,8091 \text{ g}} \cdot 100 \% = 12,36 \%$$

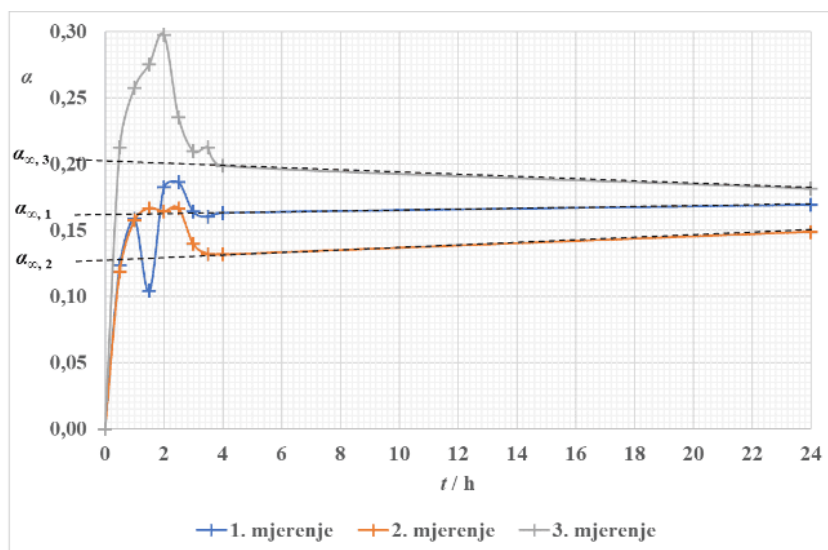
Rezultati svih mjerenja prikazani su grafički na slikama 22-27 te tablično u tablici 3.

Tablica 3. Stupanj bubrenja hidrogelova u destiliranoj vodi i u fiziološkoj otopini

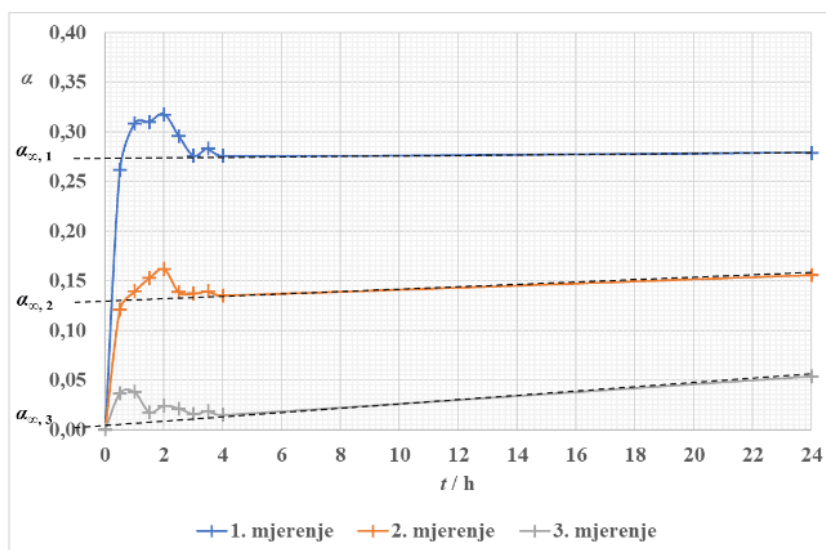
HIDROGEL	bez peludi					
	destilirana voda			fiziološka otopina		
MEDIJ						
masa prije bubrenja / g	0,8091	0,8110	0,6318	0,5628	0,9044	1,0093
masa poslije 30 min bubrenja / g	0,9091	0,9074	0,7660	0,7098	1,0136	1,0461
masa poslije 60 min bubrenja / g	0,9373	0,9387	0,7945	0,7363	1,0301	1,0472
masa poslije 90 min bubrenja / g	0,8932	0,9461	0,8057	0,7372	1,0424	1,0424
masa poslije 120 min bubrenja / g	0,9567	0,9442	0,8197	0,7414	1,0806	1,0334

masa poslije 150 min bubrenja / g	0,9599	0,9461	0,7804	0,7290	1,0422	1,0306
masa poslije 180 min bubrenja / g	0,9419	0,9242	0,7644	0,7179	1,0284	1,0249
masa poslije 210 min bubrenja / g	0,9388	0,9182	0,7662	0,7221	1,0302	1,0279
masa poslije 240 min bubrenja / g	0,9412	0,9178	0,7573	0,7177	1,0266	1,0240
masa poslije 24 h bubrenja / g	0,9461	0,9316	0,7465	0,7196	1,0451	1,0632
ravnotežni stupanj bubrenja / %	16,25	12,75	20,25	27,50	13,50	1,50
ravnotežni stupanj bubrenja / %	16,42			14,17		
HIDROGEL	s pročišćenom peludi					
MEDIJ	destilirana voda			fiziološka otopina		
masa prije bubrenja / g	1,2610	1,1382	1,3576	1,0437	1,2806	1,0532
masa poslije 30 min bubrenja / g	1,5029	1,3542	1,5987	1,2489	1,4530	1,2056
masa poslije 60 min bubrenja / g	1,6443	1,3989	1,7193	1,3267	1,5430	1,2661
masa poslije 90 min bubrenja / g	1,6963	1,5284	1,8036	1,3609	1,6040	1,2700
masa poslije 120 min bubrenja / g	1,7663	1,6149	1,8901	1,4182	1,6486	1,3149
masa poslije 150 min bubrenja / g	1,7927	1,6559	1,9602	1,4338	1,6817	1,3041
masa poslije 180 min bubrenja / g	1,8132	1,6719	1,9903	1,4364	1,7039	1,3032
masa poslije 210 min bubrenja / g	1,8494	1,7080	2,0343	1,4629	1,7365	1,3062
masa poslije 240 min bubrenja / g	1,8598	1,7371	2,0615	1,4669	1,7470	1,3078
masa poslije 24 h bubrenja / g	1,8745	1,7548	2,0811	1,4898	1,8293	1,2835
ravnotežni stupanj bubrenja / %	47,50	52,50	51,50	40,00	35,50	24,50
ravnotežni stupanj bubrenja / %	50,50			33,33		
HIDROGEL	s nepročišćenom peludi					
MEDIJ	destilirana voda			fiziološka otopina		
masa prije bubrenja / g	1,5881	1,6100	1,5159	1,4802	1,1753	1,8056
masa poslije 30 min bubrenja / g	1,8873	1,9328	1,8967	1,7669	1,4191	2,0421
masa poslije 60 min bubrenja / g	2,0543	2,1195	2,0841	1,9017	1,5151	2,1441
masa poslije 90 min bubrenja / g	2,1742	2,2243	2,2137	1,9849	1,5834	2,2339
masa poslije 120 min bubrenja / g	2,2657	2,3139	2,3088	2,0469	1,6181	2,2985
masa poslije 150 min bubrenja / g	2,3267	2,3591	2,3543	2,0886	1,6182	2,3549
masa poslije 180 min bubrenja / g	2,3875	2,4008	2,3851	2,1083	1,6541	2,3842

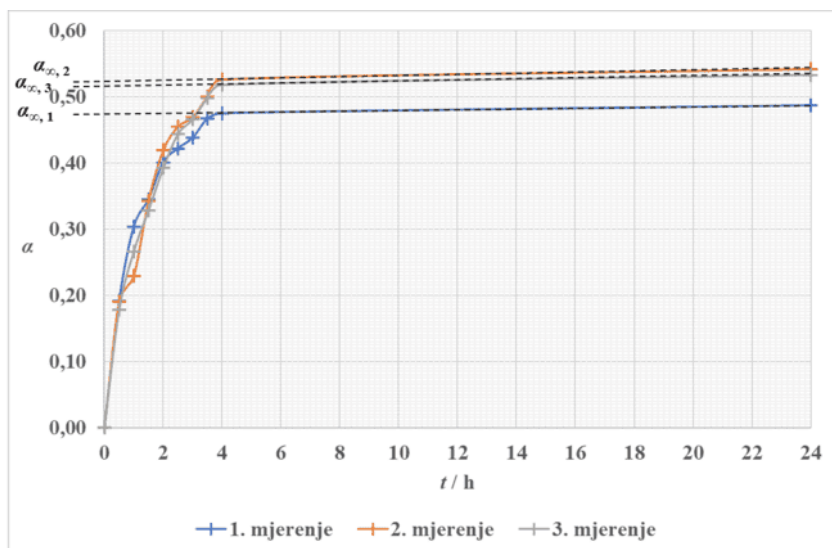
masa poslije 210 min bubrenja / g	2,4215	2,4084	2,4013	2,1383	1,6647	2,4061
masa poslije 240 min bubrenja / g	2,4391	2,4180	2,4115	2,1427	1,6697	2,4227
masa poslije 24 h bubrenja / g	2,3266	2,2742	2,1807	2,0195	1,5596	2,3776
ravnotežni stupanj bubrenja / %	58,50	51,50	62,50	46,50	43,50	35,00
ravnotežni stupanj bubrenja / %	57,50			41,67		



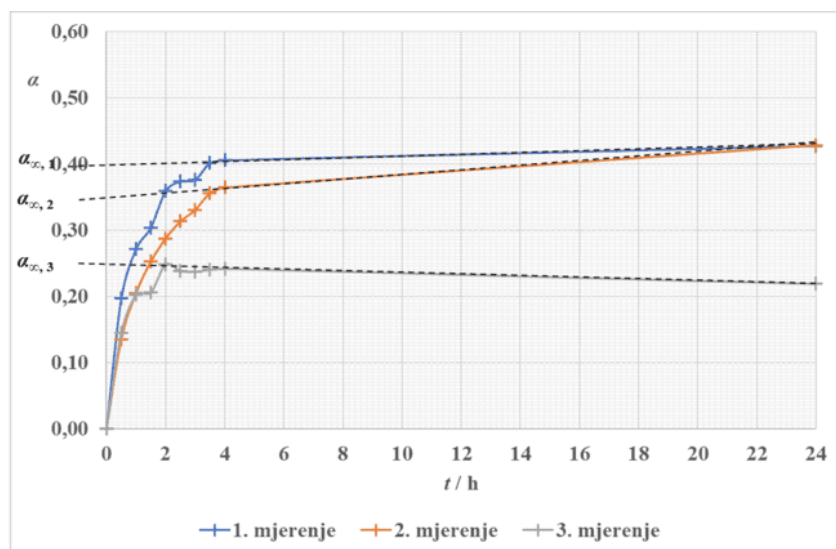
Slika 22. Ovisnost stupnja bubrenja o vremenu, $\alpha = f(t)$, za hidrogel bez peludi u destiliranoj vodi



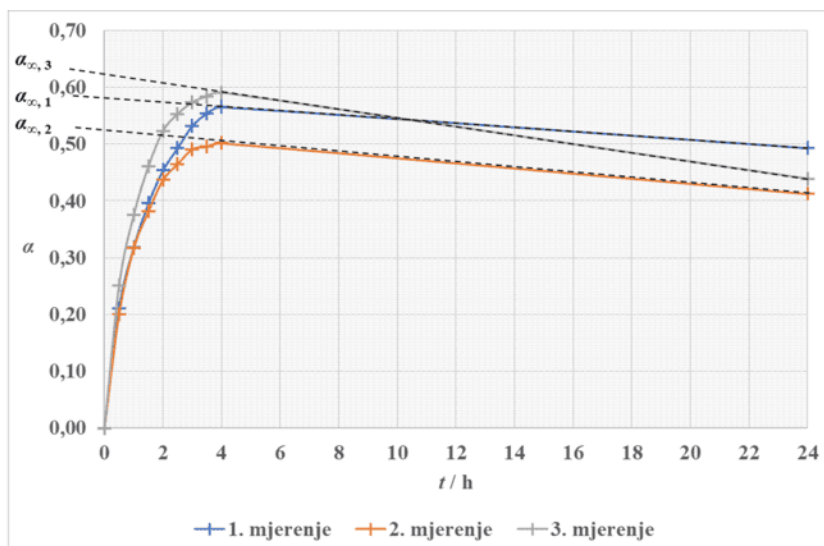
Slika 23. Ovisnost stupnja bubrenja o vremenu, $\alpha = f(t)$, za hidrogel bez peludi u fiziološkoj otopini



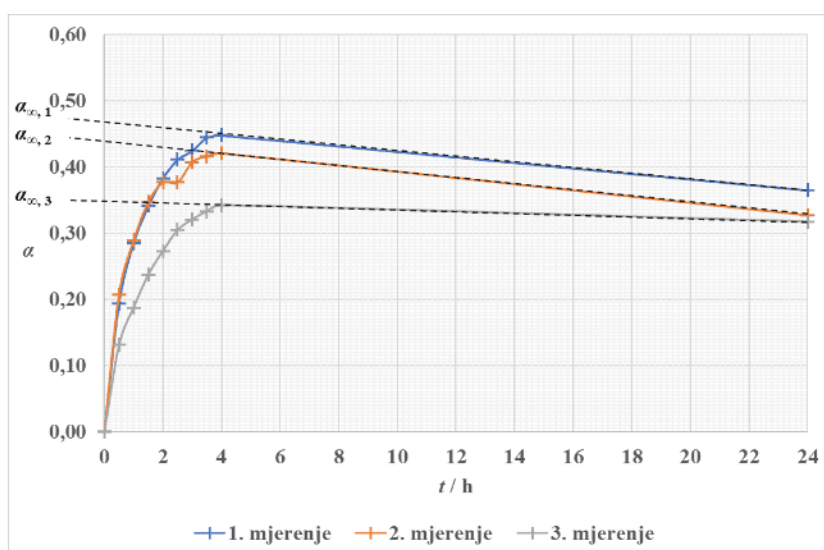
Slika 24. Ovisnost stupnja bubrenja o vremenu, $\alpha = f(t)$, za hidrogel s pročišćenom peludi u destiliranoj vodi



Slika 25. Ovisnost stupnja bubrenja o vremenu, $\alpha = f(t)$, za hidrogel bez peludi u fiziološkoj otopini



Slika 26. Ovisnost stupnja bubrenja o vremenu, $\alpha = f(t)$, za hidrogel s nepročišćenom peludi u destiliranoj vodi



Slika 27. Ovisnost stupnja bubrenja o vremenu, $\alpha = f(t)$, za hidrogel s nepročišćenom peludi u fiziološkoj otopini

Kinetika bubrenja hidrogela, kao i sposobnost sorpcije vode, ovise o njegovoj poroznosti. Pore su u hidrogelu međusobno povezane, a takve strukture, nalik kanalima, mogu kapilarnim djelovanjem preuzeti vodenu fazu u matricu. Kao rezultat toga, bubrenje se postiže brzom difuzijom otapala u matricu³⁶.

Suprotno rezultatima sušenja, iz rezultata bubrenja vidljivo je da najveći stupanj bubrenja ima hidrogel s nepročišćenom peludi. Najmanji stupanj bubrenja ima hidrogel bez peludi. Hidrogel s nepročišćenom peludi može primiti najviše vode prilikom bubrenja, dok sam sadrži najmanje slobodne vode.

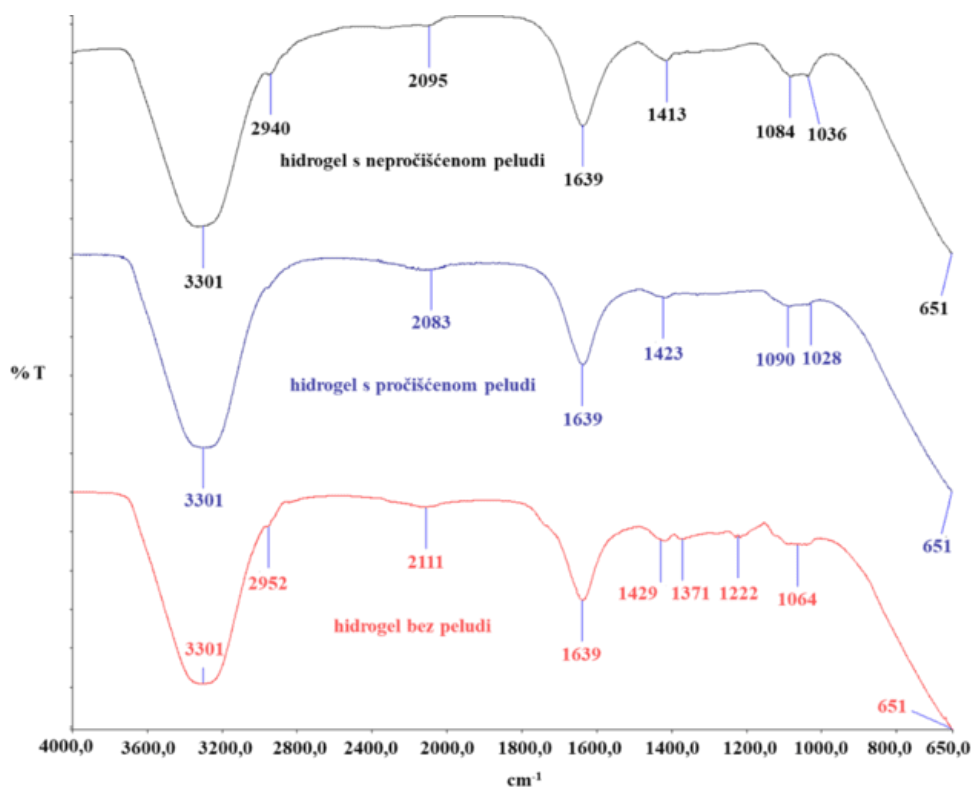
Peludna zrnca imaju jaku hidrauličku vodljivost, koja potječe od velike gustoće negativnih naboja na sporopoleninu³⁷ što je važno u procesu oprašivanja jer negativno nabijena pelud privlači pozitivni naboj na tijelima pčela koje slijeću³⁸. U kontaktu s vlagom, čini se vjerojatnim da dolazi do formiranja vodenih kanala koja vode vlagu kroz hidrofobni lipidni matriks peludnog omotača u unutrašnjost peludnog zrna. Za to su zaslužne skupine proteina, koje su, iako su prisutne u lipidnom matriksu, relativno polarne pa i hidrofilne²⁸. Uz to, preostali hidrofilni sloj intina omogućuje vodi da lako prodre u šuplja zrnca peludi što može dovesti do njihovog brzog napuhivanja. Prosječna se veličina peludnih zrna tijekom bubrenja povećava, a oblik postaje sferičniji³⁷.

Bubrenje je općenito bolje u vodi nego u fiziološkoj otopini što je i očekivano. Molekule vode mogu lakše prodrijeti u unutrašnjost hidrogela od otopine NaCl-a. Nema prepreke ulasku molekula vode u hidrogel jer one nisu nabijene³³.

4.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)

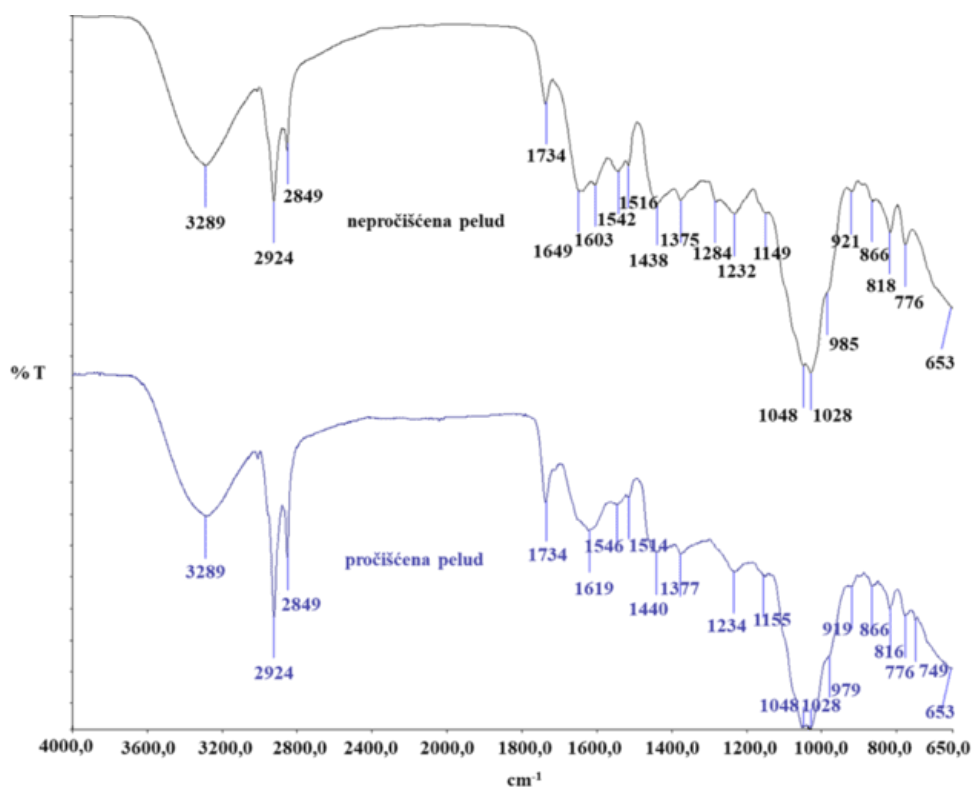
Uzorci pripremljenih hidrogelova te PVA i pelud okarakterizirani su infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FTIR). Kao rezultat analize, dobiveni su FTIR spektri (slike 28-30) koji prikazuju ovisnosti transmitancije (% T) o valnom broju (cm^{-1}). Na spektrima su vidljive karakteristične apsorpcijske vrpce pri određenim valnim brojevima.

Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom temelji se na međudjelovanju infracrvenog (IR) zračenja s uzorkom pri čemu dolazi do apsorpcije IR zračenja onih valnih duljina (energija) koje odgovaraju energijama vibracija atoma u uzorku (ovisno o vrsti veze i karakterističnim skupinama u strukturi uzorka)³⁹.



Slika 28. Prikaz FTIR spektara pripremljenih hidrogelova

Usporedbom spektara svih pripremljenih hidrogelova, vidljivo je da su dosta slični. Široka i intenzivna vrpca na $\approx 3300 \text{ cm}^{-1}$, vidljiva kod svih uzoraka, odgovara istežanju -OH skupina iz vode i poli(vinil-alkohola)⁴⁰. Vrpce slabog intenziteta na $\approx 2950 \text{ cm}^{-1}$ karakteristične su vibracije istežanja C-H skupina u PVA⁴¹. Oštre i intenzivne vrpce na 1639 cm^{-1} posljedica su vibracija asimetričnih istežanja -COO skupina iz alginata⁴¹ te istežanja C=O skupina iz PVA⁴², preostalih nakon sinteze iz poli(vinil-acetata). Vrpca na $\approx 1415 \text{ cm}^{-1}$ predstavlja vibracije simetričnih istežanja -COO skupine iz alginata^{40,41}. Vrhovi između 1050 i 1150 cm^{-1} indikator su za PVA⁴⁰.



Slika 29. Prikaz FTIR spektara nepročišćene i proćišćene peludi

Tipični FTIR spektar peludi karakterizira široka apsorpcijska vrpca uočena u spektralnom rasponu od 3600 do 3000 cm^{-1} (s maksimumom na 3289 cm^{-1}), koja se može pripisati vibracijama istezanja N-H skupina iz proteina te vibracijama istezanja O-H skupina iz ugljikohidrata (glukoza, fruktoza i saharoza) i vode. Oštre vrpce na 2925 cm^{-1} i 2849 cm^{-1} odgovaraju C-H istezanju (alifatske C-H skupine) i mogu se opisati kao nespecifićni IR signali jer mogu biti povezani s molekulskim vibracijama brojnih komponenata peludi kao što su lipidi, masne kiseline, ugljikohidrati, celuloza i druge dugolanćane strukture⁴³.

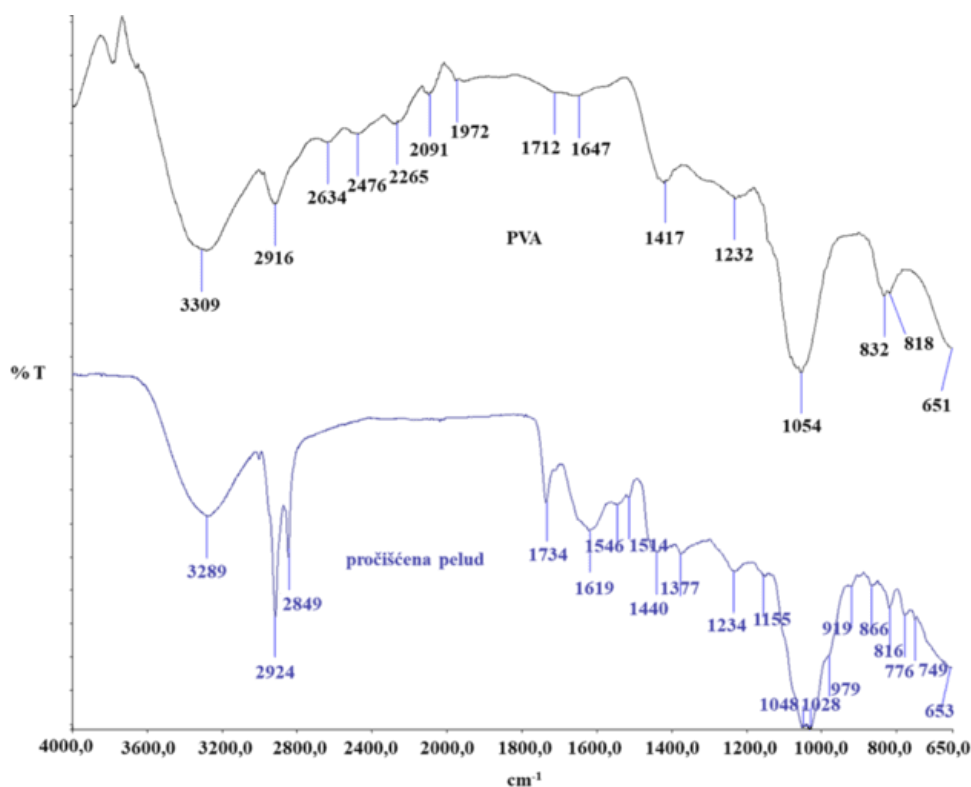
Apsorpcijska vrpca na 1735 cm^{-1} javlja se prvenstveno zbog istezanja karbonilne skupine C=O iz esterske veze komponenata na bazi lipida. U području između 1550 i 1680 cm^{-1} dolazi do preklapanja nekoliko vibracijskih vrpce povezanih s lipidima, proteinima i vodom. Za lipide su karakteristićne vrpce između 1610 i 1550 cm^{-1} koje predstavljaju COO- asimetrićno istezanje (RCOO —skupina). Vibracijska istezanja C=C skupina iz lipida javljaju se između 1680 i 1600 cm^{-1} . Ovi se položaji također mogu pripisati vibracijama istezanja C=O i C-N skupina iz primarnih amida iz proteinskih frakcija peludi. Vrpca na oko 1645 cm^{-1} također pripada molekulskim vibracijama vode, konkrećnije H-O-H deformacijskim vibracijama⁴³.

Vrpce slabijeg intenziteta, koje se javljaju na ≈ 1545 i ≈ 1515 cm^{-1} , pripisuju se istezanjima C=C aromatskih struktura, prvenstveno lipidnih. Vrpce sekundarnih amida iz proteina između 1510 i 1580 cm^{-1} , koje predstavljaju vibracije savijanja N-H skupina i vibracije istezanja C-N skupina, preklapaju se s istezanjima C=C skupina⁴³.

Spektralno područje između 1490 i 1190 cm^{-1} sadrži niz vrpce slabijeg intenziteta koje se prvenstveno pripisuju proteinima i šećerima. Apsorpcijske vrpce koje imaju maksimum na oko 1440 i 1375 cm^{-1} mogu se povezati s vibracijama istezanja COO bočnog lanca proteina dok se područje oko 1235 cm^{-1} sastoji od vrpce istezanja C-N, savijanja N-H, istezanja C-O i savijanja O=C-N skupina iz tercijarnih amida. U ovom se spektralnom području spomenute vrpce povezane s proteinima preklapaju s manje intenzivnim vibracijama šećera: slabe vrpce s maksimumom na oko 1440 i 1375 cm^{-1} pripisuju se i C-O-H deformaciji glukoze, odnosno fruktoze, dok se vrpca na oko 1235 cm^{-1} pojavljuje zbog CH₂ savijanja glukoze⁴³.

Slaba apsorpcijska vrpca opažena na oko 1150 cm^{-1} može se pripisati vibracijama istezanja C-O veza najzastupljenijih šećera u peludi, glukoze i fruktoze, kao i deformacijskim vibracijama C-H i N-H aromatskih struktura povezanih s proteinima⁴³.

Najistaknutije apsorpcijske vrpce na spektrima peludi vidljive su na 1048 i 1028 cm^{-1} . One se pripisuju brojnim preklapajućim signalima šećera i proteina, konkretnije rastezljivim C-O vibracijama s maksimumom na 1048 cm^{-1} za fruktozu te 1028 cm^{-1} za glukozu, kao i N-H i C-H deformacijskim vibracijama iz proteina. Manje intenzivna apsorpcija koja se nalazi na oko 980 cm^{-1} poznata je kao karakteristična vrpca saharoze povezana s glikozidnom vezom⁴³.



Slika 30. Prikaz FTIR spektara PVA i pročišćene peludi

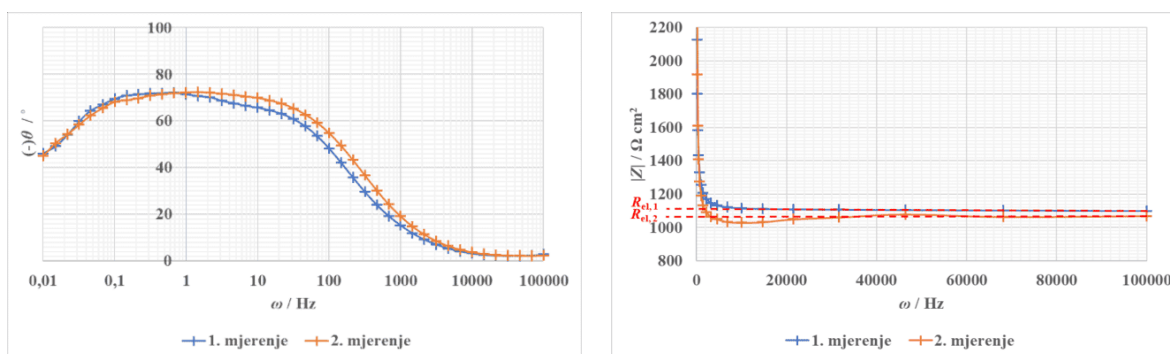
Promatranjem slike 30, na kojoj su zajedno prikazani FTIR spektri poli(vinil-alkohola) i pročišćene peludi, može se uočiti sličnost između spektara peludi i poli(vinil-alkohola). FTIR spektar PVA pokazuje intenzivne vrpce na 3309, 2916 i 1054 cm^{-1} , dok su kod peludi izražene vrpce na 3289, 2924, 2849, 1734, 1619 i 1048 cm^{-1} . Usporedbom spektara mogu se uočiti vrpce koje su zastupljene na oba spektra. Maksimum na oko 3300 cm^{-1} odgovara vibracijama istezanja O-H skupina koje potječu od PVA, te od ugljikohidrata (glukoza, fruktoza i saharoza) iz peludi. Oštra vrpca na 2924 cm^{-1} kod peludi te vrpca na 2916 cm^{-1} kod PVA, odgovaraju C-H istezanju (alifatske C-H skupine koje potječu iz različitih komponenata peludi te iz PVA). Vrpce na 1054 cm^{-1} kod PVA i na 1048 cm^{-1} kod peludi pripisuju se vibracijama istezanja C-O skupina koje potječu od PVA te od šećera i proteina iz peludi^{43,44}.

Ove sličnosti u spektrima poli(vinil-alkohola) i peludi u skladu su s informacijama iz literature²⁹ gdje je navedeno da se sporopolenin kod peludi može većinom sastojati od poli(vinil-alkohola). Sličnost u strukturi poli(vinil-alkohola) i peludi razlog je njihove kompatibilnosti i dobivanja kompaktnih hidrogelova s peludi pripremljenih u ovom radu te njihovih dobrih svojstava.

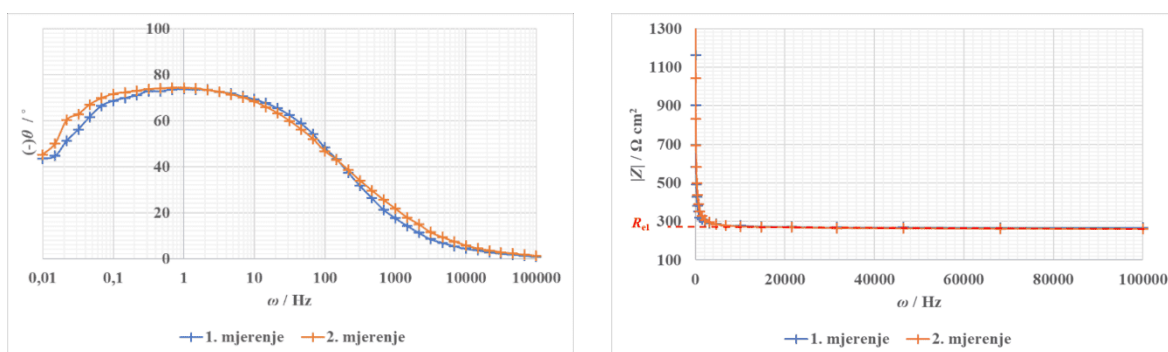
4.4. Određivanje vodljivosti hidrogelova

Vodljivost pripremljenih hidrogelova ispitana je metodom elektrokemijske impedancijske spektroskopije (EIS). Raspon frekvencija prilikom mjerenja bio je između 0,01 i 100 000 Hz. Od svakog hidrogela, uzeta su dva uzorka, odnosno provedena su dva mjerenja za pojedini hidrogel. U obzir su uzimani samo rezultati mjerenja u kojima je kao radna elektroda korištena bakrena pločica dok rezultati mjerenja dvjema standardnim gumenim elektrodama koje dolaze uz opremu aparature za EIS nisu uzeti u obzir jer su kod njih primijećena značajnija odstupanja.

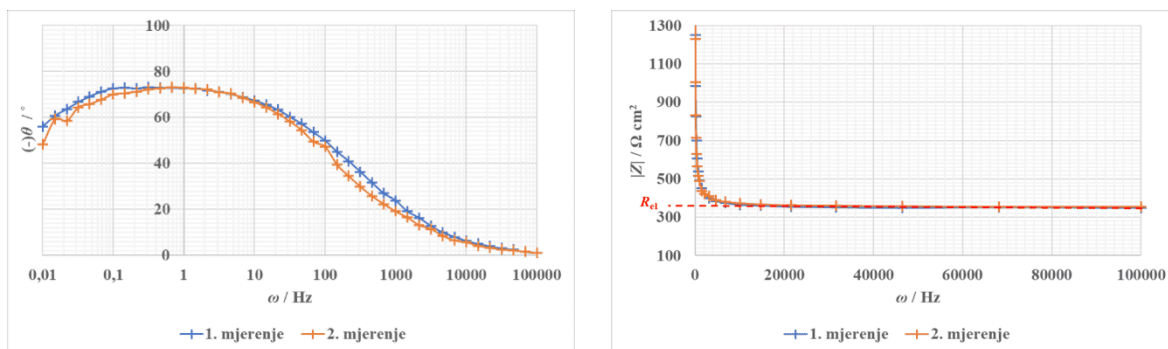
Rezultati mjerenja prikazani su Bodeovim prikazom kao ovisnost negativne vrijednosti faznog kuta ($-\theta / ^\circ$) o frekvenciji (ω / Hz) i kao ovisnost modula (apsolutne vrijednosti) impedancije ($|Z| / \Omega \text{ cm}^2$) o frekvenciji (slike 31-33).



Slika 31. Bodeov prikaz: ovisnost faznog kuta o frekvenciji (lijevo) i impedancije o frekvenciji (desno) kod hidrogela bez peludi



Slika 32. Bodeov prikaz: ovisnost faznog kuta o frekvenciji (lijevo) i impedancije o frekvenciji (desno) kod hidrogela s pročišćenom peludi



Slika 33. Bodeov prikaz: ovisnost faznog kuta o frekvenciji (lijevo) i impedancije o frekvenciji (desno) kod hidrogela s nepročišćenom peludi

Iz Bodeovog prikaza ovisnosti faznog kuta o frekvenciji, može se primijetiti da kod svih hidrogelova fazni kut teži k nuli pri najvišim i najnižim frekvencijama, formirajući maksimum pri srednjim frekvencijama, na oko 80°. Svaki maksimum predstavlja pojedinu komponentu u hidrogelu.

Iz prikaza ovisnosti modula impedancije o frekvenciji, vidljivo je da je impedancija na nižim frekvencijama jako osjetljiva na promjene frekvencije. Na višim frekvencijama, pri otprilike 10000 Hz, krivulja se vodoravno linearno ustabilila te pokazuje približno konstantne vrijednosti modula impedancije čija se vrijednost očita s y-osi. Ta vrijednost odgovara otporu elektrolita. U tablici 4, sumirani su mjerni podaci – otpor elektrolita dobiven kao srednja vrijednost otpora pri najvišim frekvencijama te debljina uzorka hidrogelova. Kako bi se dobio specifični otpor, vrijednosti otpora elektrolita podijeljene su s debljinom uzorka. Naposljetku se dobije električna provodnost kao recipročna vrijednost specifičnog otpora. U tablici 5, prikazani su izračunati specifični otpori te električna provodnost pripremljenih hidrogelova.

Tablica 4. Mjerni podaci za računanje vodljivosti hidrogelova

HIDROGEL	bez peludi		s pročišćenom peludi		s nepročišćenom peludi	
otpor elektrolita, $R_{el} / \Omega \text{ cm}^2$	1107,59	1055,25	270,61	266,05	354,23	361,44
debljina uzorka l / cm	0,40	0,40	0,60	0,65	0,60	0,60

Specifični otpor elektrolita računa se prema izrazu:

$$\rho [\Omega \text{ cm}] = \frac{R_{el} [\Omega \text{ cm}^2]}{\text{debljina uzorka [cm]}}$$

Električna provodnost računa se prema izrazu:

$$\sigma [\text{S cm}^{-1}] = \frac{1}{\rho [\Omega \text{ cm}]}$$

Tablica 5. Rezultati određivanja vodljivosti hidrogelova

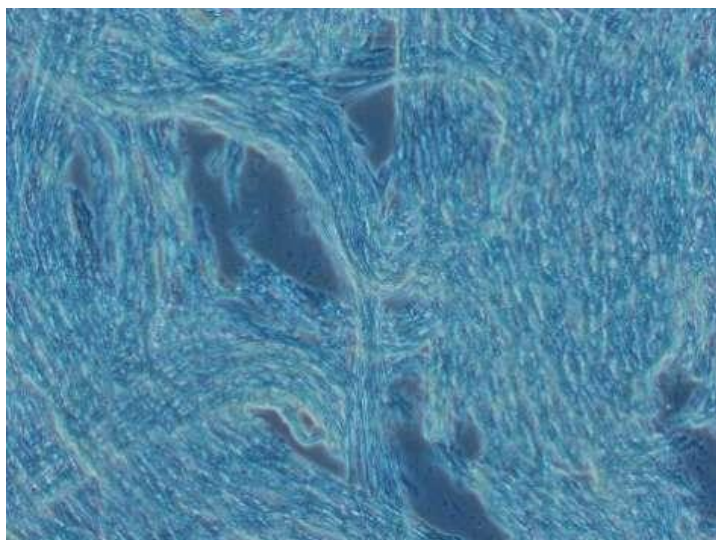
HIDROGEL	bez peludi		s pročišćenom peludi		s nepročišćenom peludi	
specifični otpor elektrolita, $\rho / \Omega \text{ cm}$	2768,97	2638,12	451,01	409,30	590,38	602,40
el. provodnost, $\sigma / \text{S cm}^{-1}$	$3,61 \cdot 10^{-4}$	$3,79 \cdot 10^{-4}$	$2,22 \cdot 10^{-3}$	$2,44 \cdot 10^{-3}$	$1,69 \cdot 10^{-3}$	$1,66 \cdot 10^{-3}$
el. provodnost, $\sigma / \text{S cm}^{-1}$	$3,70 \cdot 10^{-4}$		$2,33 \cdot 10^{-3}$		$1,68 \cdot 10^{-3}$	

Na temelju izračunatih vrijednosti iz tablice 5, vidljivo je da hidrogel s pročišćenom peludi pokazuje najbolje rezultate vodljivosti. Zatim slijedi hidrogel s nepročišćenom peludi dok hidrogel bez peludi pokazuje najlošiju vodljivost.

U već spomenutoj studiji iz 2021. godine., u kojoj je pripremljen nano-strukturirani vlaknasti mat od natrijevog alginata i poli(vinil-alkohola) s pčelinjom peludi, pokazalo se kako je prisutnost peludi u SA/PVA otopini povećala vodljivost otopine. Naime, pelud sadrži željezo, bakar, cink, mangan, silicij i selen te kalcij, fosfor, magnezij, natrij i kalij, koji bi mogli dovesti do povećanja ukupne količine iona u sustavu²¹, što rezultira povećanom vodljivošću.

4.5. Snimanje svjetlosnim mikroskopom

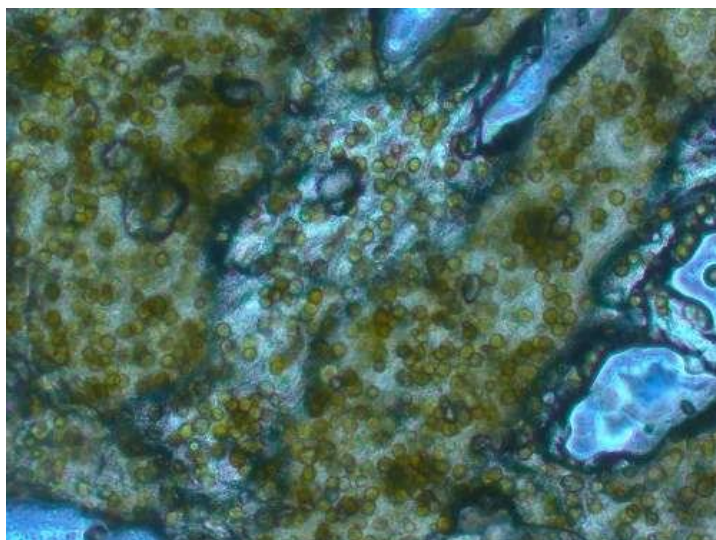
Na slikama 34-37 prikazani su hidrogel bez peludi i hidrogel s pročišćenom peludi, pod svjetlosnim mikroskopom pri uvećanju 100x. Na slikama 38-45 prikazana je pročišćena i nepročišćena pelud pri uvećanju 100x i 400x.



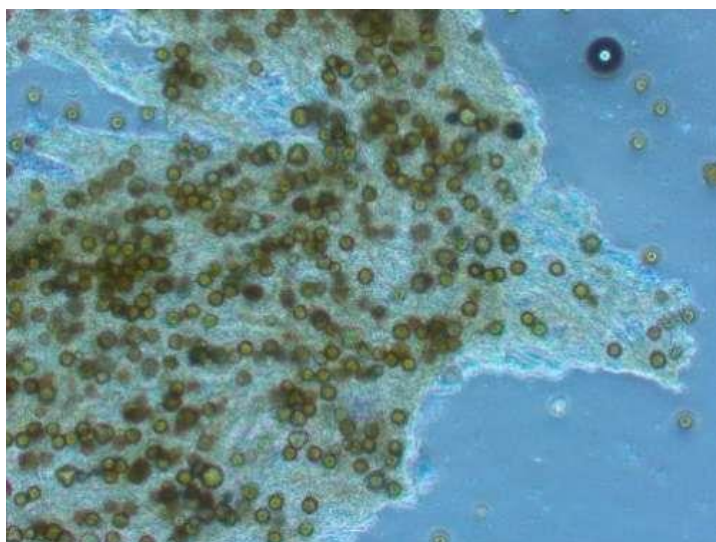
Slika 34. Hidrogel bez peludi bez kapljice vode, pri uvećanju 100x



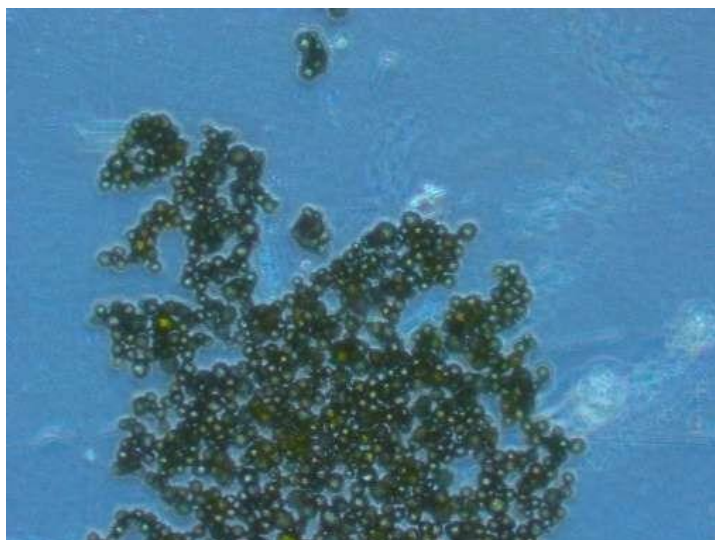
Slika 35. Hidrogel bez peludi u kapljici vode, pri uvećanju 100x



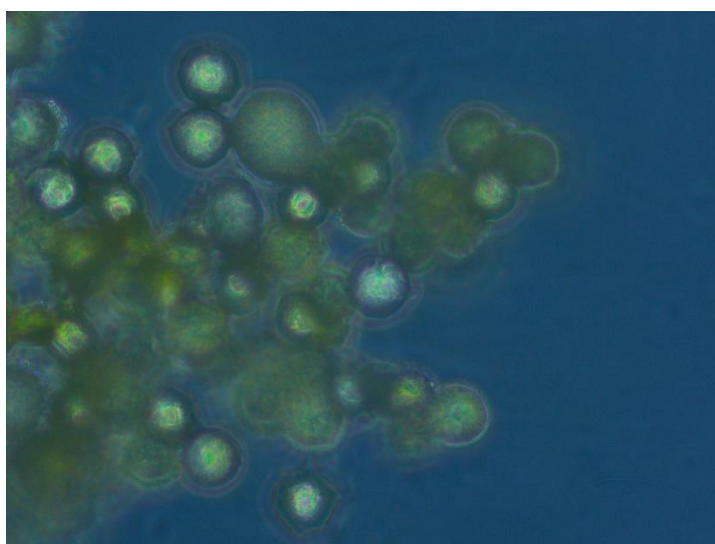
Slika 36. Hidrogel s pročišćenom peludi bez kapljice vode, pri uvećanju 100x



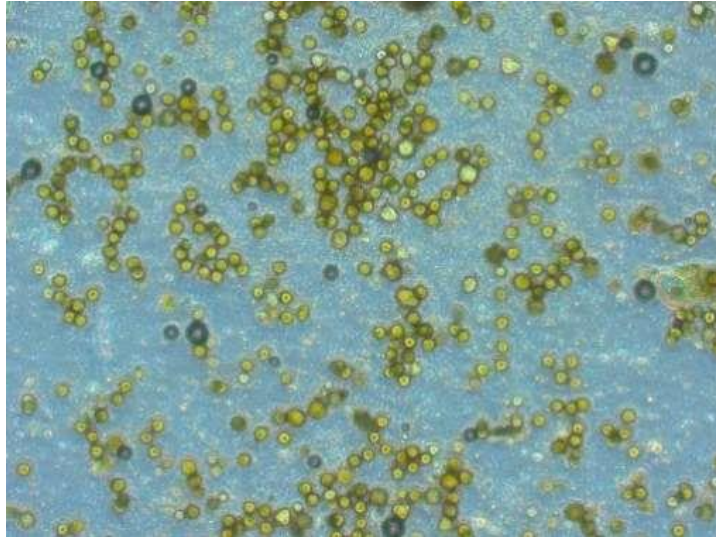
Slika 37. Hidrogel s pročišćenom peludi u kapljici vode, pri uvećanju 100x



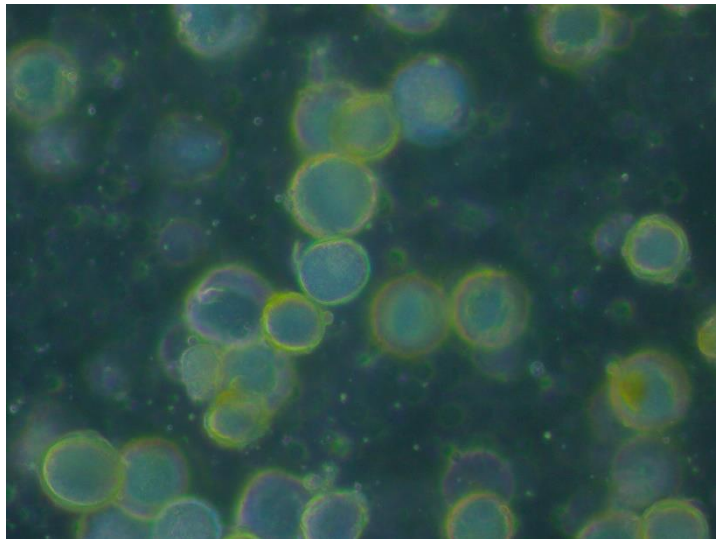
Slika 38. Pročiščena pelud bez kapljice vode, pri uvećanju 100x



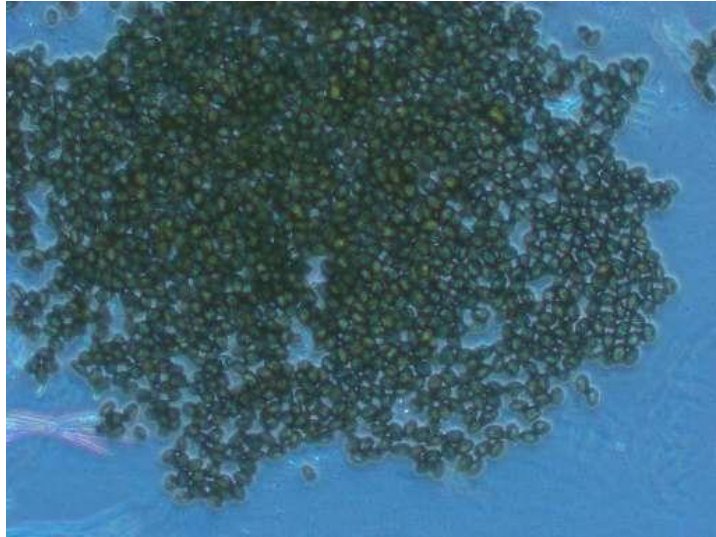
Slika 39. Pročiščena pelud bez kapljice vode, pri uvećanju 400x



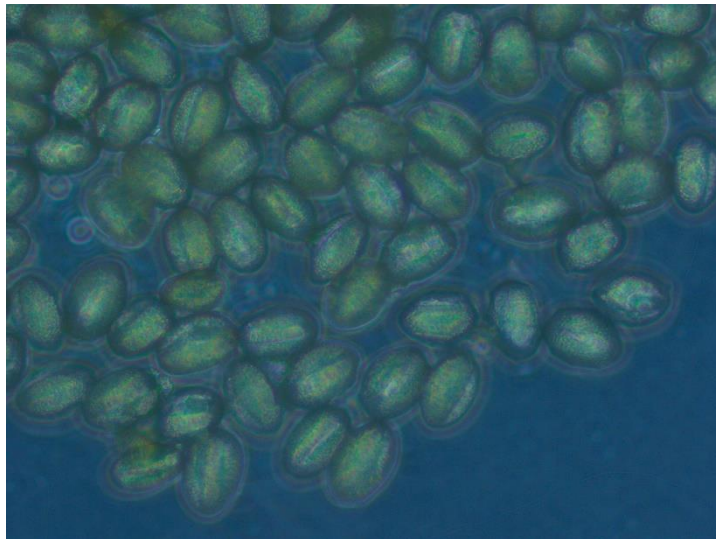
Slika 40. Pročišćena pelud u kapljici vode, pri uvećanju 100x



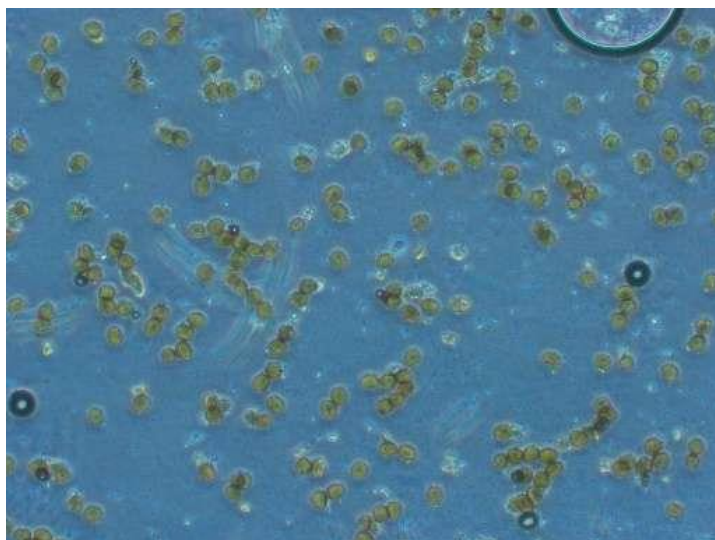
Slika 41. Pročišćena pelud u kapljici vode, pri uvećanju 400x



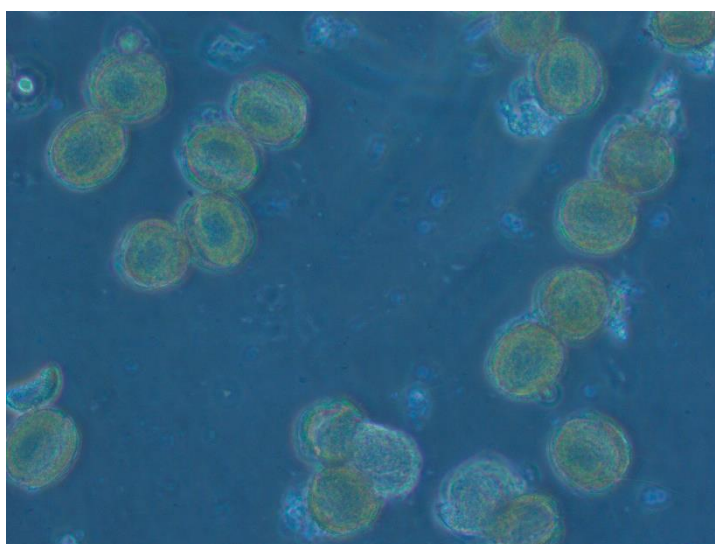
Slika 42. Nepročiščena pelud bez kapljice vode, pri uvećanju 100x



Slika 43 Nepročiščena pelud bez kapljice vode, pri uvećanju 400x



Slika 44. Nepročišćena pelud u kapljici vode, pri uvećanju 100x



Slika 45. Nepročišćena pelud u kapljici vode, pri uvećanju 400x

Svjetlosna mikroskopija može se koristiti za analizu izgleda i boje pčelinje peludi kao i za identifikaciju peludnih zrnaca⁴⁵. Pročišćena pelud bolje je vidljiva u kapljici vode, u obliku malih okruglih zrnaca zelenkaste, zlatnožute i svijetložute boje. Unutar strukture hidrogela s peludi mogu se uočiti izražena zrnca peludi.

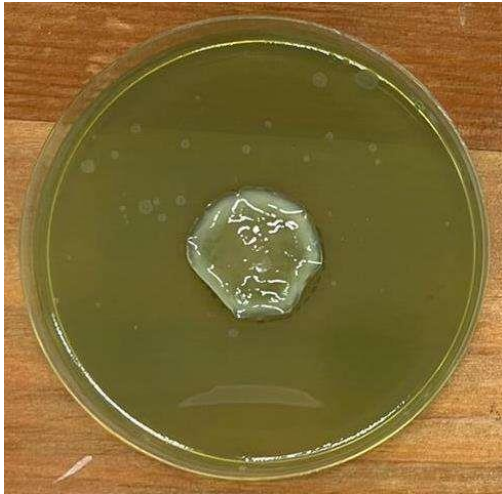
Na fotografijama snimljenim svjetlosnim mikroskopom pri uvećanju 400 puta, može se uočiti da su zrnca nepročišćene peludi ovalnog oblika te su vidljive izdužene aperture.

Zrnca pročišćene peludi okruglog su oblika što upućuje na to da su nakon pročišćavanja ostala djelomično nabubrena.

4.6. Određivanje antimikrobnih svojstava hidrogelova i peludi

Antimikrobna svojstva hidrogelova određena su disk difuzijskom metodom. Nakon inkubacije uzoraka u trajanju od 24 i 48 h, izmjerena je i zabilježen promjer inhibicijske zone oko uzoraka/diskova u milimetrima. Rezultati su prikazani u tablici 6, a fotografije uzoraka nakon inkubacije prikazane su na slikama 46-57.

→ Fotografije uzoraka nakon 24 h inkubacije:



Slika 46. Hidrogel bez peludi na bakterijskoj kulturi



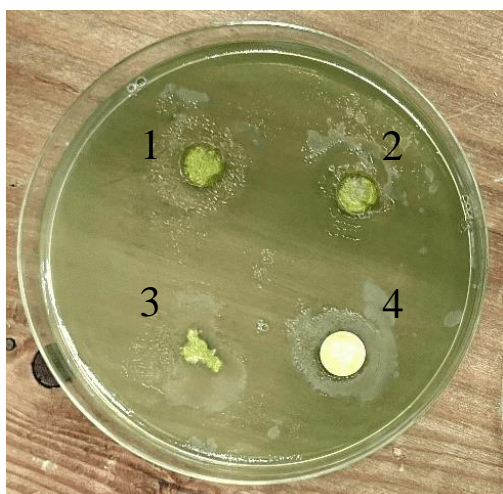
Slika 47. Hidrogel bez peludi na gljivičnoj kulturi



Slika 48. Hidrogel s pročišćenom peludi na bakterijskoj kulturi



Slika 49. Hidrogel s pročišćenom peludi na gljivičnoj kulturi



Slika 50. Pelud (pročišćena) na bakterijskoj kulturi



Slika 51. Pelud (pročišćena) na gljivičnoj kulturi

Napomena – na slikama 50 i 51, brojevima je označen način nanošenja peludi na podlogu: 1 – pročišćena pelud u kapljici vode (veća konc.); 2 – pročišćena pelud u kapljici vode (manja konc.); 3 – suha pročišćena pelud (prah); 4 – pročišćena pelud na disku (disk – filter papir natopljen uzorkom)

Što se tiče otpornosti uzoraka hidrogelova i peludi na bakterije, nakon inkubacije u trajanju od 24 h, kod uzorka hidrogela bez peludi nije izražena zona inhibicije oko samog hidrogela.

Hidrogel bez peludi nije pokazao antibakterijsku aktivnost prema gram-negativnoj bakteriji *Pseudomonas aeruginosa*. To je vidljivo iz karakteristične zelene boje koja se razvila na hranjivoj podlozi i unutar samog hidrogela, a koju pigmenti topljivi u vodi, piocijanin i pioverdin, daju *P. aeruginosi* na čvrstim medijima⁴⁶. Međutim, nije došlo do porasta gram-pozitivne bakterije *Bacillus subtilis*, koja se na hranjivom agaru manifestira kao morfološki kružna, neprozirna, mutno bijela ili blago žuta kolonija s neravnim rubovima⁴⁷.

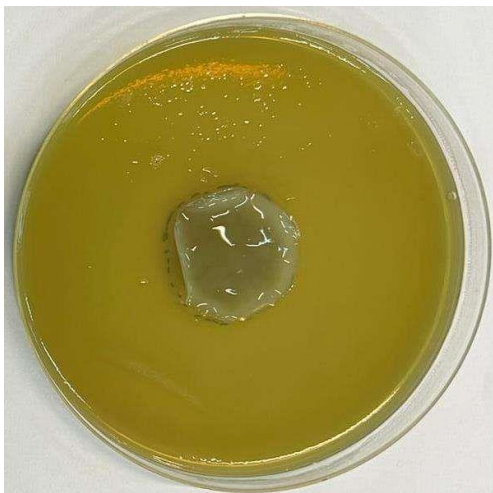
Hidrogel s pročišćenom peludi nakon 24 h inkubacije također ne pokazuje vidljivu zonu inhibicije, no primjećena je manje intenzivna zelena boja, koju razvija *P. aeruginosa*, u odnosu na hidrogel bez peludi. Ni kod ovog hidrogela nije vidljiv razvoj kolonija bakterijske kulture *B. subtilis*.

S druge strane, kod uzoraka pročišćene peludi na hranjivoj podlozi vidljive su zone inhibicije od nekoliko milimetara. Stoga se može govoriti o potencijalnom antibakterijskom djelovanju peludi. Za antibakterijsko djelovanje pčelinje peludi mogli bi biti odgovorni različiti mehanizmi. Prvi je rezultat prisutnosti aktivnih spojeva u strukturi peludi, kao što su flavonoidi i fenolne kiseline. Njihovo formiranje kompleksa s bakterijskim staničnim stijenkama dovodi do poremećaja u cjelovitosti bakterijske stanične stijenke, blokiranja ionskih kanala i inhibicije protoka elektrona u lancu transporta elektrona. Drugi mehanizam mogao bi se temeljiti na inhibiciji bakterijske RNA-polimeraze fenolnim spojevima kao što su flavanon pinocembrin, flavonol galangin i fenetil ester kafeinske kiseline⁴⁸. Rezultati jednog istraživanja provedenog 2016. godine potvrdili su povoljan učinak masti od pčelinje peludi u procesu zacjeljivanja rana od opekotina jer se broj bakterija u ranama smanjio tijekom trajanja eksperimenta. Iako pelud ima antibakterijska svojstva, važno je naglasiti da ta svojstva ovise o vrsti peludi i njezinoj koncentraciji te da inhibicija ovisi o vrsti bakterije. Gram-negativne bakterije otpornije su na djelovanje peludi od Gram-pozitivnih bakterija što se može povezati s dodatnim vanjskim slojem membrane, nepropusnim za većinu molekula koji se sastoji od fosfolipida, proteina i lipopolisaharida⁴⁹.

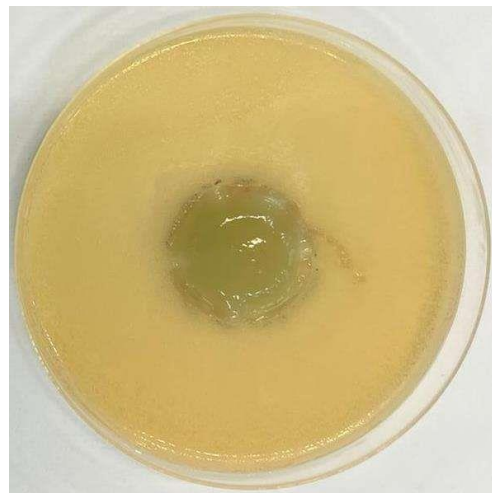
Ispitivanje antifungalne otpornosti hidrogelova i peludi pokazalo je sličan trend. Pokazalo se da hidrogel bez peludi ne pokazuje vidljivu zonu inhibicije pa se može reći da ne pokazuje otpornost na kvasac *Candida lipolytica* i na plijesan *Aspergillus niger*. Hidrogel s pročišćenom peludi također ne pokazuje izraženiju zonu inhibicije, no razvoj kulture gljiva na hranjivoj podlozi nešto je manje intenzivan nego kod hidrogela bez peludi. Pelud pokazuje antifungalno djelovanje jer su vidljive zone inhibicije oko različito nanesenih uzoraka peludi. Bioaktivni spojevi peludi koji su uključeni u antifungalno djelovanje jesu slobodna kiselina, fenoli i

flavonoidi. Relativno visoka koncentracija fenolnih spojeva, koji mogu uključivati spojeve terpenoide, fenilpropanoide, stilbene i saponine, uključena je u antifungalno djelovanje⁵⁰.

→ Fotografije uzoraka nakon 48 h inkubacije:



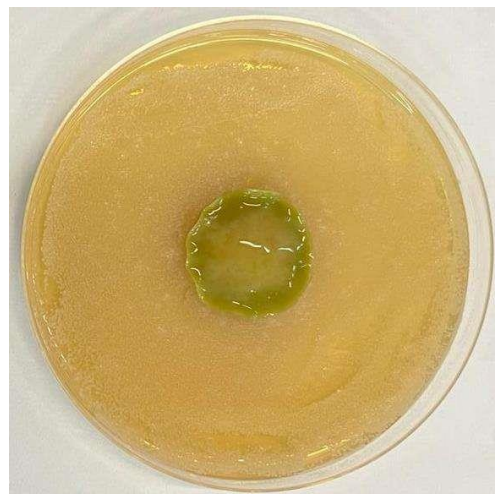
Slika 52. Hidrogel bez peludi na bakterijskoj kulturi



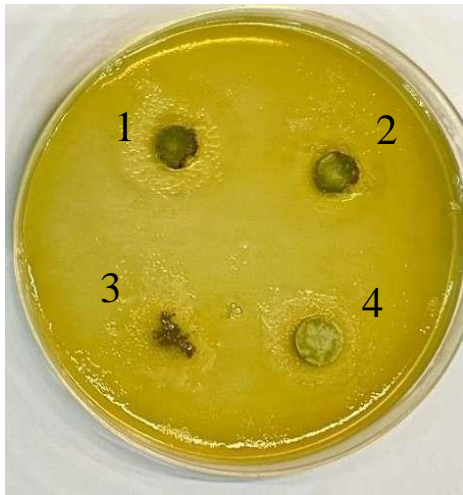
Slika 53. Hidrogel bez peludi na gljivičnoj kulturi



Slika 54. Hidrogel s pročišćenom peludi na bakterijskoj kulturi



Slika 55. Hidrogel s pročišćenom peludi na gljivičnoj kulturi



Slika 56. Pelud (pročišćena) na bakterijskoj kulturi



Slika 57. Pelud (pročišćena) na gljivičnoj kulturi

Napomena – na slikama 56 i 57, brojevima je označen način nanošenja peludi na podlogu: 1 – pročišćena pelud u kapljici vode (veća konc.); 2 – pročišćena pelud u kapljici vode (manja konc.); 3 – suha pročišćena pelud (prah); 4 – pročišćena pelud na disku (disk – filter papir natopljen uzorkom)

Nakon 48 h nije došlo do značajnijih promjena, osim što su se na hranjivim podlogama intenzivnije razvile bakterijske i gljivične kulture pa se zone inhibicije mogu bolje uočiti. Kod peludi, najveća zona inhibicije i za bakterije i za gljive vidljiva je oko peludi koja je nanesa s kapljicom vode u utor na hranjivoj podlozi u većoj koncentraciji; kod bakterija ona iznosi 15 mm, a kod gljiva 25 mm. Općenito, brzina difuzije kroz hranjivu podlogu nije tako brza kao brzina ekstrakcije antibakterijskog ili antifungalnog sredstva iz diska (utora) stoga je koncentracija djelujućeg sredstva najviša najbliže disku te dolazi do logaritamskog smanjenja koncentracije kako se udaljenost od diska povećava. Brzina difuzije djelujućeg sredstva kroz agar ovisi o svojstvima difuzije, o topljivosti sredstva u Mueller-Hinton agaru te o njegovoj molekularnoj masi⁵¹.

Može se zaključiti da bi povećanje udjela peludi u hidrogelovima moglo doprinijeti povećanju antimikrobnog djelovanja hidrogelova s peludi.

4.7. Praćenje pojave plijesni na hidrogelovima

Fotografirano 30. ožujka 2023. (prvi tjedan nakon pripreme hidrogelova):



Slika 58. Hidrogel bez peludi



Slika 59. Hidrogel s pročišćenom peludi

Fotografirano 24. svibnja 2023.:



Slika 60. Hidrogel bez peludi



Slika 61. Hidrogel s pročišćenom peludi

Fotografirano 2. lipnja 2023.:



Slika 62. Hidrogel bez peludi



Slika 63. Hidrogel s pročišćenom peludi

Fotografirano 20. lipnja 2023.:



Slika 64. Hidrogel bez peludi



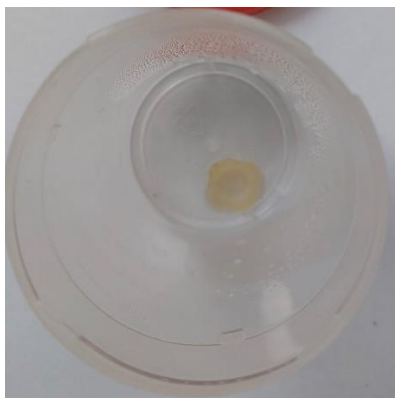
Slika 65. Hidrogel s pročišćenom peludi



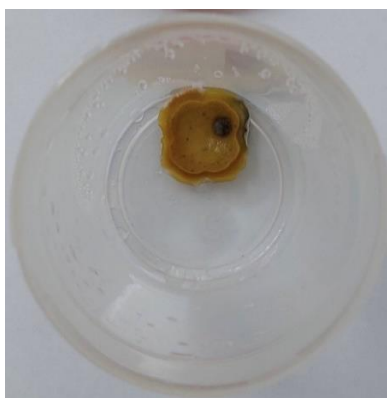
Slika 66. Hidrogel s nepročišćenom peludi

Na fotografijama iz 20. lipnja vidljivo je da je hidrogel bez peludi požutio, dok se kod hidrogela s pročišćenom peludi pojavila plijesan nakon otprilike 3 mjeseca stajanja u hladnjaku.

Fotografirano 27. lipnja 2023.:



Slika 67. Hidrogel bez peludi



Slika 68. Hidrogel s pročišćenom peludi



Slika 69. Hidrogel s nepročišćenom peludi

Na fotografijama iz 27. lipnja vidljivo je da je na hidrogelu s nepročišćenom peludi također došlo do pojave plijesni, što je otprilike nakon 25 dana stajanja u hladnjaku od trenutka pripreme. Kod hidrogela bez peludi nije vidljiva plijesan niti nakon 3 mjeseca, vidljivo je samo da je požutio po rubovima.

Prisutnost nečistoća na peludi mogući je uzrok ranije pojave plijesni na hidrogelovima s peludi od pojave plijesni na hidrogelovima bez peludi. Prisutnost nečistoća u uzorku peludi može potjecati od ostataka prašine, zemlje te različitih biljnih i životinjskih ostataka na peludnim zrcima.

Fotografirano 28. kolovoza 2023.:



Slika 70. Hidrogel s pročišćenom peludi



Slika 71. Hidrogelovi s nepročišćenom peludi

Dana 28. kolovoza 2023. fotografirani su novi uzorci hidrogela – hidrogel s pročišćenom peludi (koji je u hladnjaku stajao 5 mjeseci) te dva uzorka hidrogela s nepročišćenom peludi (koji su u hladnjaku stajali nešto manje od 3 mjeseca). Na fotografijama je vidljivo da ni na jednom uzorku nema plijesni. Kod nepročišćene peludi, vidljive su crne točkice, no to nije plijesan, već nešto što je bilo u uzorku peludi.

Iz navedenih opažanja proizlazi da je ključno dobro dezinficirati pribor kojim se rukuje i posudice u kome se hidrogelovi drže jer su u takvim uvjetima hidrogelovi izdržali bez pojave plijesni.

4.8. Ispitivanje zacjeljivosti hidrogelova

Uzorci hidrogelova prepolovljeni su skalpelom, a zatim su polovice stavljene u sterilnu posudicu na način da budu spojene pa u zamrzivač, odnosno hladnjak. Prereznani uzorci hidrogela, prije stavljanja u zamrzivač i hladnjak, prikazani su na slikama 72-74.



Slika 72. Prereznani uzorak hidrogela bez peludi



Slika 73. Prereznani uzorak hidrogela s pročišćenom peludi



Slika 74. Prereznani uzorak hidrogela s nepročišćenom peludi

Na hidrogelovima koji su stajali u hladnjaku, nakon nekog se vremena pojavila plijesan pa dalje nisu promatrani.

Nakon otprilike 20 dana od stavljanja u zamrzivač, hidrogelovi su izvađeni iz zamrzivača kako bi se utvrdilo jesu li zacijelili. Na prvi se pogled činilo da su hidrogelovi zacijelili, no ostavljeni su stajati nekoliko minuta na sobnoj temperaturi kako bi se mogli fotografirati i provjeriti pincetom jesu li zaista zacijelili. Kada su se hidrogelovi odmrznuli, primijećeno je da su i dalje rastavljeni (slika 75).



Slika 75. Hidrogelovi izvađeni iz zamrzivača, nakon stajanja na sobnoj temperaturi

4.9. Određivanje mehaničkih svojstava hidrogelova

Zbog specifične strukture i karakteristika uzoraka hidrogelova (mekani, vlažni i ljepljivi uzorci), određivanje mehaničkih svojstava bilo je zahtjevno za provođenje. Dobiveni su rezultati za lomno produljenje uzoraka hidrogela bez peludi i hidrogela s pročišćenom peludi.

Budući da se kod hidrogelova s nepročišćenom peludi, u obliku epruveta za mehanička ispitivanja pojavila plijesan, mjerenja na tim hidrogelovima nisu provedena.

Lomno produljenje hidrogela bez peludi iznosi 23,51 %, a lomno produljenje hidrogela s pročišćenom peludi 36,95 %. Dakle, kod hidrogela s pročišćenom peludi, dolazi do povećanja lomnog produljenja za oko 50 % u odnosu na hidrogel bez peludi. Povećanje lomnog produljenja kod hidrogela s peludi, tj. povećanje elastičnosti uzorka, rezultat je kompatibilnosti peludi s polimernom matricom. Zbog sličnosti u strukturi peludi i poli(vinil-alkohola) koji je baza polimerne matrice, hidrogelovi s peludi kompaktniji su od hidrogelova bez peludi. Bolja mehanička svojstva čine ih postojanijima za rukovanje i upotrebu.

Što se tiče određivanja tvrdoće, to mjerenje nije bilo moguće provesti jer su pripremljeni hidrogelovi, namijenjeni za ispitivanje tvrdoće, bili premekani i predebili pa su se prilikom rukovanja raspali. Može se zaključiti da takve deblje hidrogelove treba pripremiti s više od 6 ciklusa zamrzavanje/odmrzavanje kako bi bili kompaktniji.

5. ZAKLJUČAK

Nakon pripreme i karakterizacije hidrogelova s peludi, na temelju rezultata koji su dobiveni svakom od pojedinih analiza, došlo se do sljedećih zaključaka:

- Vaganjem hidrogelova istog volumena prije i poslije sušenja utvrđeno je da najveći udio vode ima hidrogel bez peludi, zatim hidrogel s pročišćenom peludi te naposljetku hidrogel s nepročišćenom peludi. Zbog dodatka peludi, u hidrogelovima je prisutno manje mjesta koje može zauzeti slobodna voda pa je posljedično manji ukupni udio vode. Nepročišćena pelud sadrži dodatne nečistoće i tvari raznog porijekla koje dodatno smanjuju udio vode.
- Rezultati bubrenja pokazuju da najveći stupanj bubrenja ima hidrogel s nepročišćenom peludi dok najmanji stupanj bubrenja ima hidrogel bez peludi. Za pelud je karakteristično brzo bubrenje njezinih zrnaca uslijed prodiranja vode. Bubrenje je bolje u vodi nego u fiziološkoj otopini jer nenabijene molekule vode mogu lakše prodrijeti u unutrašnjost hidrogela od otopine NaCl-a. Svojestvo znatnog bubrenja hidrogelova s peludi predstavlja potencijal za njihovu primjenu kao obloga i dijelova zavoja za rane.
- FTIR spektri poli(vinil-alkohola) i peludi pokazali su sličnost što je u skladu s informacijama iz literature. Sličnost u strukturi poli(vinil-alkohola) i peludi razlog je njihove kompatibilnosti i dobivanja kompaktnih hidrogelova s peludi pripremljenih u ovom radu te njihovih dobrih svojstava.
- Elektrokemijskom impedancijskom spektroskopijom (EIS) utvrđeno je da se vodljivost hidrogelova povećava dodatkom peludi. Pelud sadrži razne elemente kao što su željezo, bakar, cink, mangan, silicij i selen te kalcij, fosfor, magnezij, natrij i kalij koji bi mogli dovesti do povećanja ukupne količine iona u sustavu što rezultira povećanom vodljivošću.
- Svjetlosnom mikroskopijom, pri uvećanju 400 puta, uočeno je da su zrnca nepročišćene peludi ovalnog oblika te su vidljive izdužene aperture dok su zrnca pročišćene peludi okruglog oblika što upućuje na to da su nakon pročišćavanja ostala djelomično nabubrena.
- Pokazalo se da pelud posjeduje antimikrobnu aktivnost jer su se nakon inkubacije na hranjivim podlogama s mješovitim bakterijskim, odnosno gljivičnim kulturama, razvile zone inhibicije oko uzoraka peludi. Za antimikrobno djelovanje pčelinje peludi, mogli

bi biti odgovorni različiti mehanizmi zbog prisutnosti aktivnih spojeva u strukturi peludi poput flavonoida i fenolne kiseline. Može se zaključiti da bi povećanje udjela peludi u hidrogelovima moglo doprinijeti povećanju antimikrobnog djelovanja hidrogelova s peludi.

- Na jednoj grupi uzoraka hidrogelova, došlo je do pojave plijesni dok na drugim uzorcima, koji su ostavljeni stajati vremenski jednako dugo u hladnjaku, nije došlo do pojave plijesni. Može se utvrditi da je ključno dobro dezinficirati pribor kojim se rukuje i posudice u kojima se hidrogelovi čuvaju.
- Pripremljeni hidrogelovi nisu pokazali svojstvo zacjeljivosti.
- Određivanje mehaničkih svojstava hidrogelova pokazalo je da hidrogelovi s peludi imaju višu vrijednost lomnog produljenja od hidrogela bez peludi. To je posljedica kompatibilnosti peludi s polimernom matricom jer postoje sličnosti u strukturi peludi i poli(vinil-alkohola). Hidrogelovi s peludi kompaktniji su od hidrogelova bez peludi, a povoljnija mehanička svojstva čine ih postojanijima za rukovanje i upotrebu.

6. POPIS SIMBOLA

Oznaka	Mjerna jedinica	Opis
DH	– / %	stupanj hidrolize
l	m	duljina
M_w	Da/u	molekulska masa
n	o/min	broj okretaja/brzina vrtnje
P	m^2	površina
R_{el}	Ωm^2	otpor elektrolita
T	$^{\circ}C$	temperatura
T	– / %	transmitancija
t	s	vrijeme
V	m^3	volumen
w	– / %	maseni udio
WC	– / %	sadržaj vode
Z	Ω	impedancija
$ Z $	Ωm^2	modul (apsolutna vrijednost) impedancije
α	– / %	stupanj bubrenja
ε	– / %	lomno produljenje
ζ	/	maseni omjer
η	Pas	dinamička viskoznost
θ	$^{\circ}$	fazni kut
ν	m^{-1}	valni broj
ρ	Ωm	specifični otpor elektrolita
σ	$S m^{-1}$	električna provodnost
ψ	/	volumni omjer
ω	Hz	frekvencija

7. LITERATURA

- ¹ Petrovčić, T., Pilipović, A., Hidrogelovi, Polimeri: časopis za plastiku i gumu, **32** (2011) 31–33.
- ² Ahmed, E. M., Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, Journal of Advanced Research, **6** (2015) 105–121.
- ³ Bahram, M., Mohseni, N., Moghtader, M., An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications, Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels (2016), DOI: 10.5772/64301
- ⁴ Gulrez, S. K. H., Al-Assaf, S., O Phillips, G., Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications, Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications (2011), DOI: 10.5772/24553
- ⁵ Maitra, J., Shukla, V. K., Cross-linking in Hydrogels - A Review, American Journal of Polymer Science, **4** (2014), 25–31.
- ⁶ Bashir, S., Hina, M., Iqbal, J., Rajpar, A. H., Mujtaba, M. A., Alghamdi, N. A., Wageh, S., Ramesh, K., Ramesh, S., Fundamental Concepts of Hydrogels: Synthesis, Properties, and Their Applications, Polymers, **12** (2020), 2702.
- ⁷ El Sayed, M. M., Production of Polymer Hydrogel Composites and Their Applications, Journal of Polymers and the Environment (2023), <https://doi.org/10.1007/s10924-023-02796-z>
- ⁸ Zafar, S., Hanif, M., Azeem, M., Mahmood, K., Gondal, S. A., Role of crosslinkers for synthesizing biocompatible, biodegradable and mechanically strong hydrogels with desired release profile, Polymer Bulletin, **79** (2022), 9199–9219.
- ⁹ Di Turo, F., Matricardi, P., Di Meo, C., Mazzei, F., Favero, G., Zane, D., PVA hydrogel as polymer electrolyte for electrochemical impedance analysis on archaeological metals, Journal of Cultural Heritage (2018), DOI: 10.1016/j.culher.2018.09.017
- ¹⁰ Jeong, J. O., Park, J. S., Kim, E. J., Jeong, S. I., Lee, J. Y., Lim, Y. M., Preparation of Radiation Cross-Linked Poly(Acrylic Acid) Hydrogel Containing Metronidazole with Enhanced Antibacterial Activity, International Journal of Molecular Sciences, **21** (2019), 187.
- ¹¹ Li, J., Mooney, D. J., Designing hydrogels for controlled drug delivery, Nature Reviews Materials, **1** (2016)

- ¹² URL: <https://coopervision.co.uk/practitioner/our-products/contact-lens-technology/smart-silicone-chemistry> (pristup: 14.04.2023.)
- ¹³ Peppas, N. A., Van Blarcom, D. S., Hydrogel-based biosensors and sensing devices for drug delivery, *Journal of Controlled Release*, **240** (2016), 142–150.
- ¹⁴ Cao, X., Jiang, C., Sun, N., Tan, D., Li, Q., Bi, S., Song, J., Recent progress in multifunctional hydrogel-based supercapacitors, *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, **6** (2021), 338–350.
- ¹⁵ URL: https://www.researchgate.net/figure/Concept-and-advantages-of-the-hydrogel-based-organic-subdural-electrode_fig1_335847360 (pristup: 15.04.2023.)
- ¹⁶ Nagarkar, R., Patel, J., Polyvinyl Alcohol: A Comprehensive Study, *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences* **3** (2019) 34–44.
- ¹⁷ Aslam, M., Kalyar, M. A., Raza, Z. A., Polyvinyl alcohol: A review of research status and use of polyvinyl alcohol based nanocomposites, *Polymer Engineering & Science* (2018), DOI: 10.1002/pen.24855
- ¹⁸ Rudnik, E., Compostable Polymer Properties and Packaging Applications, *Plastic Films in Food Packaging*, (2013) 217–248, DOI: 10.1016/b978-1-4557-3112-1.00013-2
- ¹⁹ Huang, R., Zhang, Y., Xiang, A., Ma, S., Tian, H., Ouyang, Y, Rajulu, A. V., Crystallization behavior of polyvinyl alcohol with inorganic nucleating agent talc and regulation mechanism analysis, *Journal of Polymers and the Environment*, **30** (2022), 3163–3173.
- ²⁰ Gaaz, T., Sulong, A., Akhtar, M., Kadhum, A., Mohamad, A., & Al-Amiery, A., Properties and Applications of Polyvinyl Alcohol, Halloysite Nanotubes and Their Nanocomposites, *Molecules*, **20** (2015), 22833–22847.
- ²¹ Pakoļpakçıl, A., Draczynski, Z., Green Approach to Develop Bee Pollen-Loaded Alginate Based Nanofibrous Mat, *Materials* **14** (2021), 2775.
- ²² Frent, O.D., Vicas, L.G., Duteanu, N., Morgovan, C.M., Jurca, T., Pallag, A., Muresan, M.E., Filip, S.M., Lucaciu, R.-L., Marian, E., Sodium Alginate – Natural Microencapsulation Material of Polymeric Microparticles, *International Journal of Molecular Sciences*, **23** (2022), 12108.
- ²³ Lee, K. Y., Mooney, D. J., Alginate: Properties and biomedical applications, *Progress in Polymer Science*, **37** (2012), 106–126.

- ²⁴ Hurtado, A., Aljabali, A. A. A., Mishra, V., Tambuwala, M. M., Serrano-Aroca, Á., Alginate: Enhancement Strategies for Advanced Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, **23** (2022), 4486.
- ²⁵ Jeon, O., Alt, D.S., Ahmed, S.M., Alsberg, E., The effect of oxidation on the degradation of photocrosslinkable alginate hydrogels, *Biomaterials*, **33** (2012), 3503–3514.
- ²⁶ Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L., Olczyk, K., Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2015** (2015), 1–6.
- ²⁷ Xu, J., Ding, Z., Vizcay-Barrena, G., Shi, J., Liang, W., Yuan, Z., Werck-Reichhart, D., Schreiber, L., Wilson, Z. A., Zhang, D., ABORTED MICROSPORES Acts as a Master Regulator of Pollen Wall Formation in Arabidopsis, *The Plant Cell*, **26** (2014), 1544–1556.
- ²⁸ Murphy, D., The extracellular pollen coat in members of the Brassicaceae: composition, biosynthesis, and functions in pollination, *Protoplasma*, **228** (2006), 31–39.
- ²⁹ Li, F.-S., Phyto, P., Jacobowitz, J., Hong, M., & Weng, J.-K., The molecular structure of plant sporopollenin, *Nature Plants* (2018), DOI: 10.1038/s41477-018-0330-7
- ³⁰ Šiber, A., Pelud: skriveni život cvijeća, predavanje (2022), URL: <https://www.youtube.com/watch?v=me-VMeZUusz4> (pristup: 03.07.2023.)
- ³¹ Božič, A., Šiber, A., Mechanics of inactive swelling and bursting of porate pollen grains, *Biophysical Journal*, **121** (2022), 782–792.
- ³² Šiber, A., Mehanika isušivanja i bubrenja peludi, predavanje (2021), URL: <https://www.youtube.com/watch?v=mplwv209xX8> (pristup: 03.07.2023.)
- ³³ Tyliczszak, B., Walczyk, D., Wilczyński, S., Acrylic hydrogels modified with bee pollen for biomedical applications. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **5** (2015), 10–14.
- ³⁴ Gun'ko, V., Savina, I., Mikhalovsky, S., Properties of Water Bound in Hydrogels, *Gels*, **3** (2017), 37.
- ³⁵ Wang, T., Gunasekaran, S, State of water in chitosan–PVA hydrogel, *Journal of Applied Polymer Science*, **101** (2006), 3227–3232.
- ³⁶ Rahman, M. S., Islam, M. M., Islam, M. S., Zaman, A., Ahmed, T., Biswas, S., Sharmeen, S., Rashid, T. U., Rahman, M. M., Morphological Characterization of Hydrogels, *Cellulose-*

Based Superabsorbent Hydrogels, Springer International Publishing, Cham (2019), 819–863., DOI: 10.1007/978-3-319-77830-3_28

³⁷ Park, J., Doyle, P. S., Multifunctional Hierarchically-Assembled Hydrogel Particles with Pollen Grains via Pickering Suspension Polymerization, *Langmuir*, **34** (2018), 14643–14651.

³⁸ Zakon, H. H., Electric fields of flowers stimulate the sensory hairs of bumble bees, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113** (2016), 7020–7021.

³⁹ Stuart, B. H., *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons (2004), DOI:10.1002/0470011149

⁴⁰ Kamoun, E. A., Kenawy, E.-R. S., Tamer, T. M., El-Meligy, M. A., Mohy Eldin, M. S., Poly (vinyl alcohol)-alginate physically crosslinked hydrogel membranes for wound dressing applications: Characterization and bio-evaluation, *Arabian Journal of Chemistry*, **8** (2015) 38–47.

⁴¹ Aljar, M. A. A., Rashdan, S., Abd El-Fattah, A., Environmentally Friendly Polyvinyl Alcohol-Alginate/Bentonite Semi-Interpenetrating Polymer Network Nanocomposite Hydrogel Beads as an Efficient Adsorbent for the Removal of Methylene Blue from Aqueous Solution. *Polymers* **13** (2021) 4000.

⁴² Mirzaie, Z., Reisi-Vanani, A., Barati, M., Polyvinyl alcohol-sodium alginate blend, composited with 3D-graphene oxide as a controlled release system for curcumin, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **50** (2019) 380-387.

⁴³ Prđun, S., Svečnjak, L., Valentić, M., Marijanović, Z., Jerković, I., Characterization of Bee Pollen: Physico-Chemical Properties, Headspace Composition and FTIR Spectral Profiles, *Foods*, **10** (2021), 2103.

⁴⁴ Yumin, A., Ligu, D., Yang, Y., Yongna, J., Mechanical properties of an interpenetrating network poly(vinyl alcohol)/alginate hydrogel with hierarchical fibrous structures, *RSC Advances*, **12** (2022), 11632–11639.

⁴⁵ Bleha, R., Shevtsova, T. V., Živčáková, M., Korbářová, A., Ježková, M., Saloň, I., Brindza, J., Synytsya, A., Spectroscopic Discrimination of Bee Pollen by Composition, Color, and Botanical Origin, *Foods*, **10** (2021), 1682.

⁴⁶ – URL: <http://www.antimicrobe.org/new/b112.asp> (pristup: 18.07.2023.)

- ⁴⁷ – Lu., Z., Guo, W., Liu, C., Isolation, identification and characterization of novel *Bacillus subtilis*, *Journal of Veterinary Medical Science*, **80** (2018), 427–433.
- ⁴⁸ – Olczyk, P., Koprowski, R., Kaźmierczak, J., Mencner, L., Wojtyczka, R., Stojko, J., Olczyk, K., Komosinska-Vassev, K., Bee Pollen as a Promising Agent in the Burn Wounds Treatment. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2016** (2016), 1–12.
- ⁴⁹ – Campos, M. G., Anjos, O., Chica, M., Campoy, P., Nozkova, J., Almaraz-Abarca, N., Barreto, L. M. R. C., Nordi, J. C., Estevinho, L. M., Pascoal, A., Paula, V. B., Chopina, A., Dias, L. G., Tešić, Ž. L. j., Mosić, M. D., Kostić, A. Ž., Pešić, M. B., Milojković-Opsenica, D. M., Sickel, W., Ankenbrand, M. J., Grimmer, G., Steffan-Dewenter, I., Keller, A., Förster, F., Tananaki, C. H., Liolios, V., Kanelis, D., Rodopoulou, M-A., Thrasyvoulou, A., Paulo, L., Kast, C., Lucchetti, M. A., Glauser, G., Lokutova, O., de Almeida-Muradian, L. B., Szczesna, T., Carreck, N. L., Standard methods for pollen research, *Journal of Apicultural Research*, **60** (2021), 1–109.
- ⁵⁰ – Albores-Flores, V., Saavedra-Camacho, E., López-García, J. A., Grajales-Conesa, J., Córdova-Albores, L. C., Physicochemical characterization, antioxidant and antifungal activity of three stingless bee pollen aggregate (Apidae: Meliponini) from Soconusco, Chiapas, *Mexican Journal of Phytopathology*, **39** (2021), 41–60.
- ⁵¹ – Hudzicki, J., Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol, American Society for Microbiology (2009), URL: <https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf> (pristup: 19.07.2023.)

8. ŽIVOTOPIS

Ana Šaravanja [REDACTED] U periodu od 2004. do 2012. pohađala je osnovne škole „OŠ Trn“ te „Prva osnovna škola Široki Brijeg“ u Širokom Brijegu, Bosna i Hercegovina. Od 2012. do 2016. godine pohađala je opću gimnaziju „Gimnazija fra Dominika Mandića“ u Širokom Brijegu. Tijekom svoga školovanja, sve je razrede završila s odličnim uspjehom te je na kraju osnovne škole proglašena učenicom generacije. Godine 2016. upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, studij Kemijsko inženjerstvo. Godine 2018. mijenja studij na Fakultetu, upisavši studij Kemija i inženjerstvo materijala. Za vrijeme preddiplomskog studija, 2020. godine odradila je stručnu praksu u tvrtki Feal d.o.o. Široki Brijeg gdje se upoznala s procesom elektrostatskog bojanja / plastifikacije. Godine 2021. završava preddiplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala, a završni rad pod nazivom „Kemijsko recikliranje polimernih materijala“ obranila je pod mentorstvom Ljerke Kratofil Krehula sa Zavoda za polimerno inženjerstvo i organsku kemijsku tehnologiju. Obrazovanje također nastavlja na diplomskom studiju Kemija i inženjerstvo materijala. Na završnoj godini diplomskog studija, u travnju 2023. godine, zaposlila se kao student pomoćnik u tvrtki PLIVA Hrvatska d.o.o., TAPI, u odjelu Istraživanje i razvoj – Fizikalna karakterizacija gdje se pobliže upoznala s praktičnim vještinama rada u laboratoriju.